ACTA MICROBIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS
E. FARKAS, J. HORVÁTH, S. KOTLÁN, R. MANNINGER,
A. PELC, K. RAUSS, J. SZIRMAI

REDIGIT
G. IVÁNOVICS

TOMUS IV FASCICULI 1—2

AKADÉMIAI KIADÓ BUDAPEST

1957

ACTA MICROBIOL. HUNG.

ACTA MICROBIOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA MIKROBIOLÓGIAI KÖZLEMÉNYEI

KIADÓHIVATAL: BUDAPEST V., ALKOTMÁNY UTCA 21

Az *Acta Microbiologica* német, angol, francia és orosz nyelven közöl értekezéseket a mikrobiológia tárgyköréből.

Az *Acta Microbiologica* változó terjedelmű füzetekben jelenik meg. Több füzet alkot egy kötetet.

A közlésre szánt kéziratok a következő címre küldendők:

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Ugyanerre a címre küldendő minden szerkesztőségi levelezés.

Az *Acta Microbiologica* előfizetési ára kötetenként belföldre 80, külföldre 110 Ft. Megrendelhető a belföld számára az Akadémiai Kiadónál (Budapest V., Alkotmány utca 21. Bankszámla 05-915-111-44), a külföld számára pedig a »Kultúra« Könyv és Hírlap Külkereskedelmi vállalatnál (Budapest VI., Magyar Ifjúság útja 21. Bankszámla: 43-790-057-181) vagy külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

Die *Acta Microbiologica* veröffentlichen Abhandlungen aus dem Bereiche der Mikrobiologie in deutscher, englischer, französischer und russischer Sprache.

Die *Acta Microbiologica* erscheinen in Heften wechselnden Umfanges. Mehrere Hefte bilden einen Band.

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind an folgende Adresse zu senden:

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

An die gleiche Anschrift ist auch jede für die Redaktion bestimmte Korrespondenz zu richten.

Abonnementspreis pro Band: 110 Forint. Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Außenhandels-Unternehmen »Kultúra« (Budapest VI., Magyar Ifjúság útja 21. Bankkonto Nr. 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

ACTA MICROBIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS

E. FARKAS, J. HORVÁTH, S. KOTLÁN, R. MANNINGER,
A. PELC, K. RAUSS, J. SZIRMAI

REDIGIT

G. IVÁNOVICS

TOMUS IV

AKADÉMIAI KIADÓ
BUDAPEST

1957

ACTA MICROBIOL. HUNG.

ACTA
MICROBIOLOGICA
ACADEMIAE SCIENTIARUM
HUNGARICAE

INDEX

Tomus IV.

Fasciculus 1

Csillag, A.: Contribution to the Taxonomical Classification of the so-called *Pneumocystis carinii* 1

Wix, G., Weisz, E. und *Bodánszky, M.:* Verwandlung des Progesterons in 11-Epicorticosteron mit Hilfe von *Aspergillus niger* 9

Kende, É., Borbély, K., Cserenyei, E. and *Ring, I.:* The First Isolation of *H. parapertussis* in Hungary 19

Lovas, B.: Durch Zerstäubung modifiziertes HKB-Verfahren und seine weitere Verwendung für elektronenmikroskopische Präparativzwecke 23

Szirmai, J.: Biologische Abwehr mittels Virus zur Bekämpfung der *Hyphantria cunea* Drury 31

Földes, J.: The Nature of the Specific Polysaccharides of Tubercle Bacilli. II 43

Sinkovics, J.: Pleuropneumonieähnliche Eigenheiten in alten *E. coli*-Kulturen 59

Balassa, R.: Durch Desoxyribonukleinsäuren induzierte Veränderungen bei Rhizobien . 77

Balasa, R.: Einige Bedingungen der Ausbildung einer durch Desoxyribonukleinsäuren induzierten niedrigen Streptomycinresistenz bei Rhizobien 85

Bozsóky, S.: Immunobiological Studies on Endotoxins. III. Dermal Reactions to Endotoxins in the Rabbit 97

Alföldi, L.: Isolation and Characterisation of some *Pseudomonas pyocyanea* Bacteriophages 107

Alföldi, L.: Frequency of Lysogenic Strains in *Pseudomonas pyocyanea* 119

Fasciculus 2

Váczi, L. and *Tolnai, G.:* The Virulence of Chloramphenicol-Resistant *S. typhi* Srains 123

Eidus, L., Clauder, O. und *Vági—Kolbán, K.:* Ergebnisse und Methoden der *in vitro* Untersuchung von Antituberkulotika 131

Lehocky, J. and *Klement, Z.:* Bacterial Blight of the Umbels of Carrot in Hungary .. 147

Füzi, M., Alföldy, Z., Kiszel, J. und *Raditz, I.:* Die Leptospiren-Infektion der Feldnagetiere in einem Gebiet von Westungarn 155

Kiszel, J., Alföldy, Z. und *Füzi, M.:* Untersuchung der Leptospiren Infektion von Nagetieren in einer Gemeinde von Südostungarn 167

Bozsóky, S. und *Elődi, P.:* Immunbiologische Untersuchung der aus Säugermuskeln gewonnenen kristallinen Phosphoglyzerinaldehyd-Dehydrogenasen 175

Dömök, I.: Studies on the Interaction between Coxsackie and Poliomyelitis Viruses. I. Simultaneous Infection with Bl Coxsackie and Lansing Poliomyelitis Viruses in Mice of Different Ages 183

Földes, P.: Virus Isolation Experiment in Relation to the Poliomyelitis Epidemic of 1954 in Hungary 197

Eörsi, M., Jablonszky, L., Milch, H. and *Barsy, G.:* Significance of Bacteriophage in Infantile Enteric Infections 201

Tolnai, G.: Investigations into the Antigenic Composition of the Salmonella—Group 217

Fasciculus 3

Tolnai, G. and *Barsy, G.:* Active and Passive Mouse Protection Tests Used in the Assay of Typhoid Vaccines 227

Kardeván, A. und *Kapp, P.:* Untersuchungen über das Vorkommen der Toxoplasmose an Haustieren in Ungarn 237

Fürész, I., Kubinyi—Schwanner, M. und *Józsa, G.:* Über die Bewertung der Laboratoriumsuntersuchungsresultate bei den mit Chloramphenicol behandelten Typhuskranken 253

Gunda, L., Joó, I., Richter, P. and *Váli, A.:* Preparation of Typhoid Vaccine from Separated Antigenic Components. I. Preparation of Purified O and Vi Antigens 263

Uri, J., Bognár, R. and *Békési, I.:* Fungicidal Effect of Methyl Derivatives of 8-Hydroxyquinoline on Dermatophytes 279

Szita, J.: Differential Diagnosis of Enterococci 289

Ivánovics, G., Alföldi, L. and *Lovas, B.:* Cultivation and Electron Microscopy of a Bacteriocinogenic Strain of Bacillus megaterium 295

Győrffy, B. and *Kállay, I.:* Streptomycin Resistance of Serratia marcescens 309

Ivánovics, G., Alföldi, L. and *Széll, Á.:* Serological Types of Bacillus megaterium and their Sensitivity to Phages 333

Molnár, E. and *Fornosi, F.:* Aetiologic Study of Poliomyelitis Cases Occurred in the Second Half of 1955 in Hungary 353

Koch, A. and *Csonka, É.:* Effects of Formaldehyde on Influenza Virus. — I. Effects on the Haemagglutinating Activity of the Virus 357

Lovrekovich, L.: Simple Methods for Testing the Nitrate Reducing, Catalase and the Fat Splitting Activity of Bacteria 363

Fasciculus 4

Serény, B.: Experimental Keratoconjunctivitis Shigellosa 367

Kiszel, J. und *Füzi, M.:* Untersuchung des Leptospirenbefalls der Haustiere in einer Südostungarischen Gemeinde 377

Lovas, B., Egyessy, D. M. und *Alföldi, L.:* Elektronenmikroskopische Untersuchung der Pseudomonas Pyocyanea-Bakteriophagen 391

Fekete, L., Nemes, Gy., Kleeberg, J. and *Ábrahám, E.:* Complement-Titres in Subjects with Differing Uptakes of Dietary Protein, with Special Reference to Antibody Formation in Dependence on Diet 405

Vas, K. und *Proszt, G.:* Die Rolle des pH bei der Sterilisierung von Konserven..... 413

Vas, K.: A Method for the Evaluation of the Quantal Response of Microbial Cultures to Chemical and Physical Agents 433

Váczi, L., Szita, J. and *Cieleszky, V.:* The Role of Lipids in Induced Chloramphenicol Resistance of Bacteria 437

Lányi, B.: Serological Typing of Proteus Strains. Sensitivity of Serotypes to Antibiotics. 447

Hollós, I.: Electronmicroscopic Examination of Complete and Incomplete Influenza Virus Particles 459

CONTRIBUTION TO THE TAXONOMICAL CLASSIFICATION OF THE SO-CALLED PNEUMOCYSTIS CARINII

By

A. CSILLAG

State Institute of Hygiene, Budapest

(Received October 27, 1955)

Since VANEK and JIROVEC [31, 13, 14, 15, 16] had described the agent responsible for infantile interstitial plasmocytic pneumonia and had published the results of their detailed morphological investigations, numerous reports have been concerned with the taxology of the pathogenic agent. However, no final decision has as yet been reached.

JIROVEC et al., as well as some other authors believe the pathogenic agent to be a protozoon, while GIESE [12], BAUCH and LANDSTÄTTER [2], BIENENGRÄBER [4], SIMON [26], BRUNS and BÖTTGER [6], SZATHMÁRY [29], SZÉKELY and KÖVÉR [30], as well as CSILLAG and BRANDSTEIN [8, 9, 10, 5] have made attempts at proving experimentally that the agent was actually a fungus. A few authors claim that the disease is caused by an as yet unidentified virus. The virus theory had been suggested by WEISSE and BIELING and was corroborated recently by MOSER [19].

The advocates of the protozoon theory have reported thus far on morphological studies only ; all the attempts at cultivation have failed and no diagnosis "ex juvantibus" could be made by trials with protozoicidal agents, either. JIROVEC et al. refused to accept the positive cultural results, the conclusions drawn from them and the evidence obtained in animals infected with artificially grown fungus. While admitting that the structures seen in the lung of animals infected with Saccharomyces bear a "superficial" resemblance to the structures observed in the lungs of infants dead with interstitial pneumonia, JIROVEC [13] denied the identity of the microorganisms. Neither did he accept as convincing the histopathological pattern of the lung of mice with experimental disease, though BRANDSTEIN [5] has pointed out its close resemblance to the histological changes occurring in the lungs of patients dead of interstitial pneumonia.

GIESE relied on theoretical considerations when he claimed that *Pneumocystis carinii* should be classified as a fungus and suggested the name *Saccharomyces octosporus* [12]. BAUCH and LANDSTÄTTER [2] listed the fungus among the Candidae. These authors succeeded in producing such forms of Candidae, as included all the transient forms of the pathogen described by JIROVEC.

CSILLAG and BRANDSTEIN have repeatedly succeeded in growing a Saccharomyces from the lungs of patients died of interstitial pneumonia and, by making mice aspirate the fungus, produced in their lungs structures resembling the transient and octosporous forms of *Pneumocystis carinii*. In later experiments [5, 9, 10] suckling mice were successfully infected and developed pulmonary changes, which, according to BRANDSTEIN, corresponded to initial interstitial pneumonia. They could not be expected to be wholly identical with the changes in infant lungs, because the mice succumbed too soon. SIMON [26] regards *Pneumocystis carinii* as a peculiar vegetative form of *Candida albicans* (thrush). He inoculated guinea pigs intrapulmonally with the fungus, treated them with penicillin and, after some time, found that the animals developed the transient and octosporous forms described by JIROVEC. BIENENGRÄBER [4] produced forms similar to *Pneumocystis carinii* by inoculating into the pharyngeal cavity of guinea pigs 3 well-defined fungi, viz. *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis* and *Candida albicans*, and also obtained the forms described when growing the fungi in tissue cultures and in the chicken embryo. SZATHMÁRY [29] produced the "characteristic" structures in the saprophyte phase of a yeast grown from the lung of infants dead of interstitial pneumonia. SZÉKELY and KÖVÉR [30] found that there was a significant difference in the throat swabs of premature infants with and without interstitial pneumonia, in that the diseased infants, swabs contained Saccharomycetes, Candidae, Schizosaccharomycetes and a "peculiar kind of Blastomyces", the latter not being present in swabs from normal infants. The same fungus could be recovered from two patients died of interstitial pneumonia while it was not detected in the lungs of a child dead of a different disease. By means of extensive histotopochemical investigations, BRUNS and BÖTTGER [6] showed that *Pneumocystis carinii* was not a protozoon, but a microorganism of plant nature. These authors suggested the fungus to be classified as a Saccharomyces. When listing the pathogenic agent among the Haplosporidiae, JIROVEC himself admits that there are also low fungi among the members of this group [13].

Apart from the direct experimental evidences described above, there are also indirect arguments in support of *Pneumocystis carinii* being a fungus. According to DVORACEK and NAVRATIL, and SMID (cit. 15) the incidence of interstitial pneumonia has increased since the extensive use of sulfonamides and antibiotics. It is also common knowledge that the incidence of diseases caused by fungi has increased parallel with the use of antibiotics. These two observations obviously show that it is not unreasonable to claim that interstitial pneumonia may be considered a secondary mycoses correlated with the use of antibiotics. The promotion of systemic mycoses by ACTH and cortisone has been often reported [25, 17, 18]. ANTOPOL and QUITTNER [1] have described endogenous systemic mycoses in man as developing after prolonged ACTH and cortisone therapy. Correlating these data with the findings by WELLER [33],

another evidence presents itself to the view that *Pneumocystis carinii* is a fungus. WELLER has namely succeeded in inducing interstitial pneumonia in suckling rats by treating them with excessive doses of penicillin and cortisone ; he attributed the result to an activation of Pneumocystis by penicillin and cortisone, but did not deal with the taxology of the pathogenic agent. With regard to the above data, we believe that the cause might have been an activation of the yeast present in the normal rat. Finally the fungal theory is supported also by the diagnosis made "ex juvantibus" in some therapeutic experiments. PETERSEN [20, 21] found Paraben (para-oxibenzoic acid propylester) in combination with vitamin K_5 to be effective even in such cases on interstitial pneumonia in which vitamin K_5 alone had failed. SABALITSCHKA [24] described in detail the effective antimycotic action of Paraben in a number of systemic mycoses.

Experimental

In reports published during the past two years [5, 8, 9, 10], it has been described that one and the same species of Saccharomyces was recovered from the lungs of a number of infants dead of interstitial pneumonia. On making suckling mice to aspirate the fungus they fell ill. The smears made of material from the lung of the dead animals contained structures similar to the transient and octosporous forms of *Pneumocystis carinii*. BRANDSTEIN studied the histopathology of the lungs of mice that developed the disease after infection with the fungus we had isolated. He found the histological patterns similar to those seen in premature infants dead of interstitial pneumonia.

An account of our further mycological investigations is presented below.

1. We have made attempts at isolating the fungus in question from 5 premature infants dead of interstitial pneumonia. In 2 cases the fungus could be grown from abrased lung tissue, in 3 it could not. In both positive cases it grew together with *Candida albicans*. The fungus could be isolated after the 8th and 11th passage, respectively.

2. Two new and one old (1 year old) strains were used for inducing disease by the usual technique in suckling mice, without success. Intrapulmonary injection of the fungus also failed to produce disease. These observations are in agreement with the earlier experience that the fungus loses its pathogenicity rapidly, after 1 or 2 subcultures.

3. New attempts have been made to produce forms similar to *Pneumocystis carinii*. The Saccharomyces in question has been grown in various media (blood agar containing penicillin and streptomycin, corn meal agar, malt agar), as well as in tissue cultures (chicken heart, chicken lung). Almost every method

yielded some transient forms after different times of growth, but no convincing results were obtained by these methods.

Highly satisfactory results have been obtained by the use of the following medium. ADAMS' agar, containing 10 g of ACTH and 10 000 U penicillin per ml, was slanted in test tubes. A 48-hour culture of the fungus was inoculated on the upper third of the slant so as to ensure that conditions as soon as possible become unfavourable for the fungus (exsiccation of the medium). After incubation for 30 days at room temperature or at 37° C the suspension was plated out on slides, fixed with methanol and stained with GIEMSA's stain.

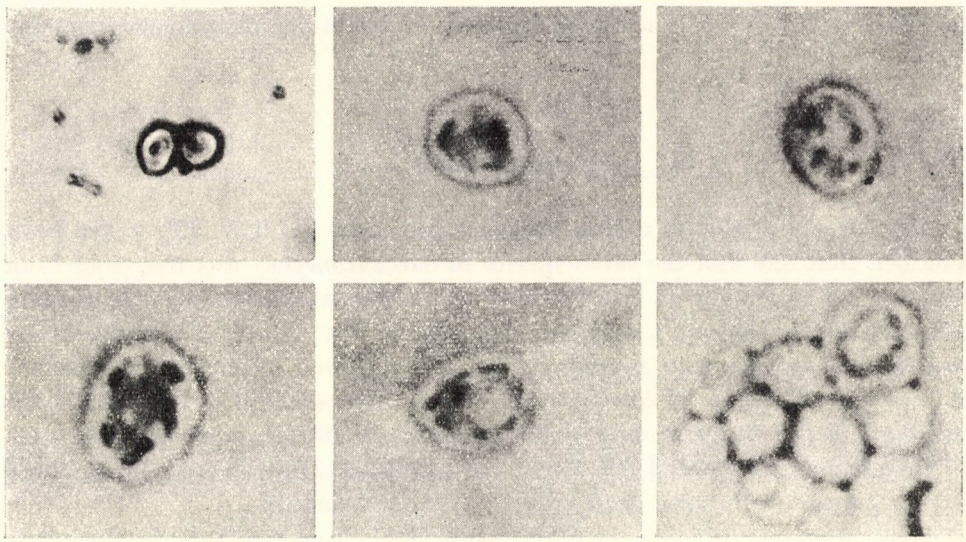


Fig. 1. Forms of *Saccharomyces sp.* and *Candida tropicalis*, containing 1, 2, 4, or 8 smaller structures
Giemsa's stain
Natural size: 5 to 7 μ

Transient and octosporous forms resembling *Pneumocystis carinii* were found. These are presented in Fig. 1.

4. Since the authors mentioned in the introduction had experimented with different kinds of Candida and had obtained results comparable to ours, we have cultured *Candida tropicalis* on the above medium and in the above way. The structures in question developed as early as after 20 days. The only difference in this respect between the two kinds of fungus was that the cells of *Candida tropicalis* exceeded in size by 2 to 3 μ those of the former fungus and that the Candida cultures contained not only the above mentioned forms and blastospores, but also pseudomycelia (Fig. 1).

Discussion

On the basis of experimental evidence presented by both the authors referred to and by us, as well as after the evaluation of the indirect evidences mentioned, it is believed that

1. *Pneumocystis carinii* is a form of a kind of yeast. It is questionable, however,

2. to which group of yeasts it belongs ;

3. whether the transient and octosporous forms develop by sexual or asexual reproduction ; and, finally,

4. what is actually the frothy material (Wabenmasse) detectable in the lung of infants dead of interstitial pneumonia.

Ad. 1. JIROVEC et al. rely exclusively upon morphological evidence when they claim that *Pneumocystis carinii* is a protozoon. JIROVEC has described in detail the morphology of the structure found in the infantile lung. The description, however, fits well also to Blastomyces. On the basis of careful studies on the staining of the structures observed in the lungs of infants, BRUNS and BÖTTGER [6] stated the pathogen to be a Blastomyces. The only uncertainty was its staining property since Blastomycetes are usually Gram-positive, while *Pneumocystis carinii* is initially Gram-positive and becomes Gram-negative only later [11, 13, 34]. When describing our own experiments we have stated concerning the transient and octosporous forms produced as described under point 3. that they were partly Gram-labile and partly Gram-negative. In order to find out whether the negativity was not due to overdifferentiation in staining, Gram-negative and Gram-positive bacteria *(E. coli* and *Pneumococcus)* were mixed to a suspension and it was shown that the Gram-negativity was real. The similarity of the transient and octosporous forms produced by us and by others is very striking if we compare the figures in our report and in *Simon*'s paper [26] with the drawings published in one of the reports [31, page 11] by JIROVEC. In a recent report, WELLER has tried to claim that he had not been able to reproduce the experiments either of BAUCH and LANDSTÄTTER, or of SIMON, or of CSILLAG and BRANDSTEIN. As to the criticism concerning our work, we are unable to accept WELLER's arguments, because he did not identify the fungus used in his experiments. All he has written is that he used "a fungus grown from the lung of infants dead of interstitial pneumonia". A wide variety of Blastomyces may be grown from cadaver lungs, that might have entered the lung by aspiration prior to death. Thus it is not very probable that the fungus used by WELLER is identical with the one we have isolated. On the other hand, even if he used the fungus we did, his experiments could not succeed, since the strain had been carried over many passages and, as it has often been emphasized, the fungus loses its pathogenicity very rapidly. This experience agrees with the statement by JIROVEC [14] that "the pathogenicity of the causative agent

is not great and will develop obviously only in a host already damaged". The same follows from the observation published by WEISSE and WEDLER [32] that in the lungs of unselected cadavers *Pneumocystis carinii* could be demonstrated under the microscope, without any previous history of clinical disease.

Ad 2. Since different authors have succeeded in producing forms similar to *Pneumocystis carinii* by the use of four distinct, well-defined strains of fungus, the place of the pathogen within the group of Blastomycetes has not yet been determined. The Blastomycetes are not a uniform taxological group and the distinction between subgroups is vague. For example, Candidae may be considered to be Endomycopses which have lost the ability to form asci, or have no known sexual form. Likewise, one may look upon Criptococci as being anascosporogenic Saccharomycetes or a kind of Candidae not producing mycelia. The development of the sexual form and mycelium production are properties greatly dependent upon actual living conditions and the inclusion of one or another Blastomyces in one group or another may not at all be final. For example, BENHAM produced a sexual form of *Criptococcus neoformans* [3] and thus this fungus cannot be considered to be one of the Criptococci. CONNEL and SKINNER [7] have stated concerning 13 Criptococci that, although these did not change for two years after isolation, after that time they began to produce pseudomycelia, like Candidae do. CONNEL and SKINNER believe that Candidae are the R variants of Criptococci. No final division can be made on biochemical basis, either. RANQUE and DEPIEDA [23] observed Candida strains over a period of 5 years and found that on subculturing the fungi lost the ability to ferment maltose and laevulose and could ferment glucose only. We, too, have found that the fungus grown from the lung of patients with interstitial pneumonia rapidly loses its fermentative capacity on subculturing. In view of these facts it is not at all astonishing that forms similar to *Pneumocystis carinii* could be produced from a variety of related Blastomyces. It seems reasonable to suggest that the structure in question is not one of the forms of a certain Blastomyces, but is the non-specific form of several, related Blastomycetes. This theory, put forward by us earlier [9], seems to have been substantiated by the evidence derived from our recent experiments. The only point apparently discrediting the view that the pathogenic agent may be a Candida is that pseudomycelia or mycelia are not present in the lungs after death due to interstitial pneumonia, although Candidae are known to produce large amounts of those structures. The assumption that the pathogenic agent is non-specific in nature is in agreement with SURÁNYI's [27] view put forward on grounds of clinical observations that the disease is not necessarily elicited by a single microorganism ; it suffices to consider the latter entirely justified to make a single pathogenic agent responsible for the disease.

Ad 3. It has not been decided, either, whether the transient and octosporous forms arise by sexual or asexual reproduction. GIESE, BRUNS and

BÖTTGER, as well as CSILLAG and BRANDSTEIN think that the structures in question are asci. In support of this view is the fact that they arise under unfavourable conditions after the lapse of some time and that the number of the smaller structures in the cell is limited to 8; in quite exceptional cases there have been found 16. On the other hand, there is the contradictory fact that in both the structures produced *in vitro* and those recovered from infant and mouse lungs the smaller structures stain brown with safraninmalachite green, and not green like ascospores do. In a single case we have succeeded in producing the typical ascus staining, but the experiment could not be reproduced. In general, the sexual forms of fungi do not arise in the pathogenic phase, though this may occur exceptionally. RAABE [22] found asci of an Ascomyces in the kidney of a Cephalopoda : the ascus containing 8 ascospores, presented in Fig. 1, bears a close resemblance to *Pneumocystis carinii*. According to SIMON (26), *Pneumocystis carinii* is not a sexual, but a vegetative form, which arises under specific conditions. According to BIENENGRÄBER [4] it is probable that the small structures detected in *Pneumocystis carinii* are composed of nuclear substance, as it is suggested by their reaction to FEULGEN's stain, though he leaves the question open and with that the structures might as well be plasmagel, chromosomes or endospores, too. Neither are BAUCH and LANDSTÄTTER [2] determined on the subject ; they believe the small structures to arise as a results of nuclear division. This view is corroborated by the fact that these forms rapidly arise under the mutagenic influence of penicillin (LEVAN and TJIS [cit. 26]). SZATHMÁRY [29] supports the view of BAUCH and LANDSTÄTTER, since it was possible to produce the small structures by the polyploidisation method.

Ad 4. The frothy substance found in the lungs of patients dead with interstitial pneumonia (Wabenmasse) is explained unequivocally by most authors. According to GIESE, the frothy substance is actually a mass of fungus colonies, while BAUCH and LANDSTÄTTER, as well as SZATHMÁRY claim that it is composed of a mass of empty Blastomyces cell wall from which the cytoplasm had been dissolved, leaving behind the fuchsin-staining nuclei and nuclear components, the latter being most resistant to fermentative breakdown. Our own experiments revealed that in the colonies of fungus grown *in vitro* for more than a month thus are many forms of which only the empty cell wall had remained present. In some cases masses of such forms show the pattern of the frothy substance. BRUNS and BÖTTGER believe that the optically empty frothy substance arises in consequence of a shrinking of the cytoplasm and a loss of fat content during embedding and thus claim to be an artefact.

SUMMARY

We have succeeded in producing transient and octosporous forms similar to *Pneumocystis carinii* by growing in media containing ACTH and penicillin both the Saccharomyces we had isolated and *Candida tropicalis*. On grounds of the experimental evidence it is suggested that *Pneumocystis carinii* is the non-specific form of several, related Blastomycetes.

The literature on the fungal nature of *Pneumocystis carinii* has been reviewed.

Note

After this report had been submitted for publication, has U. K. PETERSEN's paper been published in the Archiv für Kinderheilkunde **151**, 215 (1955), stating that interstitial pneumonia is due to fungal infection, since it could be cured by the administration of antimycotics.

After completion of this paper have we received the study by SCHMID (Frankf Ztschr. Path. **66**/4, p. 456. 1955), in which by isolation and very careful and detailed experiments *in vitro* the mycotic nature of *Pneumocystis carinii* was established, and the agent identified as *Saccharomyces fragilis*.

JIROVEC's and VANEK's critique (Zbl. Path. Anat. **94**. 1956) concerning our work will be reflected in a following paper.

LITERATURE

1. ANTOPOL, W., QUITTNER, H., SAPHRA, I.: Amer. J. Path. **29**, 599 (1953)
2. BAUCH, R., LANDSTÄTTER, L.: Klin. Wschr. **31**, 37/38. 900 (1953)
3. BENHAM, R. W.: Proc. Soc. Exp. Biol. **89**, 243 (1955)
4. BIENENGRÄBER: Zbl. allg. Path. **92**, 226 (1954)
5. BRANDSTEIN, L., CSILLAG, A.: Orv. Hetil. **95**, 1003 (1954)
6. BRUNS, G., BÖTTGER, D.: Virchows Arch. **326**, 278 (1955)
7. CONNEL, G. H., SKINNER, C. E.: Micropath. Mycol. Appl. **6**, 65 (1951)
8. CSILLAG, A., BRANDSTEIN, L., FÁBER, V., MACZÓ, J.: Orv. Hetil. **94**, 1303 (1953)
9. CSILLAG, A., BRANDSTEIN, L.: Acta Microbiol. Hung. **1**, 525 (1954)
10. CSILLAG, A., BRANDSTEIN, L.: Acta Microbiol. Hung. **2**, 179 (1954)
11. FINGERLAND, A., VORTEL, V.: Schweiz. Ztschr. allg. Path. Bakt. **16**, 201 (1954)
12. GIESE, H.: Mschr. Kinderh. **101**, 147 (1953)
13. JIROVEC, O.: Mschr. Kinderh. **102**, 476 (1954)
14. JIROVEC, O.: Magy. Tud. Akad. Biol. és Orvostud. Közl. **5**, 473 (1954)
15. JIROVEC, O.: In moderne Probleme der Pädiatrie. (Suppl. ad Ann. Paed.) **1**, 86 (1954)
16. JIROVEC, O.: Riv. Parass. **15**, 473 (1954)
17. KÖNIGSBAUER, H.: Zbl. Bakt. I. Orig. **159**, 473 (1952)
18. MANKOVSKI, Z. T., LITTLETON, B. J.: Antibiot. Chemother. **4**, 253 (1954)
19. MOSER, L.: Zbl. Bakt. Orig. I. **163**, 302 (1955)
20. PETERSEN, K.: Tagung der Rheinisch-Westfalischen Kinderärztevereinigung (1953)
21. PETERSEN, K.: Münch. med. Wschr. **95**, 1252 (1953)
22. RAABE, H.: Bull. de l'Inst. Océanographique. No. 640 (1934)
23. RANQUE, J., DEPIEDA, R.: C. R. Soc. Biol. **146**, 479 (1952)
24. SABALITSCHKA, TH.: Arzneimittelforsch. **4**, 575 (1954)
25. SELIGMAN, E.: Proc. Soc. Exp. Biol. **83**, 778 (1953)
26. SIMON, H.: Naturwiss. **40**, 625 (1953)
27. SURÁNYI, GY.: Orv. Hetil. **94**, 1457 (1953)
28. SURÁNYI, GY.: Gyermekgyógy. **5**, 1 (1954)
29. SZATHMÁRY, S.: Orv. Hetil. **96**, 362 (1955)
30. SZÉKELY, K., KÖVÉR, B.: 1953—1954 Yearbook of the Medical University, Debrecen
31. VANEK, J., JIROVEC, O., LUKES, J.: Ann. Paed. **180**, 1 (1953)
32. WEISSE, K., WEDLER, E.: Klin. Wschr. **32**, 270 (1954)
33. WELLER, R.: Zschr. Kinderh. **76**, 366 (1955)
34. WESTPHAL, A.: Ztschr. Tropenmed. Parasit. **4**, 549 (1953)

VERWANDLUNG DES PROGESTERONS IN 11-EPICORTICOSTERON MIT HILFE VON ASPERGILLUS NIGER

Von

G. WIX, E. WEISZ und M. BODÁNSZKY

Forschungsinstitut für Pharmazeutische Industrie, Budapest

(Eingegangen am 24. Januar 1956)

Die Einführung von einer Hydroxylgruppe auf das Kohlenstoffatom 11 des Progesterons in α-Stellung mit Hilfe von Rhizopus-Arten wurde von PETERSON und Mitarbeitern [1] bereits früher beschrieben. Ähnliche Resultate ergibt auch die Oxydation des Progesterons mit *Aspergillus niger* [2], *Pestalozia foedans* [3] bzw. *Trichoderma viride* [4].

MEYSTRE, VISCHER und WETTSTEIN stellten aus Progesteron und anderen Steroiden durch biologische Oxydation mit Ophiobolus-Arten 21-Oxyderivate dar [5].

Neuerdings führten ZAFFARONI und [6] Mitarbeiter die Substituierung der Hydroxylgruppe am (21)-Kohlenstoffatom auch mit dem Stamm *Aspergillus niger* durch, so dass sie z. B. aus Progesteron Desoxycorticosteron und aus 11α-Oxy-progesteron 11-Epicorticosteron gewannen [6]. Diese Verfasser beobachteten ebenfalls die Bildung weiterer, stärker polarer Substanzen.

In der vorliegenden Mitteilung wird über die Beobachtung berichtet, die im Laufe der Fermentationen mit dem in unserem Institut isolierten Aspergillus niger-Stamm gemacht wurden. Bei diesen Fermentationsprozessen wurden gleichzeitig an zwei Stellen, an Kohlenstoffatomen 11-α und 21 des Progesterons Hydroxylgruppen eingeführt. Ausser dem enstandenen Epicorticosteron traten auch andere, stärker polare Stoffe auf. Von diesen gaben einige mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) eine positive Farbenreaktion, während sich diese Reaktion bei anderen als negativ erwies. Die Anwesenheit der letzteren konnte mit Papierchromatographie durch Anwendung von phthalsaurem p-Phenylendiamin als Indikator [7] nachgewiesen werden.

Bei der Identifizierung der im Laufe der Fermentation entstandenen Produkte stützten wir uns teilweise auf papierchromatographische, teilweise auf präparativ chromatographische Angaben. Das zustande gekommene 11-Epicorticosteron wurde in kristalliner Form isoliert und die gemessenen Werte des Schmelzpunktes sowie des spezifischen Drehungsvermögens wurden mit den Literaturangaben verglichen identifiziert.

Experimenteller Teil

A) *Mikrobiologische Methoden*

Der verwendete Stamm war der im Institut zur Zitronensäureproduktion isolierte Organismus *Aspergillus niger* **47.** Der Stamm wurde durch monatlich vorgenommene Überimpfungen auf Bierwurzeagar erhalten. Die von diesem Nähragar bereitete Sporensuspension diente als Impfstoff bei Impfung der Schüttel- bzw. Fermentorkulturen. Die Menge des Impfstoffes betrug 1 Vol%, die Sporenzahl in der benutzten Sporensuspension 150 000—200 000/μl.

Bei Schüttelkulturen wurden 100 ml Nährboden in Erlenmeyerkolben von 500 ml, bei Fermentorversuchen 5 l Nährboden in Laboratoriumsglasfermentoren von 10 l verwendet. Erstere wurden bei 120° C 15 Minuten lang, letztere bei derselben Temperatur 40 Minuten lang sterilisiert. Auf dem Schüttelgerüst in den Kolben betrug das Ausmass der O_2-Absorption mit der Sulphitmethode gemessen [8] 6 mM/l/Std., in den Fermentoren hingegen 14 mM/l/Std. Die Züchtung wurde bei 28° C durchgeführt.

Zu 100 ml Nährboden wurden 20 mg Progesteron gegeben, letzteres in Aceton gelöst, durch Seitzfilter filtriert und steril zu den Kulturen hinzugefügt.

B) *Isolierung der Oxydationsprodukte*

Das Fermentat wurde vom Myzelium durch Filtrieren getrennt, das Myzelium mit Aceton und dann mit Chloroform gewaschen. Der mit der Waschflüssigkeit vereinigte Fermentsaft wurde mit Chloroform von gleichem Volumen extrahiert, wobei das Chloroform in drei gleichen Teilen zugefügt wurde. Die vereinigten Extrakte wurden mit 0,1 n Salzsäure von 1/10 Volumen, 2%iger $NaHCO_3$-Lösung und schliesslich mit destilliertem Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und bei vermindertem Druck eingedampft. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen, eine Menge von etwa 400 γ auf Papier getropft und mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) untersucht. Eine positive Farbenreaktion weist auf die Anwesenheit einer Oxygruppe in 21-Stellung hin. 100 γ Cortexonlösung wurden ebenfalls auf das Papier gebracht so dass aus dem Vergleich der Farbenintensitäten auch auf das Ausmass der Umwandlung gefolgert werden konnte.

C) *Ergebnisse*

Der von uns isolierte zitronensäureproduzierende Stamm sowie die international bekannten Stämme 72—4 und 72—2 wurden in jener Beziehung untersucht, ob sie das Progesteron in eine mit TTC reagierende Verbindung verwandeln. Die Untersuchung der Fermentate ergab, dass lediglich der von uns isolierte Stamm auf TTC reagierende Flecke aufwies. (In den erwähnten Versuchen wurde das Progesteron den gut entwickelten Kulturen in je Liter 10 g Glucose und 20 g Maisquellwasserkonzentrat enthaltender wässriger Nährlösung zugegeben. Die Züchtung wurde nach Zugabe des Progesterons noch vier Tage lang fortgesetzt.) Danach wurden die Versuche in bezug auf die Möglichkeiten der Veränderung der Fermentationsverhältnisse nur mit unserem eigenen Stamm

Tabelle I

Einfluss der Zusammensetzung des Nährbodens auf die Produktion einer mit TTC reagierenden Verbindung

Zusammensetzung und pH des verwendeten Nährbodens	pH beim Abstellen	Farben-intensität
1. Bier	3,34	+
2. 10 g Glucose 10 g Maisquellwasserkonzentrat 5 g Casamin je 1000 ml Leitungswasser, pH = 7	3,47	+++
3. 1000 ml Hefeextrakt + 10 g Glucose, pH = 6	4,38	++++
4. 5 g Maisquellwasserkonzentrat, 5 g Casamin, 50 g Glucose je 1000 ml Leitungswasser, pH = 6	2,67	—
5. 50 g Pepton, 60 ml Hefeextrakt, 5 g Glucose, 12,8 ml Fleischextrakt je 1000 ml Leitungswasser, pH = 7 ..... (Bemerkung: Das Wachstum des Myzels war sehr schwach.)		—
6. 5 g Sojamehl, 20 g Glucose, 5 g NaCl, 5 g KH_2PO_4, 10 ml Hefeextrakt je 1000 ml Leitungswasser, pH = 6,5	2,51	+++
7. 20 g Malzextrakt,* 10 g Pepton je 1000 ml Leitungswasser	3,17	++++
8. 50 g Glucose, 0,5 g KH_2PO_4, 2,5 g Na_2SO_4, 1 g KNO_3 je 1000 ml destilliertes Wasser	1,86	++
9. 10 g NH_4NO_3, 10 g Glucose, 20 g Maisquellwasserkonzentrat je 1000 ml Leitungswasser, pH = 6	3,50	++
10. 1 g Ammoniumtartarat, 0,25 g $MgSO_4$, 0,50 g K_2HPO_4, 0,25 g KCl, 0,005 g $FeSO_4$, 25 g Glucose, 5 g Maisquellwasserkonzentrat je 1000 ml Leitungswasser, pH = 5	2,32	+

Zeichenerklärung: die Anzahl der Kreutze zeigt die mit TTC erhaltene Farbenintensität an. Vier Kreuze bedeuten eine 25—30%ige Umwandlung

* Die Veränderung der Konzentration beider Komponenten hat die Ausbeute nicht erhöht.

vorgenommen. Die Untersuchungen sind in den Tabellen I, II, III und IV zusammengefasst.

Tabelle II

Bestimmung des Zeitpunktes der Verabreichung und Umwandlungszeit
(Den 1- und 2tägigen Kulturen des Nährbodens Nr. 7 wurde Progesteron zugegeben und die Fermentation verschieden lange fortgesetzt.)

Verwendeter Nährboden	Alter der Kultur bei der Zugabe von Progesteron	Zeitpunkt der Abstellung der Fermentation	pH beim Abstellen	Farbenintensität
7.	2tägig	24 Stunden	2,61	++
	2tägig	48 »	2,89	+++
	2tägig	72 »	4,06	++++
	2tägig	96 »	4,00	++++
	2tägig	120 »	4,10	++
	1tägig	24 »	3,33	+
	1tägig	48 »	2,27	++
	1tägig	72 »	2,83	+++

Tabelle III

Bestimmung der optimalen Substratmenge
(Der 2tägigen Kultur des Nährbodens Nr. 7 wurde Progesteron in wachsender Menge zugegeben, jeweils in 1 ml Aceton gelöst.)

Verabreichtes Progesteron mg		pH beim Abstellen	Farbenintensität
1.	10	2,78	+++
2.	20	2,85	++++
3.	50	2,90	++
4.	100	2,87	+

Nach Impfung mit einer aus von 6 Tage bis 3 Monate alten Kultur bereiteten Sporensuspension blieb die Wirkung stets gleich.

Laut der besprochenen Beobachtungen erhält man also die meisten mit TTC reagierenden Produkte, wenn der auf Nährboden Nr. 7 gezüchteten 2tägigen Kultur 20 mg Progesteron zugegeben werden und 3 Tage später der Versuch abgestellt wird.

Tabelle IV

Resultate bei verschiedenen pH Werten des Fermentats
Nährboden N° 7

pH-Wert bei der Verabreichung	pH beim Abstellen	Farbenintensität
Einstellung mit Zitratpuffer:		
2,27	2,62	+++
2,98	2,86	+++
3,72	3,58	+++
4,50	4,00	+++
Kontrolle 2,17	3,33	++++
Einstellung mit Phosphatpuffer:		
1,64	1,90	++++
1,42	1,62	++++
1,12	1,28	+++
1,05	1,14	+
Kontrolle 1,88	3,19	++++

Auf Grund dessen wurden in Schüttelkultur 3,8 l Fermentat bereitet und nach Zugabe sowie Umwandlung von 760 mg Progesteron die Isolierung der entstandenen Produkte versucht. Nach Verarbeitung des Fermentats laut der besprochenen Methode ergab das rohe Extrakt eine positive Farbenreaktion mit TTC. Bei der papierchromatographischen Untersuchung (im Propylenglykol-Toluolsystem) wurden als Kontrolle Cortexon, sowie für diesen Zweck aus 11α-Oxyprogesteron mit *Aspergillus niger* dargestelltes 11α-21-Dioxyprogesteron enthaltendes Extrakt angewendet. Die Chromatogramme wurden mit einer 1%igen alkalischen, wässerigen TTC-Lösung entwickelt. Das Reagens wurde vor der Verwendung frisch bereitet : 0,1 g TTC wurde in 5 ml Wasser gelöst und mit 5 ml n NaOH verdünnt. Cortexon trat nicht einmal in Spuren auf, es war hingegen ein bedeutend stärker polares, mit TTC eine positive Reaktion ergebendes Produkt nachweisbar. (Dies konnte später als 11α-21-Dioxyprogesteron identifiziert werden.) (Abb. 1)

Im selben System, aber als Kontrolle Progesteron, 11α-21-Dioxyprogesteron und 11α-Oxyprogesteron benutzend, wurde als Indikator eine 85%ige Isopropanollösung von phthalsaurem p-Phenylendiamin verwendet (8,3 g Phthalsäure in 425 ml Isopropylalkohol und 2,4 g p-Phenylendiamin in 75 ml dest. Wasser).

Auf Grund des letzteren Chromatogramms war festzustellen, dass das Ausgangsprogesteron im Laufe der Fermentation völlig verschwand und dass neben dem wenigen 11α-Oxyprogesteron eine mit TTC reagierende, stärker

polare Substanz, ein später als 11α-21-Dioxyprogesteron identifiziertes Produkt anwesend war (Abb. 2).

Danach wurde das 1,10 g Rohextrakt auf Brockmanschem aktivem Al_2O_3 chromatographiert. Das Extrakt wurde in 60 ml Benzol gelöst auf die aus 30 g Al_2O_3 bereitete Säule aufgetragen, mit 4×50 ml Benzol, 4×50 ml Äther, sodann mit den Gemischen von 45 ml Äther + 5 ml Äthylacetat, 35 ml Äther + + 15 ml Äthylazetat, 25 ml Äther + 25 ml Äthylazetat, 35 ml Äthylazetat + 15

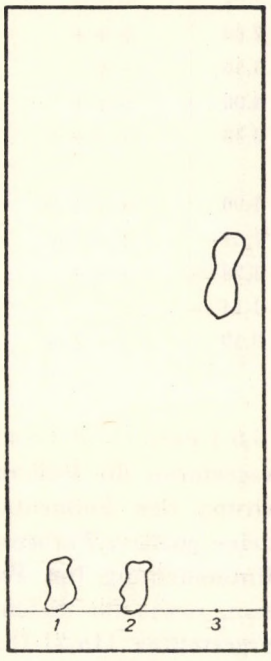


Abb. 1

1. Epicorticosteron Rohextrakt = = 15/a 400 γ *2.* A/17 330γ *3.* Cortexon 100 γ Entwicklungszeit: 8h

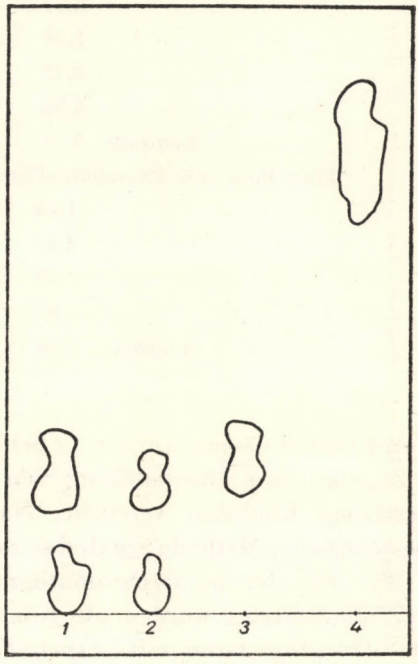


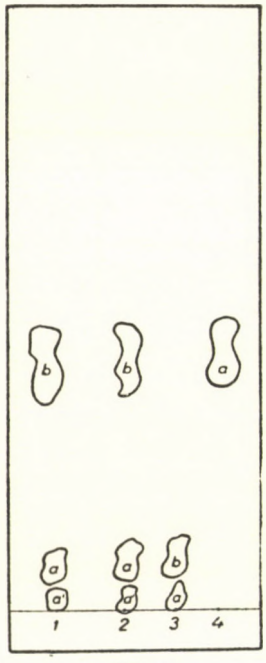
Abb. 2

1. 15/a Rohextrakt des Epicorticosterons 400 γ *2.* A/17 330 γ *3.* 11α-Oxyprogesteron 100 γ *4.* Progesteron 100 γ

ml Äther und schliesslich zweimal mit 50 ml Äthylazetat eluiert. Insgesamt wurden 1,050 g des Stoffes zurückgewonnen. Die einzelnen Fraktionen des Chromatogramms wurden durch Tropfreaktion mit TTC bzw. phthalsaurem p-Phenylendiamin auf Papier untersucht. Die Fraktionen 1—6 (der gesamte Trockenrückstand betrug 0,2526 g) ergaben mit TTC und phthalsaurem p-Phenylendiamin eine negative Reaktion, die von der völligen Umwandlung des Progesterons zeugte. Dies bestätigten auch die papierchromatographischen Untersuchungen der einzelnen Fraktionen. Die Fraktionen 7—14 ergaben mit TTC eine positive Reaktion, und zwar die Fraktionen 11 und 12 die intensivsten. Die einzelnen Fraktionen papierchromatographisch untersuchend, erschien in

den Fraktionen 7 und 8 neben 11α-21-Dioxyprogesteron ein stärker polarer und mit TTC negativ reagierender Fleck, der in dem mit phthalsaurem p-Phenylendiamin indizierten Chromatogramm gut wahrnehmbar war (Abb. 3 und 4).

Dasselbe Muster zeigte im Propylenglykol-Toluolsystem, neben Cortexon und Epicorticosteron entwickelt, die Anwesenheit des 11α-21-Dioxyprogesterons ohne Erscheinen des Cortexons.



Der Buchstabe *a* bedeutet die intensiveren Flecke.

Der Buchstabe *a'* bedeutet die intensiveren Flecke, die mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) Reagens negative Reaktion geben.

Der Buchstabe *b* bedeutet die matteren Flecke.

Abb. 3

1. 15/a = der Rohextrakt des Epicorticosterons 400 γ
2. A/17/7 400 γ *3.* A/17/8 400 γ
4. 11-α Oxyprogesteron 100 γ
Entwicklungszeit: 8^h

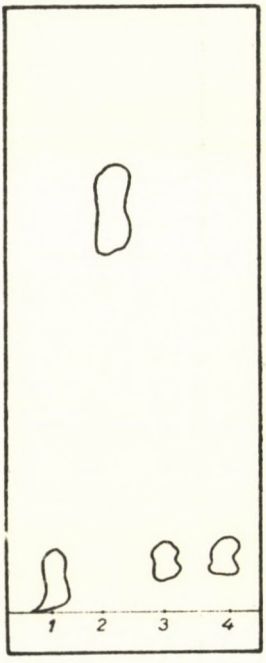


Abb. 4

1. 15/a = Rohextrakt 400 γ des Epicorticosterons
2. Cortexon 200 γ
3. Fraktion A/17/7 200 γ
4. Fraktion A 17/8 200 γ

Auch die Fraktionen 9, 10, 11, 12, 13 und 14 wurden papierchromatographisch geprüft. Sämtliche Fraktionen wurden parallel in zwei Chromatogrammen untersucht. Im ersten Chromatogramm wurde neben den Kontrollstoffen auch Cortexon und Epicorticosteron im Propylenglykol-Toluolsystem entwickelt. Als Epicorticosteron wurde ein Rohextrakt des durch mikrobiologische Oxidation überwandelten 11α-Oxyprogesterons verwendet = 15/a und als Indikator TTC benutzt. Im parallelen Chromatogramm wurden neben dem zu prüfenden Muster auch 11α-Oxyprogesteron und 11α-21-Dioxyprogesteron = = 15/a entwickelt. Danach wurde das Chromatogramm mit phthalsaurem p-Phenylendiamin entwickelt.

In keiner der angeführten Fraktionen war Cortexon anwesend, in allen waren 11-Epicorticosteron und ein an der Ausgangsstelle verbleibender, mit TTC positiv reagierender Fleck nachweisbar, sowie in einzelnen Fraktionen, z. B. in der 7. auch 11α-Oxyprogesteron.

Die mit TTC positiv reagierende, reichste Fraktion 11 (0,1897 g) wurde aus Äthylazetat durch Zugabe von Hexan kristallisiert. Die Kristalle wurden mit einem Gemisch von wenigem Hexan und Äthylazetat gewaschen und in

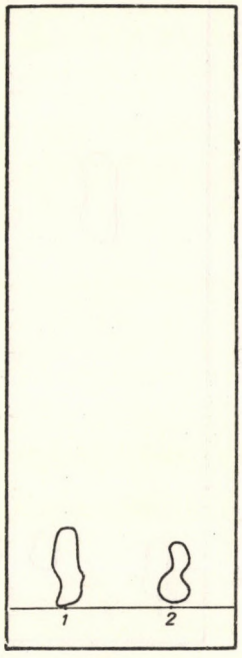


Abb. 5

1. Kristallinisches Epicorticosteron 100 γ
2. A/17/11 Fraktion 100 γ
Entwicklungszeit: 7.5^h

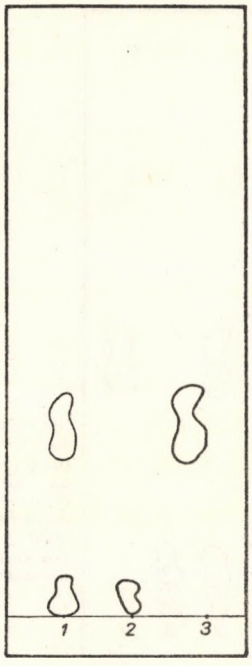


Abb. 6

1. 15/a Rohextrakt 400 γ des Epicorticosterons
2. A/17/11 Krist. Epicorticosteron aus Fermentlösung 200 γ
3. 11α-Oxyprogesteron 100 γ

der Vakuumpistole bei 61° C getrocknet. Die Ausbeute war 16,4 mg bei 153—154° C schmelzendes kristallines Produkt. Spezifisches Drehungsvermögen: $[\alpha]_D = +163°$ (c = 0,6, in Alkohol). Nach Literaturangaben ist der Schmelzpunkt des Epicorticosterons 150—155° C, sein spezifisches Drehungsvermögen $[\alpha]_D = +165°$ (c = 0,8, in Alkohol) [2]. Auch die papierchromatographische Untersuchung bestätigte die Identifizierung des isolierten 11-Epicorticosterons (Abb. 5 und 6). Ein ähnliches Resultat ergab sich bei den Fermentationen in Glasfermentoren von 10 l. In diesen war das Substrat 1 g Progesteron in 5 l Fermentat. Hier gelang es ebenfalls, durch Chromatographie an Al_2O_3-Säule das entstandene Epicorticosteron anzureichern und als Kristalle zu isolieren.

Die Angaben der chromatographischen Untersuchungen stimmten mit denen von Schüttelkulturen überein.

Mit 17α-Oxyprogesteron sowie 16-,17-Oxydoprogesteron als Substrat konnten in Schüttelversuchen keine mit TTC reagierenden Flecke erhalten werden.

*

An dieser Stelle wollen wir unseren Mitarbeitern Frl. I. ANDRÁSSY und Frl. E. MAJOR für ihre wertvolle Hilfe bei den Versuchen unseren Dank aussprechen.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe des in unserem Institut zur Erzeugung von Zitronensäure isolierten *Aspergillus niger* Stammes 47 wurde aus Progesteron in einer Stufe 11-Epicorticosteron dargestellt. Der Stoff wurde in Kristallform isoliert und auf Grund des Schmelzpunktes, Drehungsvermögens sowie mit Papierchromatographie identifiziert.

Diese Umwandlungsfähigkeit ist keine gemeinsame Eigenschaft aller *Aspergillus-niger*-Stämme, es gibt solche, die vom Standpunkt der Biooxydation aus völlig inaktiv und solche, die zur Einführung nur der einen Hydroxylgruppe (z. B. in 11α-Stellung) geeignet sind.

Die Umwandlung mit Hilfe des Aspergillus niger-Stammes (7) führt nicht zu einem einheitlichen Produkt; ausser dem 11-Epicorticosteron entstehen auch andere, noch stärker polare Stoffe.

LITERATUR

1. PETERSON, D. H., MURRAY, H.: J. Amer. Chem. Soc. **64**, 1871 (1952).
2. FRIED, J., THOMA, R. W., et al.: J. Amer. Chem. Soc. **64**, 3962 (1952).
3. SHULL, R., SARDINAS, G. M., et. al.: Can. Patent 507.009 (2. Nov. 1954).
4. WIX, G., BODÁNSZKY, A., KOLLONITSCH, J.: Acta Microbiol. Hung. **3**. 333. 1956.
5. MEYSTRE, CH., VISCHER, E., WETTSTEIN, A.: Helv. Chim. Acta **36**, 1548 (1954).
6. ZAFFARONI, A., CASAS CAMPILLO, C., CORDOBA, F., ROSENKRANTZ, G.: Exper. **11**, 219 (1955).
7. BODÁNSZKY, A., KOLLONITSCH, J.: Nature **175**, 727 (1955).
8. COOPER, C. A., FERNSTROM, G. A., MILLER, S. A.: Ind. and Eng. Chem. **36**, 504 (1944).

THE FIRST ISOLATION OF H. PARAPERTUSSIS IN HUNGARY*

By

É. KENDE, K. BORBÉLY, E. CSERENYEI and I. RING

Institute of Hygiene, University Medical School, Budapest

(Received January 31, 1956)

In 1937 and 1938 respectively the American authors BRADFORD and SLAVIN[1], and ELDERING and KENDRICK[2] found in bacteriological studies of children suspected of suffering from whooping cough that in some cases not the classical *H. pertussis*, but a similar microorganism grew on culturing. The latter organism differed from *H. pertussis* in that it produced pigment during growth in different media. ELDERING and KENDRICK have suggested the term *B. parapertussis* to denote this microorganism. Like most authors, we use the name *H. parapertussis*.

During the 18 years that elapsed since the first reports it has been demonstrated that *H. parapertussis* occurred not only in the United States of America, where after the first reports other authors (LAWSON [3], MILLER [4], ZUELZER and WHEELER [5]) detected its presence too, but also in many other countries. The occurrence of the microorganism has been reported from Mexico [6], England (CRUICKSHANK and KNOX [7], LACEY [8], Medical Research Council [9]), France (SOHIER and FAUCHET [10]), Japan (YOSHINO [11]), Denmark (MILLER [12]) and Czechoslovakia (SYRUCEK et al. [14]). The number of verified parapertussis cases described in the literature is estimated at around 650. Of these, more than 400 strains have been isolated in Denmark, where in the period 1950—52 a very extensive epidemic of parapertussis took place. About 100 strains have been isolated in the United States of America, nearly 50 in Czechoslovakia, while from the other countries mentioned above a few cases have only been reported.

At our institute, bacteriological studies of pertussis-suspect cases have been made for a few years. In the light of the data in the literature it seemed interesting to raise the question whether parapertussis infection occurs in Hungary. To our knowledge, such studies have not been carried out in this country, and no report dealing with the problem has been published in Hungarian scientific literature. We have, however, understood from a personal communication that in 1943 ÚJHELYI and PÁLÓCZY had isolated two strains of *H. parapertussis* from a mother and her child.

* Lecture delivered at the Microbiological Congress, November, 1955.

Methods

In order to isolate *H. parapertussis* strains, pertussis or parapertussis-suspect colonies from routine cough-plates were inoculated on BORDET-GENGOU medium and, even in the first subculture on common agar. In the BORDET-GENGOU medium the pigment production so characteristic of *H. parapertussis*, and in the common agar medium the typical growth of the microorganism were studied. The suspected strains were then subjected to informative pertussis and parapertussis agglutination tests. The investigations were begun January 1, 1955, and until December 31, 1955, a total of 849 cough tests was carried out in cases suspect of pertussis. By this method we have succeeded in isolating *H. parapertussis* strains from children suspected of having pertussis on the basis of clinical symptoms and signs.

Results and discussion

From the 849 patients, *H. pertussis* grew in 132, and *H. parapertussis* in 8 cases, while in 1 case *H. pertussis* and *H. parapertussis* were isolated simultaneously from the same child.

In spite of the small number of our cases it seems that parapertussis infection is not uncommon in Hungary. The above figures mean a parapertussis-pertussis ratio of 6 per cent, a value comparable with the pertaining data from other countries. These have namely been estimated in the literature to vary from 2 to 32 per cent: according to the 15 years' experience of ELDERING and KENDRICK [15], 2 per cent; according to Miller [4], 5 per cent; according to LACEY [8], 12 per cent.; and according to CRUICKSHANK and KNOX [7], 32 per cent. In Denmark, where the extensive parapertussis epidemic mentioned above had taken place and where the number of parapertussis cases was estimated at several thousands, even at the peak of the epidemic the number of verified *H. parapertussis* strains was a mere 23 per cent of the number of pertussis strains isolated at the same time (LAUTROP, [13]).

The age of the patients with parapertussis we have examined ranged between 4 months and 8 years. In four patients the clinical symptoms suggested very mild pertussis. In 4 other cases even this could not be spoken of, since all they had was a mild, catarrhal disease of 2 or 3 weeks' duration, believed to be a banal common cold, without paroxysmal cough, whooping and vomiting. This is in agreement with the reports from other countries (LAUTROP [13], ELDERING and KENDRICK [15]). For example, among the 135 cases of parapertussis described by LAUTROP [13] there were only 4, in which bronchopneumonia was about to develop. Antibiotic treatment prevented the development of bronchopneumonia, and other complications were totally absent. The only report in the literature on lethal parapertussis is that on two cases by ZUELZER and WHEELER [5]. As regards the course of the disease, one of our patients, a girl of 7 years, was an exception in our patient material. She had simultaneously parapertussis and pertussis. The clinical picture was that of an exceptionally grave whooping cough, with long periods of convulsion and frequent episodes of paroxysmal cough.

In none of our patients (including the latter case) could we detect the presence of *H. parapertussis* after the third week of the disease.

The strains isolated by us were typical. Under the microscope, Gram-negative, non-motile bacilli were seen, which were longer and thinner than the coccobacillary *H. pertussis* organisms. In BORDET-GENGOU medium the colonies of *H. parapertussis* were larger than those of similarly aged *H. pertussis* and, especially in older cultures, they were surrounded by a thin, dark halo. In blood agar marked haemolysis was observed. Even the first subcultures grew well in common agar and produced brown pigment. The production of pigment, which is very typical of *H. parapertussis* in any medium, was the most marked in the BORDET-GENGOU medium modified by ENSMINGER [16], containing 0,1 per cent tyrosine. In this medium, pigment production was evident as early as after 24 hours of growth. As to the nature of this pigment, the opinions vary. According to BRADFORD [1], *H. parapertussis* would convert in some way the iron compounds of the medium, while ENSMINGER [16] believes that the tyrosinase enzyme of the pathogen would convert the tyrosine in the medium to melanin, and this would account for the typical colour: brownish in blood-free, greyish or blackish in blood-containing media. We have never observed *H. pertussis* to produce such a colour, thus this seems to be the most obvious distinctive property of *H. parapertussis*, making differentiation from *H. pertussis* possible even in routine bacteriological work.

Our parapertussis strains did produce urease and catalase, did not split sugars, did not produce indole, nitrate or H_2S, and did not liquefy gelatin.

Their sensitivity to chloramphenicol was 2 μg/ml, in contrast with the mean sensitivity value for the pertussis strains in Hungary, 0,75 μg/ml.

The strains agglutinated with parapertussis serum absorbed with *H. pertussis* up to the end titre, with non-absorbed pertussis serum at a low titre, and with pertussis serum absorbed with *H. parapertussis* not at all. This can be explained on the basis that pertussis and parapertussis strains have a common O-antigen, while they differ in the surface antigens (ANDERSEN [17]).

The epidemiological aspects of the problem will be dealt with in a future paper.

SUMMARY

1. Strains of *H. parapertussis* were isolated for the first time in Hungary.

2. Out of a total of 849 cough tests, *H. pertussis* was isolated in 132 cases, *H. parapertussis* in 8 cases, while in one case *H. pertussis* and *H. parapertussis* were isolated simultaneously from the same patient.

3. In each of our cases of parapertussis the clinical course was mild.

4. The isolated strains of *H. parapertussis* showed a typical behaviour in microbiological tests.

LITERATURE

1. BRADFORD, W. L., SLAVIN, B.: Amer. J. Publ. Health. **27**, 1277 (1937)
2. ELDERING, G., KENDRICK. P.: J. Bact. **35**, 561 (1938)
3. MILLER, J. J.: J. Pediat. **19**, 229 (1941) and Amer. J. Publ. Health **33**, 839 (1943)
4. ZUELZER, W. W., WHEELER, W. E.: J. Pediat. **29**, 493 (1946)
5. LAWSON, G. N.: cit. [2]
6. cit.: Dubos, R. J.: Bacterial and Mycotic Infections of Man 544, (1952)
7. CRUICKSHANK, J. C., KNOX, R.: cit. [13] p. 84.
8. LACEY, B. W.: cit. Cruickshank, J. C.: Brit. Med. J. II. 73 (1949)
9. Medical Research Council: Brit. Med. J. 1463 (1951)
10. SOHIER, R., FAUCHET, S.: Bull. Acad. Méd. **133**, 202 (1949)
11. YOSHINO, K.: cit.: [2]
12. MILLER, J. J.: cit. [13] p. 84.
13. LAUTROP, H.: Parapertussis, København. 228, (1954)
14. SYRUCEK, L., VYSOKA, B., SKVRNOVA, K.: Zbl. Bakt. Ref. **157**, 322 (1953)
15. ELDERING, G., KENDRICK, P.: Amer. J. Publ. Health **42**, 27 (1952)
16. ENSMINGER, P. W.: J. Bact. **65**, 509 (1953)
17. ANDERSEN, E. K.: Acta Path. Microbiol. Scand. **30**, 1, 54 (1952) and **32**, 2, 202 (1953)

DURCH ZERSTÄUBUNG MODIFIZIERTES HKB-VERFAHREN UND SEINE WEITERE VERWENDUNG FÜR ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE PRÄPARATIVZWECKE

Von

B. LOVAS

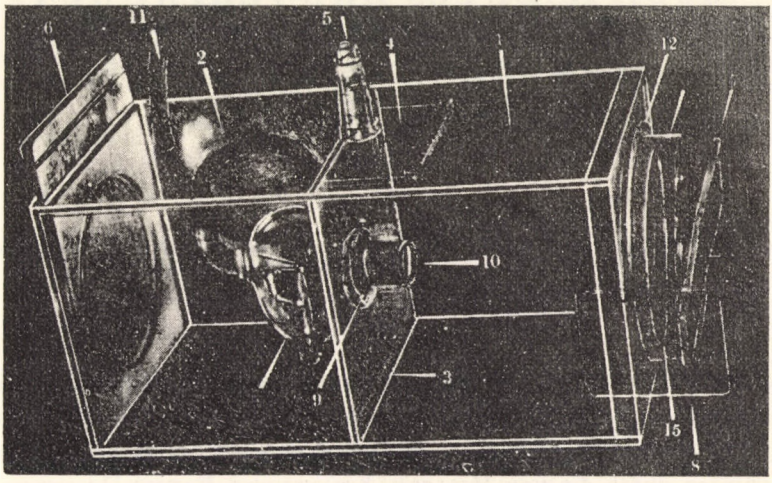
Elektronenmikroskopisches Laboratorium des Instituts für Messtechnik und Instrumentenwesen der Ungarischen Akademie der Wissenschaften

(Eingegangen am 15. Februar 1956)

Die Entwicklung der elektronenmikroskopischen mikrobiologischen Präparativverfahren spiegelt den ständigen Wunsch der Forscher wider, die grösstmögliche Objekttreue und Klarheit der Aufnahmen zu erreichen. Diese Bestrebungen wurden durch die von HILLIER, KNAYSI und BAKER [1] ausgearbeitete, nach den Anfangsbuchstaben der Autoren HKB-Verfahren genannte Membranzüchtungsmethode verwirklicht bzw. durch das von KELLENBERGER [2, 3] modifizierte, sog. Filtrationsverfahren. Wie bekannt, bestehen diese im wesentlichen darin, dass die Bakteriensuspension auf eine Kollodiummembran, die auf die Oberfläche der entsprechende Nährstoffe enthaltenden Agarplatte angebracht werden muss, geträufelt und die Tropfen mittels eines gebogenen Glasstäbchens auf der Membran ausgebreitet werden. Die Bakterien verschaffen sich mittels Osmose und Diffusion durch die Kollodiummembran ihre Nahrung. Diese Ernährungsweise ist bei den meisten Bakterien und Pilzen befriedigend. Ein ausserordentlicher Vorteil dieses Verfahrens ist, dass das erhaltene Präparat keine Nährbodenverunreinigungen enthält, ferner, dass es nicht selektiv ist und eine vollkommene topographische Orientierung bietet.

Die Methode hat jedoch einen schwachen Punkt, weshalb die Präparate nicht immer gelingen. Wegen ihrer lyophoben Natur kann die Kollodiummembran nur schlecht befeuchtet und auf ihr die wässrige Aufschwemmung schwer ausgebreitet werden. Hinsichtlich dieses Mangels helfen die durch die Fachliteratur empfohlenen, die Oberflächenspannung vermindernden Stoffe nicht viel. Die dünne Membran wird oft bereits von den mit der Pipette angebrachten Tropfen durchgerissen. Dies geschieht besonders häufig bei Ausbreitungsversuchen, und die Suspension fliesst unter die Membran. Der Ausgang des Präparierens ist daher unsicher, ausserdem kann man bei solcher Ausbreitungsart die Fläche der Petrischale nicht gut ausnutzen, weil die Flüssigkeit die Membran nicht gleichmässig bedeckt, da sie sich zurückzuziehen und Insel zu bilden vermag.

Diese Unsicherheit regte zu einer besseren Lösung des Ausbreitungsproblems an, die in Form von Zerstäubung gefunden werden konnte. Im Falle von



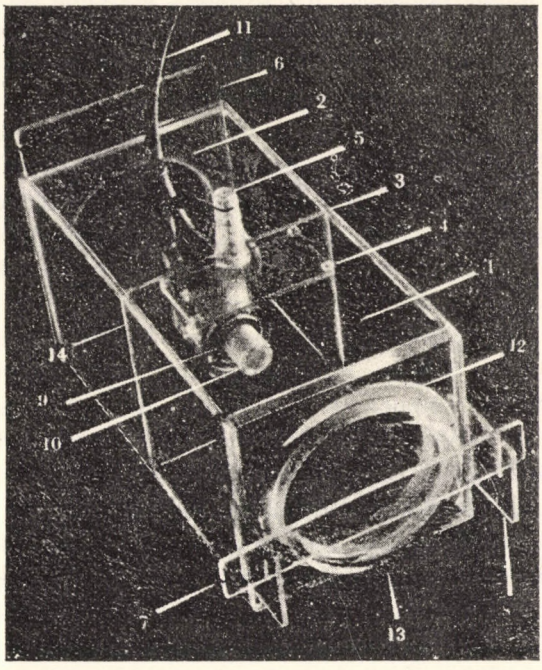


Abb. 1a und *1b*. 1. Zerstäubungsraum; 2. hintere Kammer; 3. Trennungswand; 4. Tropfenfänger; 5. Saugrohr; 6. verschiebbare Platte; 7. die Petrischale anpressender Plexiglasstreifen; 8. Halter des anpressenden Plexiglasstreifens; 9. Verdichtungsgummiring; 10. Öffnung des Glaszerstäubers; 11. Gummirohr des Glaszerstäubers; 12. flacher Gummiring; 13. Petrischale; 14. Körper des Glaszerstäubers; 15. 1 cm hoher Rand

lebendem mikrobiologischem Material erfolgt dies naturgemäss in einer vollkommen geschlossenen Einrichtung. Selbst hierbei bietet lediglich die Zerstäubung durch Vakuum im Innern des Apparates eine in jeder Hinsicht beruhigende Lösung. Der äussere grössere Druck verhindert nämlich das Hinausgelangen des zerstäubten Materials in die Umgebung. Beim Präparieren von leblosem Material — wie es später besprochen wird — kann natürlich auch Zerstäubung durch Überdruck angewendet werden.

Beschreibung und Betrieb des Apparates

Der Apparat ist ein aus Plexiglasplatte verfertigter Kasten (Abb. la und 1b), der in der Mitte durch eine Platte in zwei gleiche Kammern geteilt wird. In der Öffnung, die in der Mitte dieser Platte liegt, befindet sich ein gut schlie-

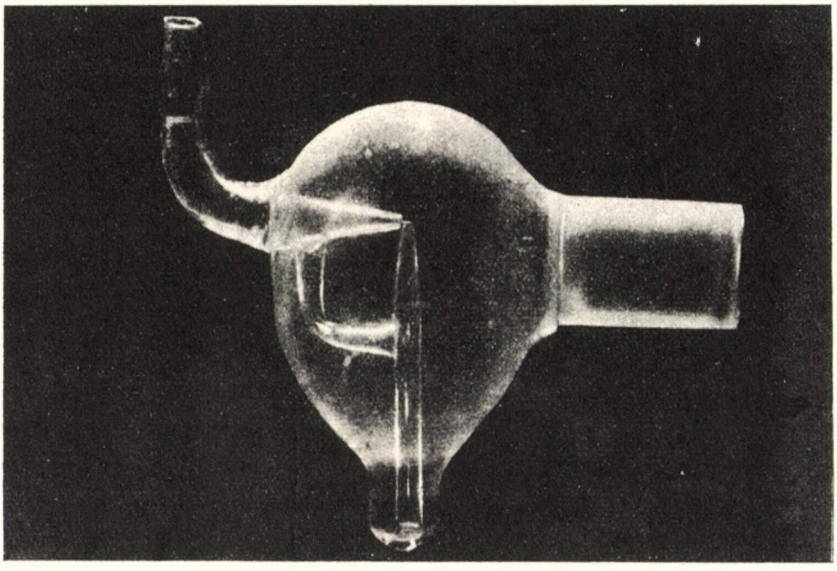


Abb. 2. Glaszerstäuber

ssender Gummiring ; hierhin legt man den Hals des Glaszerstäubers (Abb. 2). In den Zerstäuber wird das auszubreitende Material durch die Öffnung des Zerstäubers mit einer Pipette eingebracht, sodann der Zerstäuber in den erwähnten Gummiring geschoben und dadurch werden die zwei Kammern voneinander luftdicht abgeschlossen. Das auf das Druckrohr des Glaszerstäubers gezogene Gummirohr wird durch die Öffnung im Deckel des Kastens hinausgeführt und auf sein Ende eine MOHRsche Klemme angebracht, sodann die hintere Kammer durch eine verschiebbare Platte abgeschlossen.

Die vordere Kammer ist der Zerstäubungsraum, deren runde Öffnung mit einem Durchmesser von 8 cm aussen von einem 1 cm hohen Rand umgeben wird. Dieser beschützt den Rand der Petrischale vor den Tropfen. Auf dem Rand befindet sich von aussen ein flacher und weicher Gummiring. Auf diesen legt man die Agarmembran enthaltende Petrischale, die durch einen gekrümmten elastischen Plexiglasstreifen, der in die Öffnungen der beiden an die Seiten



Abb. 3. Pulverisationseffekt (Fixiertropfen auf beleuchtetem lichtempfindlichem Papier)

des Kastens geklebten Tragplatten gefügt wird, auf den Gummiring luftdicht angepresst wird.

Der Apparat schliesst sich mittels eines auf das sich auf den Zerstäubungsraum öffnende Saugrohr gezogene Gummirohrs durch das mit Desinfektionslösung gefüllte Luftfiltriergerät der Wasserluftpumpe oder einer anderen Pumpe und einem Quecksilbermanometer an. Erreicht der Druck etwa 100 mm Hg, so lockert man die MOHRsche Klemme und lässt eine Zeitlang Luft in den Glaszerstäuber einströmen. Obwohl es bei der Ausbreitung keine besondere praktische Bedeutung hat, können von dem Druck und der Zerstäubungsdauer bzw. von der Entfernung zwischen dem Zerstäuber und Agarplatte abhängig kleinere oder grössere, selbständige oder zusammenfliessende Tropfen auf der Membranfläche erzeugt werden (Abb. 3 und 4).

Nach Beendigung der Zerstäubung werden die Arbeit der Pumpe und dadurch der niedrigere Druck des Zerstäubungsraumes weiterhin aufrechterhalten, nach einigen Minuten die Petrischale heruntergenommen und die Öffnung mit einer sauberen Petrischale sofort zugedeckt. Während der Abnahme der Petrisschale, die infolge des niedrigeren Druckes des Zerstäubungsraumes nur eine kleine Kraft beansprucht, vermag das im Zerstäubungsraum eventuell noch

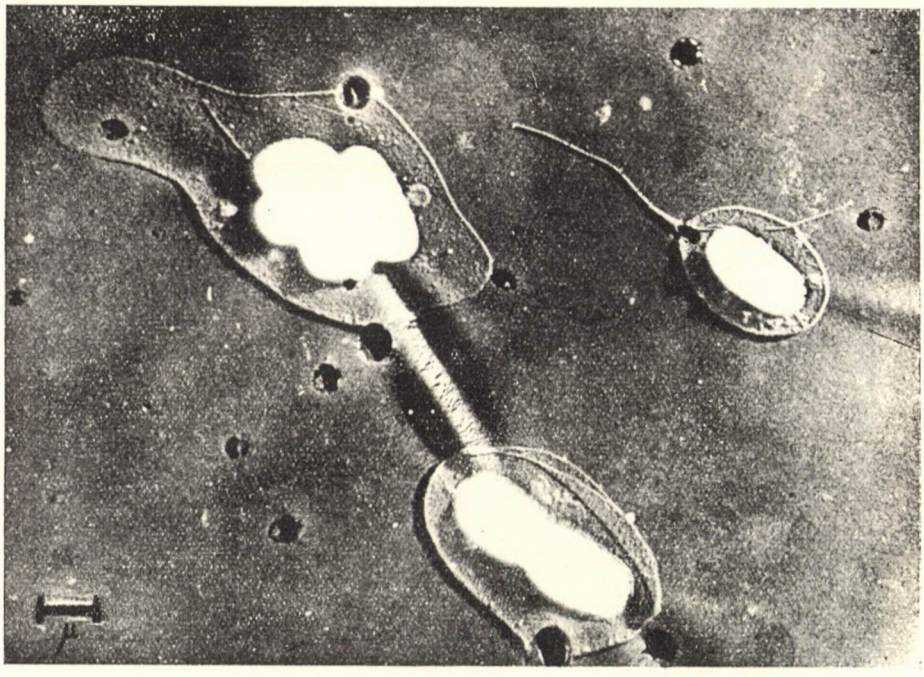


Abb. 4. Zerstäubte Salmonella-Bakterien in Mikrotropfen. Goldschattierung. 8200×

schwebende Material nicht in die Umgebung zu gelangen, da dies durch die in den Zerstäubungsraum strebende Luftbewegung verhindert wird.

Wird der Apparat nicht weiter benutzt, so hebt man nach aufhören des Vakuums auch den Glaszerstäuber heraus, verschliesst wieder den Kasten mit der verschiebbaren Platte und desinfiziert ihn durch Formalindampf. Wenn man verschiedene Stoffe nacheinander präparieren will, werden die Glaszerstäuber nur ausgewechselt und der Apparat am Ende der Arbeit desinfiziert. In gewissen Fällen muss man die längerwährenden Prozesse, z. B. die Phagenwirkung oder die Enzymwirkung, bis zu Ende verfolgen. Dann bleibt das Material im Glaszerstäuber und im Apparat, der — falls nötig — in den Zerstäubungspausen auch im Thermostaten gehalten werden kann, und es wird in den erwünschten Zeitabständen stets auf eine neue Platte zerstäubt.

Auf die beschriebene Weise erhielt man mit Bakterien, sprossenden Pilzen und Phagen stets tadellose Präparate, mit dem Vorteil, dass die ganze Fläche der Agarplatte gut ausgenutzt werden konnte.

Andere Präparativmöglichkeiten

Die Tatsache, dass die mit dem HKB-Verfahren bzw. mit dessen von KELLENBERGER modifizierter Variante bereiteten Präparate salzfrei sind und im Gegensatz zur Tropfmethode kein nachträgliches Waschen mit destilliertem Wasser



Abb. 5. Auf Agarplatte mit Kollodiummembran gestäubte Influenza-Viruspartikeln. Fixierung in Formalin, Goldschattierung. 9000×

benötigen, lenkte die Aufmerksamkeit darauf, dass man aus anderen biologischen Stoffen, die übrigens mit der einfachsten, sogenannten Tropfmethode präpariert werden, zur Vermeidung der osmotischen Schädigungen auch mit dem oben beschriebenen Verfahren Präparate darstellen könnte. Bei Eintrocknung der Tropfen wird die anfangs isotonische Salzlösung immer konzentrierter und kristallisiert sich schliesslich aus. Weder die Wirkung des Salzes, noch das Waschen mit destilliertem Wasser zur Entfernung dessen können als schonende Verfahren angesehen werden. Daher werden vor allem beim Präparieren von Virus- und Phagenaufschwemmungen, Geweben, Zellen und Zellkomponenten diese Stoffe auf einer auf einem 0,9% NaCl enthaltenden 2%igen Agars angebrachten

Membran zerstäubt. Auf diese Weise werden salzfreie Präparate gewonnen (Abb. 5). Die kontrastarmen Tropfen findet man leichter, wenn das Material vor der Zerstäubung mit chemisch indifferenten Indikatoren, eventuell zur Er-



Abb. 6. Polystyrol-Latex und Phag F_3 der *Pseudomonas pyocyanea* auf Agarplatte mit Kollodiummembran gestäubt (Pfeil: Tropfengrenze). Palladiumschattierung. 6200×

leichterung der Messung der Partikeln mit Polystyrol-Latex versetzt wird (Abb. 6).

Beim Präparieren von vorher fixiertem oder lebendem, aber nicht mikrobiologischem Material benötigt man keine Zerstäubung durch Vakuum; die Zerstäubung wird mittels Druck durch das auf den Glaszerstäuber gezogene Gummirohr vorgenommen.

ZUSAMMENFASSUNG

Das von Hillier, Knaysi und Baker ausgearbeitete, von Kellenberger modifizierte Membranzüchtungsverfahren wurde zur Vermeidung der Fehler bei Ausbreitung und zur besseren Ausnutzung der Fläche der Petrischale mit Zerstäubung kombiniert. Die Zerstäubung wird in einem vollkommen geschlossenen Apparat, bei lebendem mikrobiologischem Material durch atmosphärischen Druck unter dem Einfluss des im Inneren des Apparates erzeugten Vakuums vorgenommen und auf diese Weise das Hinausgelangen des Stoffes in die Umgebung verhindert. Bei leblosem mikrobiologischem Material oder bei anderen biologischen Stoffen erfolgt die Zerstäubung durch unmittelbaren Druck. Das Verfahren wird auch beim Präparieren biologischer und mikrobiologischer Materialien verwendet, bei welchen bisher die Tropfmethode benutzt wurde, da sich auf diese Weise die osmotische Schädigung des Präparates und das nachträgliche Waschen mit destilliertem Wasser vermeiden lassen.

LITERATUR

1. Hillier, J.—Knaysi, G.—Baker, R. S.: J. Bact. **56**, 569 (1948).
2. Kellenberger, E.: Ztschr. Wiss. Mikr. **6**, 408 (1952).
3. Kellenberger, E.: Sympos. Bacterial Cytology Rom, S. 45 (1953).

BIOLOGISCHE ABWEHR MITTELS VIRUS ZUR BEKÄMPFUNG DER HYPHANTRIA CUNEA DRURY

Von

J. SZIRMAI

Forschungsinstitut für Pflanzenschutz, Budapest

(Eingegangen am 2. März 1956)

Im Rahmen der biologischen Schädlingsbekämpfung gelangte die Bekämpfung der Raupen mittels Viren in grösserem Massstab zuerst in Ungarn, in den Wäldern der Karpaten, 1892 zur Ausführung. Laut Literaturangaben [4] konnte man die Raupen der Nonne *(Lymantria monacha)* durch die künstliche Verbreitung der »Wipfelkrankheit« (Polyederkrankheit) erfolgreich bekämpfen.

Im Jahre 1946, nach Feststellung mehrerer Polyederkrankheiten, wurde im Forschungsinstitut für Pflanzenschutz die Arbeit unter günstigen Aussichten begonnen, die sich die biologische Bekämpfung der Schädlinge mittels Viren zum Ziel setzte. Im Bericht über die geplanten Themen im Jahre 1947 wurden bereits die Infektionsvorversuche mit dem Polyeder des Ringelspinners *(Malacosoma neustria)* am Schwan *(Porthesia similis)* und an der Raupe des Grossen Kohlweisslings *(Pieris brassicae)* bekanntgegeben. Zugleich wurden auch die Ansichten mitgeteilt, auf welcher Grundlage der wirksame Virusstamm ausgewählt werden könnte.

Die ersten im Protokoll festgesetzten Untersuchungen die an Hyphantria Material durchgeführt wurden und die Feststellungen über den Polyedervirus erfolgten am 30. 6. 1952. Die einschlägigen Hinweise wurden in der im folgenden Jahr (1953) erschienenen Publikation des Instituts [5] veröffentlicht.

Das von da an eingesammelte Versuchsmaterial sollte 1955 bereits im Bereich der praktischen Bekämpfung verwendet werden, einstweilen allerdings im Rahmen von Laboratoriums- und Feldversuchen, um auf Grund der so erhaltenen Resultate und Erfahrungen in der Zukunft eine betriebsmässige Bekämpfung unternehmen zu können.

Ziel der Experimente war festzustellen, ob mit dem virösen Infektionsstoff (Körpersubstanz) der eingegangenen Raupen eine lethale Erkrankung an gesunden Raupen hervorgerufen werden kann, und ob diese ein Ausmass erreicht, das der Wirkung einer organisierten Schädlingsbekämpfung gleichkommt.

Die ausführlichen Versuche wurden mit virusverdächtigen Hyphantria-Raupen und-Puppen begonnen, die in den Jahren 1953 und 1954 eingesammelt worden sind. Die Untersuchungen umfassten etwa 150 Raupen und Puppen,

in welchen der für die Viruskrankheit charakteristische Polyeder festgestellt wurde (Abb. 1). Aus den Raupen wurden wässrige Verreibungen bereitet und durch das Lichtmikroskop die lichtbrechenden kristallförmigen Polyedergebilde mit abgestumpften Ecken festgestellt. Ähnliche Einschlusskörperchen sind auch in anderen an Viruskrankheiten gleicher Natur leidenden Raupen zu finden wie z. B. bei der Seidenraupe *(Bombyx mori)*, der Nonne *(Lymantria monacha)* oder dem Schwammspinner *(Porthetria dispar)*. Das Virus der drei letzten Viruskrankheiten wurde bereits eingehend untersucht, weniger bekannt ist indessen die Viruskrankheit der Hyphantria, die zwar CHAPMAN und GLASER

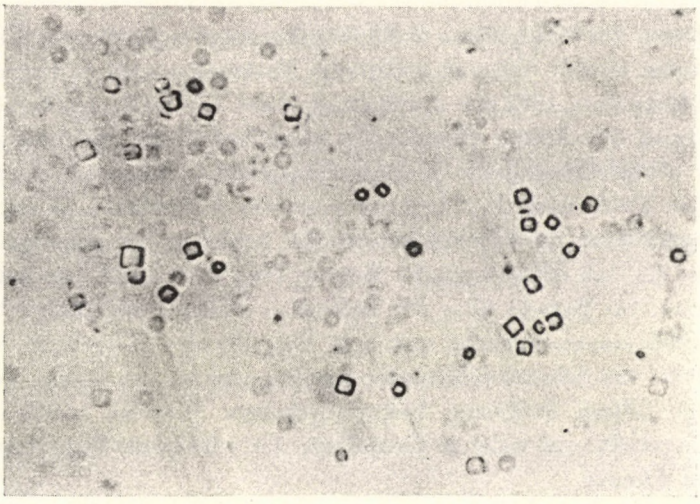


Abb. 1. Aus dem Gewebebrei der an Virose eingegangenen Hyphantria-Raupen stammende Polyeder. (Lichtmikroskopische Aufnahme, Vergrösserung 1350 ×)

[1] im Jahre 1915 erwähnt hatten, ausführlicher jedoch erst 1953 von VAGO und VASILJEVIC [7] auf Grund ihrer im Jahre 1952 durchgeführten Untersuchungen beschrieben wurde. Diese Verfasser stellten in den erkrankten Raupen die 2—5 μ grossen hexagonalen Polyeder fest, die für die Gattung Borrelina charakteristisch sind; sie führten auch die zu Bestimmung nötigen biologischen Reaktionen und histopathologischen Untersuchungen durch, stellten ferner in bezug auf die Einschränkung der Hyphantria durch Verbreitung des Virus gute Erfolge in Aussicht. In Ungarn wurde die elektronenmikroskopische Untersuchung des Virus von MACHAY und LOVAS [3] vorgenommen; auf Grund ihrer Untersuchungen im Jahre 1954 fanden sie die Grösse des Viruspolyeder gleich 2—3 μ und vermuteten die Zugehörigkeit desselben zur Gattung Borrelina. Laut eigener lichtmikroskopischer Untersuchungen beträgt das Ausmass der Polyeder 1,5—3,6 μ.

Infektionsversuche

Zu den Infektionsversuchen wurde die wässrige Verreibung von an Viruskrankheit eingegangenen Raupen verwendet. Die wässrige Aufschwemmung wurde bis zu einer Konzentration verdünnt, bei der in ein mikroskopisches Gesichtsfeld von 400facher Vergrösserung durchschnittlich 100 Polyeder gelangten.

Die Versuchsserien wurden in der Weise angeordnet, dass die Wirkung der Virusinfektion in allen Entwicklungsstadien des Tieres beobachtet werden konnte, d. h. vom Eizustand durch die Larvenstadien L_1—L_7 bis zur Verpuppung, sodann bis zum Ausschlüpfen des Schmetterlings bzw. zur Eiablage. Die Infektionsverhältnisse von Nachkommen viruskranker Eltern wurden ebenfalls untersucht wobei beide Glieder der Elternpaare (Vater und Mutter) gesondert berücksichtigt wurden. Der Einfluss bevorzugter und weniger bevorzugter Nährpflanzen auf die Gestaltung der Virusinfektion, die epidemiebedingende Wirkung der ungünstigen Umweltsverhältnisse sowie die spontanen Ansteckungsmöglichkeiten der Nachbarn und die Passagewirkung wurden gleicherweise studiert.

Sämtliche Laboratoriumsversuche wurden in Insektarien mit Drahtnetz vorgenommen.

Vor allem soll das Verhalten der aus dem Ei geschlüpften infizierten Raupen besprochen werden. Zu diesem Zweck wurden 150 Eier, noch vor ihrer Graufärbung (also nicht unmittelbar vor dem Ausschlüpfen), mit der oben erwähnten Virusaufschwemmung, die Kontrolleier hingegen mit Leitungswasser bepinselt. Bezüglich des Schlüpftermins war zwischen den infizierten und den Kontrolleiern kein wesentlicher Unterschied feststellbar. Nach dem Ausschlüpfen wurden die Raupen auf infektionsfreie Apfelblätter gesetzt. Die Raupengruppe, deren Eier mit Viren bepinselt wurden, ging nach 10 Tagen ein, während in der Kontrollgruppe kein einziges Tier einging. Nachdem es beobachtet wurde, dass sich die kleinen Raupen von der Eihülle ernährten, liegt es an der Hand, dass sie sich infolge dieser Ernährungsweise primär angesteckt haben und nicht bereits im Ei durch die Hülle angesteckt wurden.

Eine weitere Versuchsserie sollte das Verhalten der aus nichtinfizierten Eiern geschlüpften Raupen vom Stadium L_1 klären, welchen infiziertes Laub dargereicht wurde. 150 Eier wurden auf vorher mit Virusaufschwemmung bestreutes Laub gesetzt. Die bald ausgeschlüpften Raupen gingen nach 8 Tagen ein. Die Kadaver sowohl der im Eistadium als auch der durch die Nahrung infizierten Raupen enthielten reichlich Polyeder.

Zur Untersuchung der Ansteckungsmöglichkeiten durch Nachbarn lieferte der zuletzt beschriebene Versuch einen Stützpunkt. Ein Kontrollinsektarium stand 20 cm vom infizierten entfernt ; in dem ersteren trat eine Woche nach dem Eingehen der benachbarten, mit Viren angesteckten Kultur Viruskrank-

heit auf, und das Kontrollmaterial ging binnen zwei Wochen ebenfalls zugrunde. Die Kontrollraupen infizierten sich also spontan von den Raupen des benachbarten, mit Viren verseuchten Insektariums. Diese Erscheinung weist darauf hin, dass der Infektionsbereich des Virus ziemlich klein ist.

In den weiteren Experimenten wurden die Ansteckungsmöglichkeiten entwickelterer Raupen vom Stadium L_2—L_3 (0,5—1 cm) untersucht. Die Raupen wurden wie im vorigen Versuch auf mit Virusaufschwemmung bzw. bei den Kontrolltieren mit Wasser besprengtes Laub des Apfelbaumes gesetzt. Die Versuche wurden im allgemeinen mit 150 Raupen vorgenommen. Das Eingehen



Abb. 2. Die Raupen der virusinfizierten Weibchen (links) sind weniger entwickelt als die der gesunden (rechts). (Durchschnittliches Gruppenbild)

der kleineren Raupen erfolgte auch hier nach einer Woche, und war binnen 10 Tagen vollendet. Die Raupen krochen in den ersten 4—5 Tagen appetitlos herum, verzehrten wenig Laub und kamen dann an den Blättern, dem Gespinst oder an der Wand des Insektariums haftend um; ein Teil fiel zu Boden. Das charakteristische Hängenbleiben war nur bei grösseren, entwickelteren Raupen zu beobachten. Die eingegangenen Raupen waren voll von Polyedern, in geringerer Menge enthielt auch der Kot Einschlusskörperchen.

Die Infektionsversuche wurden an älteren Raupen im Entwicklungsstadium L_4—L_6 (2—2,5 cm) fortgesetzt. Auf dem mit Virusaufschwemmung infizierten Laub erkrankten diese Raupen erst später, ihr Appetit nahm jedoch schon am 4—5. Tag augenfällig ab, und von diesem Zeitpunkt an begannen sie auch einzugehen. Sie krochen in charakteristischer Weise umher, suchten sich Schlupfwinkel und bemühten sich, in Richtung der Decke des Insektariums weiterzukommen. Einige Tage lang hafteten sie, tödlich infiziert, kaum eine sichtbare Bewegung ausführend, charakteristisch »hängend«, an der Decke oder dem Laub der Nährpflanze (Abb. 3). Die in diesem entwickelteren Alter infizierten Raupen

gingen erst nach 2 Wochen ein. Im feuchten Luftraum lösten sich die Raupen schleimig auf, der schleimige Saft war anfangs bakterienfrei und enthielt lediglich Polyeder. In trockener Laboratoriumsumgebung trockneten die Raupen ein. Die Mortalität der Raupen war nicht 100%ig, 10—20% überlebten die Virusinfektion, doch blieb selbst unter diesen nicht jedes Individuum infektionsfrei. Im Laufe der Untersuchungen stellte es sich heraus, dass sie grössten-



Abb. 3. Die an Polyederkrankheit eingegangenen Raupenkadaver hängen mit dem Kopf nach unten auf den Wipfeln der Nährpflanze

teils Virusträger waren. Mehreren, scheinbar gesunden Raupen wurde mittels Kapillare Saft entnommen und untersucht. In den Saftproben fanden sich Polyeder, die in anderen Proben fehlten. Die trotz der Ansteckung am Leben gebliebenen Raupen verpuppten sich.

Lebensweise der infizierten Insekten

Im nächsten Versuch wurden die Verpuppungsverhältnisse der befallenen Raupen mit denen der gesunden verglichen.

Es wurden auf Kontrollaub gezüchtete L_6-Raupen erster Generation mit solchen, die infiziertes Laub erhielten und am Leben geblieben waren, verglichen. Die Raupen beider Versuchsserien verpuppten sich zur gleichen Zeit. Nach der üblichen Puppenruhe schlüpften in der Kontrollserie aus 73% der Puppen Schmetterlinge (aus 110 Puppen 80 Schmetterlinge), aus den befallenen Puppen jedoch nur 15% (aus 78 Puppen 12 Schmetterlinge), selbst von diesen

ging die Hälfte ein. Die am Leben gebliebenen drei Weibchen wurden mit gesunden Männchen gepaart. Diese Weibchen legten durchschnittlich 130 Eier, während das mit gesundem Männchen vereinigte gesunde Weibchen durchschnittlich 579 Eier gelegt hatte (Tabelle I). Aus den Eiern schlüpften Raupen aus.

Tabelle I

Zahlenverhältnisse der Eier aus virusinfizierten und gesunden Populationen stammender Schmetterlingseltern und Schlüpfverhältnisse der Raupen

Eltern aus virusinfizierter oder gesunder Population	Elternpaar	Zahl der Eier	Durchschnitt	Geschlüpft	Nach 3 Tagen am Leben	
					Insgesamt	Durchschnitt
Infiziertes Weibchen	1	120		120	59	
Gesundes Männchen	2	81	130	73	30	59
	3	189		188	89	
Gesundes Weibchen	1	625		622	622	
Infiziertes Männchen	2	523	585	522	522	599
	3	608		667	666	
Gesundes Weibchen	1	404		404	404	
Gesundes Männchen	2	830	579	828	828	578
	3	502		501	501	

Am bemerkenswertesten ist es jedoch, dass 50% der von der infizierten Mutter stammenden Raupen in 3 Tagen eingingen, bei den Kontrolltieren hingegen kein beachtenswerter Verlust vorlag. Es fiel ebenfalls auf, dass die Raupen aus den Eiern der verseuchten Mutter 3—4 Tage früher schlüpften als die aus den Kontrolleiern. Noch interessanter ist es, dass die am Leben gebliebenen Raupen der viruskranken Mutter durchschnittlich 1 mm kürzer waren als die gesunder Mütter, obzwar erstere einige Tage früher ausschlüpften (Abb. 2).

Im obigen Versuch stammten die Nachkommen von befallenen Weibchen und gesunden Männchen ; ausserdem wurden noch gesunde Weibchen mit aus der virusinfizierten Generation stammenden Männchen gepaart. In diesem Falle legte ein Weibchen durchschnittlich 585 Eier, d. h. mehr als das Vierfache deren das ein befallenes Weibchen setzte. Die geschlüpften Raupen entwickelten sich ebenso wie im Kontrollversuch, der Ausfall war unwesentlich, schliesslich verpuppten sie sich auch in der gleichen Weise.

Einfluss der ökologischen Verhältnisse

Nun wurde die Wirkung günstiger und ungünstiger Nährpflanzen auf die mit infiziertem und nichtinfiziertem Laub gefütterten Raupen untersucht. Zu diesem Versuch wurden L_2—L_3 Raupen verwendet, auf zweierlei Nährpflanzen,

auf einer bevorzugten, dem Apfel, und auf einer weniger bevorzugten, der Walnuss. Auf beiden Nährpflanzenarten wurden Raupen sowohl an mit Virusaufschwemmung bespritzten, als auch mit Wasser behandelten Pflanzen gezüchtet. Nach sechs Tagen war die Mortalität auf dem Kontrollapfelbaum 13%, auf dem mit Viren behandelten 22%, auf den Kontrollnussbaum 16,7% und auf dem mit Viren bespritzten 35%. Laut dieses Versuches war die Mortalität (35%) auf der ungünstigen Nährpflanze, d. h. auf der Walnuss, am stärksten, wodurch die Tatsache bewiesen wurde, die übrigens auch für andere Insektenviren als Regel zu betrachten ist, dass die ungünstigen Lebensverhältnisse, im gegebenen Fall die Nährpflanze, das Umsichgreifen des Krankheitserregers beträchtlich fördert. Hierzu sei bemerkt, dass diese Versuchsserie wegen hindernder Umstände nach einer Woche abgebrochen werden musste und es keine Möglichkeit gab, die volle Entfaltung der Mortalität der infizierten Raupen abzuwarten.

Bei einem weiteren Versuch befand sich das Insektarium in einem geschlossenen feuchten Raum unter ungünstigen Licht- und Wärmeverhältnissen. Als Nährpflanze diente sowohl in der Kontroll- wie auch in der virusbehandelten Serie das Laub des Apfelbaumes. Nach 5 Tagen gestalteten sich die Mortalitätsverhältnisse folgendermassen : von den Kontrolltieren gingen 25,7%, von der virösen Zucht 67,5% ein. Bereits aus dem vorigen, doch vor allem aus diesem Versuch geht hervor, dass die ungünstigen Zuchtbedingungen auch die Kontrollraupen dezimieren, da die Mortalität bei diesen ebenfalls verhältnismässig hoch war, obwohl in den vorhergehenden Versuchen — einen Fall ausgenommen (Nachbarinfektion) — dies nicht vorkam. Begründet scheint die Annahme, dass häufig eine Latenz vorliegt, worauf schon im Laufe der vorigen Untersuchungen hingewiesen wurde, d. h. ein bedeutender Prozentsatz der scheinbar gesunden Raupen die Virusinfektion in sich trägt.

Die ungünstigen Zuchtbedingungen machen aus den latent angesteckten Raupen manifest viruskranke Tiere.

Man nimmt im allgemeinen an, dass die Tiere während der Versuche unter ungünstigen Umweltsbedingungen leben. Die Abgeschlossenheit und das Mikroklima des Insektariums entsprechen keinesfalls den natürlichen Verhältnissen, deshalb zeigt sich unter Laboratiumsbedingungen ein gewisses Plus zugunsten des zu erreichenden Zieles in dem erhaltenen Bekämpfungsergebnis. Diese Nachteile werden in den Feldversuchen zum grössten Teil beseitigt, da die Isolatoren die Tiere lediglich im Verlassen der Nährpflanze beschränken und eventuell die Lichtverhältnisse beeinflussen, der Luft- und Regendurchgang hingegen gewährleistet ist.

Die Freilandversuche wurden an 2—3jährigen Jonathanapfelbäumen an zwei Orten durchgeführt, und zwar im Versuchsgarten des Institutes und in Budatétény im Versuchsgebiet des Forschungsinstitutes für Gartenbau. Im Institutsgarten wurde auf zwei entgegengesetzten Seiten der Versuchsbäume je ein geeigneter Zweig ausgesucht, möglichst mit gleichem Laubbesatz, das mit

einem zylindrischen Drahtisolator umgeben (Abb. 4) und unten und oben durch Mollino abgeschlossen wurde. Vor Anbringung der Isolatoren wurde das Laub

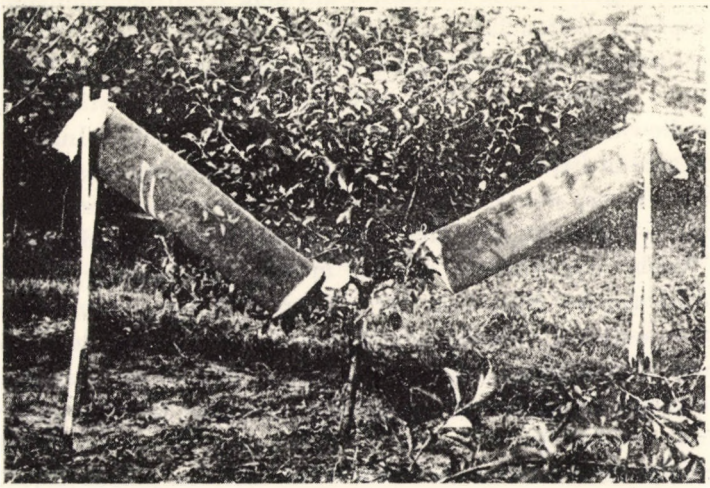


Abb. 4. An mit Virusaufschwemmung bzw. Wasser bespritzten Apfelbaumzweigen fressende Hyphantria-Raupen unter Isolatoren



Abb. 5. Raupenfrass auf dem mit Hyphantria Virus besprizten (links) bzw. auf dem Kontrollzweig (rechts)

behandelt, die Kontrollzweige mit Wasser, die infizierten mit der in den vorhergehenden Versuchen benutzten Virusaufschwemmung, danach auf den Zweigen 100 Raupen verschiedener Grösse und Entwicklung (L_3—L_6) untergebracht.

Das Eingehen der Raupen unter dem virösen Isolator begann am 8. Tag und dauerte 10 Tage hindurch. Während dieser Zeit gingen im virösen Isolator sämtliche Raupen ein ; im Kontrollisolator hingegen blieben die Raupen am Leben. Wie aus Abb. 5 ersichtlich, frassen die Raupen auf dem mit Viren bespritzten Zweig kaum 2—3 Blätter, während der Kontrollzweig vollkommen kahl gefressen wurde.

Beim Versuch in Budatétény wurden nicht Zweige, sondern das ganze Bäumchen mit einem grösseren, auf Holzgerüst gehängten Isolator bedeckt. Hier blieb ein Baum als Kontrolle, zwei andere wurden mit Virusextrakt bespritzt. In den Isolatoren wurden gleiche Mengen von Raupen, je Baum 200 Stück, untergebracht. Auf dem einen infizierten Baum gingen die Raupen in 10 Tagen ein, auf dem anderen konnten nach 10 Tagen noch 10—15 lebendige gefunden werden, weshalb dieser erneut bespritzt wurde. Daraufhin gingen sämtliche Raupen ein. Unter dem Kontrollisolator lebten alle Raupen weiter, keine einzige ging ein.

Besprechung der Ergebnisse

Aus den besprochenen Versuchen können praktische Schlussfolgerungen gezogen werden. Die Ergebnisse der künstlichen Infektionsversuche mit Hyphantria-Virus zeugen davon, dass die künstliche Ansteckung als Bekämpfungsmethode gegen Schädlinge angewandt werden kann. Die künstlich hervorgerufene Masseninfektion müsste sich gegen die Raupen richten. Sowohl hinsichtlich des raschen Ablaufes als auch in bezug auf die quantitative Verhältniszahl war die Infektion bei den jüngsten Raupen (L_1—L_3) am wirksamsten, in den Entwicklungsstadien L_4—L_6 schon langsamer, während sie im letzten Larvenstadium keine 100%ige Mortalität herbeiführte. Diese Tatsache wird im allgemeinen damit erklärt, dass die jungen Raupen der Virusinfektion gegenüber empfindlicher sind, doch liegt die Deutung vielleicht noch mehr an der Hand, dass die jungen Raupen von der infizierten Blattfläche verhältnismässig mehr fressen als die älteren und sich auf diese Weise eine grössere Menge Infektionsstoff einverleiben. Diese schälen nämlich die Oberfläche der Blätter ab, während sich die älteren Raupen von ganzen Stücken ernähren, so dass sich der grössere Teil der aufgenommenen Nahrung nicht aus den infizierten Oberflächen ergibt. Ein bedeutender Teil der nicht eingegangenen älteren Raupen trägt das Virus in latentem Zustand in sich ; in den Körpersäften mehrerer, scheinbar gesunder Raupen, die auch später nicht zugrunde gingen, sondern sich verpuppten, wurden Polyeder gefunden. Diese Latenz hört unter ungünstigen Lebensbedingungen auf und führt zu einer aktiven Erkrankung die auch Epidemieformen anzunehmen vermag. Die kühle, feuchte Witterung ist diesbezüglich ein aktivierender Faktor sowie die ungünstige Nährpflanze im Falle einer grösseren Raupeninvasion, wo die Raupenmassen, nach dem sie die geeigneten Nährpflanzen kahl

gefressen haben sich mit weniger geeigneten zufriedengeben müssen. Ein derartiger Einfluss der ungünstigen Nährpflanzen wurde nicht nur in eigenen Versuchen an Walnuss beobachtet, sondern auch VAGO [6] berichtete darüber im Zusammenhang mit dem Polyedervirus der Seidenraupe. Dieser Autor ernährte statt Morus-Blätter mit Machlura die Raupen, die in kurzer Zeit viruskrank wurden.

Vom Standpunkt der praktischen Bekämpfung ist das Nachlassen der Frassfertigkeit der Raupen ein sehr bedeutender Faktor ; nach 3—4tägiger Aufnahme infizierter Nahrung offenbart sich dies bereits symptomatisch. Die Appetitlosigkeit ist ein Krankheitszeichen, und in praktischer Hinsicht bedeutet dies soviel, als ob nur ein Drittel des vorhandenen Raupenbestandes das Laub fressen würde.

Laut der Versuche scheint das *degenerative* Verhalten der Nachkommenschaft der infizierten Population ein bedeutsamer Faktor zu sein. Es war nämlich ersichtlich, dass aus den Puppen der bis zur Verpuppung gelangten angesteckten Raupen viel weniger Schmetterlinge schlüpften als aus denen der gesunden ; bloss ein Fünftel der Schmetterlinge schlüpfte aus den Puppen, und auch dessen Hälfte ging ein. Die überlebenden Weibchen legten weniger Eier, im Vergleich mit den Kontrollweibchen desselben Alters betrug die durchschnittliche Zahl der Eier nicht einmal ein Viertel ; darüber hinausgehend, entwickelte sich aus den wenigen Eiern eine verkümmerte Nachkommenschaft. So ist es zu erwarten, dass wenn das Virus unter den Raupen der ersten Generation keine 100%ige Mortalität herbeiführte, die Verluste bei der Verpuppung und während des Schlüpfens sowie die darauffolgende Mortalität, ferner die herabgesetzte Eierzahl und die damit verbundene Degeneration der Nachkommenschaft die noch bestehenden Mängel befriedigend ersetzen.

Der erörterte pathologische Entwicklungsgang von der Verpuppung der kranken Raupen bis zum Schlüpfen der Schmetterlinge, sodann bis zur Eiablage und zum Schlüpfen der Jungraupen stellt einen sehr wichtigen Faktor im Bekämpfungsvorgang dar. Die schlechten Schlüpfverhältnisse der aus kranker Population stammenden Schmetterlinge und die herabgesetzte Eierzahl der Weibchen zeugen davon, dass das Virus die Vermehrung bzw. den Entwicklungsgang unmittelbar oder mittelbar beeinflusste. Der Vorgang zeigt übrigens die Verbreitungsmöglichkeit der Virusepidemie durch infizierte Puppen von einem Jahr in das andere im voraus an. Laut der Versuche entfaltete sich dieser Verschlechterungsprozess nur auf der Linie der Weibchen und zeigte sich unter den Nachkommen des infizierten Männchens und des gesunden Weibchens nicht.

Es sei noch eine Erscheinung erwähnt, die ebenfalls zum degenerativen Komplex gehört. Kein systematischer Versuch wurde vorgenommen, sondern lediglich beobachtet, dass die Paarungsfähigkeit der viruskranken Männchen vermindert ist, was sich jedoch nicht auf alle bezieht. Bei der Untersuchung eines Männchens mit herabgesetzter Fertigkeit wurden in ihm Polyeder gefunden,

während diese bei den paarungsfähigen fehlten. Wird diese Beobachtung durch systematische Untersuchungen bestätigt, so liegt eine neuere Angabe zur Entkräftung der Nachkommenschaft der aus infizierter Population stammenden Eltern vor.

Die Frage vom Standpunkt der praktischen Anwendbarkeit betrachtend, befriedigt die geplante Schutzmassnahme mittels Virus die Forderungen, die hinsichtlich der Benutzung eines biologischen Agenten in der Bekämfung gestellt werden.

Gute Aussichten bestehen zur massenhaften Erzeugung des Infektionsstoffes und zur Weiterverbreitung der Virusepizootie. Die eingesammelten Kadaver können lange Jahre hindurch aufbewahrt und das Virus in trockenem Zustand in aktiver Form konserviert werden, so dass das Material jederzeit zur Hervorrufung einer Epizootie verwendbar ist. Es besteht ausserdem die Hoffnung, mit einer anderen, leicht züchtbaren Insektenkultur eine Massenviruskultur zustande zu bringen.

Die Beseitigung einiger Mängel und im Zusammenhang damit die Steigerung der Anwendbarkeit müssen noch durchgeführt werden. Das wesentlichste darunter ist die Beschleunigung der Viruswirkung. Das Virus benötigt eine gewisse Zeit, um den Organismus durchdringen und sich dort generalisieren zu können. Diese Zeit wechselt — in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Raupen — zwischen 3 und 6 Tagen. Es gehört zum Wesen des Erfolges, dass die Raupen, bevor sie noch durch ihren Frass beträchtliche Schäden anrichten, zugrunde gehen. Zur Lösung der Frage bieten sich mehrere Methoden ; vor allem sei hier die Selektion der aggressiveren Stämme erwähnt. Im Laufe eines nicht zu dieser Arbeit gehörenden Vorversuches wurde beobachtet, dass die serienweise Passage die Angriffsfähigkeit des Ausgangsvirusstammes erhöht. Während wir diese Erscheinung an Raupen des gleichen Stadiums beobachteten, konnten wir feststellen dass der ursprüngliche Ausgangsstoff bei Raupen der L_2—L_3 Stadien erst nach einer Woche eine merkbare Mortalität herbeiführte, während ein und derselbe Infektionsstoff nach drei Passagen bereits am 5. Tag eine rasch zunehmende Mortalität ergab.

Eine andere Methode zur Beschleunigung der Virusreaktion wäre die Zugabe von Stoffen ergänzender Wirkung, die entweder biologische Agenten oder chemische Stoffe sein könnten. Dem ersten Gedanken würde das *Bacillus thüringiensis* entsprechen, mit dem bereits KLEMENT [2] günstige Resultate erzielte. Das Virus und das Bakterium in Mischkultur anwendend, könnte nicht nur an eine biologische Wirkungsergänzung, sondern auch an ein das Problem der Besetzungsfähigkeit förderndes physikalisches Hilfsmaterial gedacht werden.

Dem anderen Gedanken würde jedes in niedriger Konzentration angewandtes chemisches Bekämpfungsmittel entsprechen, das in stärkerer Konzentration die Hyphantria tötet, die Aktivität des Virus indessen nicht vermindert.

Die im Laufe unserer Nachforschungen gesammelten Versuchsangaben bewiesen ohne Ausnahme, dass die gefundene Virusart nach Ausarbeitung der praktischen Anwendungsmassnahmen in der biologischen Bekämpfung von *Hyphantria cunea* wirksam angewendet werden kann.

ZUSAMMENFASSUNG

In Züchten von *Hyphantria cunea* wurden im Jahre 1952 grosse Mengen an Polyedrosis eingegangener Raupen gefunden. Die Raupen enthielten für die Viruskrankheit charakteristische Polyeder. Die infizierten Raupen konnten in Laboratoriums- und Feldversuchen zur weiteren Infektion und auf diese Weise zur Bekämpfung des Schädlings erfolgreich verwendet werden. Infektionsversuche bewiesen, dass die jungen Raupen am empfindlichsten sind. Die infolge der Infektion nicht eingegangenen älteren Raupen übertrugen die Folgen der Infektion Degenerationserscheinungen in den weiteren Lebenszyklen durch die Puppe, die Imago und das Ei, sogar an die Jungraupen. Eine degenerative Wirkung der Infektion ist an der Nachkommenschaft wahrnehmbar, die Mortalitätsmängel der älteren Raupen ausgleichend. Die Wirkung der Virusinfektion wurde von den ökologischen Faktoren wesentlich beeinflusst, da ungünstige Faktoren das latente Virus aktivierten. Die Versuchsergebnisse bieten eine Möglichkeit zur praktischen Bekämpfung.

LITERATUR

1. Chapman, I. W., Glaser, R. W.: J. Econ. Entomol. **8**, 140 (1915).
2. Klement, Z.: Mezőg. Kísérl. Közp. Évk. **3**, 118 (1951).
3. Machay, L. M., Lovas, B.: Acta Microbiol. Hung. **3**, 117 (1955).
4. Magy. Kir. Áll. Rovartani Állomás Közlem. **1**, (1895).
5. Nagy, B., Reichart, G., Ubrizsy, G.: Növényvéd. Kut. Int. Kiadványai **1** (1953).
6. Vago, C.: Rev. Canad. Biol. **10**, 299 (1951).
7. Vago, M. M. C., Vasiljevic, L.: C. R. Acad. Agric. **39**, 735 (1953).

THE NATURE OF THE SPECIFIC POLYSACCHARIDES OF TUBERCLE BACILLI. II

By

J. FÖLDES

Institute of Microbiology Medical University, Szeged

(Received, March 9, 1956)

Investigations into the MIDDLEBROOK—DUBOS test [1] have produced evidence showing that the commercial old tuberculin contains two kinds of specific component [2]. One is capable of adsorption onto erythrocytes and the erythrocytes thus sensitized are agglutinated by the serum from patients with tuberculosis. The other specific component is not adsorbed, but fixes the antibody, as it could be demonstrated by the haemagglutination inhibition test. In a previous report [2] an account was given of the isolation of these two kinds of specific component, of their chemical characteristics and serological activities.

Extract P_1, obtained from dried tubercle bacilli by mild treatment, possesses both of the above properties, while extract P_2, which is obtained by rougher treatment, is not adsorbed onto red cells and fixes the antibody only. Chemical analysis has shown both of these extracts to be of polysaccharide nature. It has been found, however, that extract P_1 contained also a relatively high amount of desoxyribonucleic acid (DNA) and a small quantitiy of ribonucleic acid (RNA).

At present no detailed information is available concerning the nature of the sensitizing component. Most of the authors believe them to be polysaccharides [3, 4, 5], though others claim that the protein fraction should be held responsible for sensitisation [6, 7]. Chemical analysis and serological studies of the P_1 and P_2 extracts suggest that in the extracts P_1 the nucleic acid linked to the polysaccharide plays the decisive part in the mechanism of adsorption [2]. This assumption has been confirmed by the experiments to be reported, on the one hand, by completing the known characteristic properties of the extracts and, on the other hand, by partial decomposition of the extracts and by chemical and serological analysis of the substances decomposed and the fractioned components.

Materials and methods

Preparation of extracts P_1 and P_2. The extracts were prepared from autoclaved and dried bovine tubercle bacilli grown in SAUTON's medium, by the technique already described [2]. The extracts studied in this paper were the fractions P_1 and P_2 obtained in another, subsequent isolation.

Partial hydrolysis of fractions P_1 and P_2 for serological studies. Two test tubes were placed into a boiling waterbath, one containing 8 ml of a 100 mg per cent solution of extract and the other 2 ml of 0,5 *N* HCl. After 5 minutes the hot solutions were mixed maintained at 100° C, sampled (1 ml) at predetermined intervals and neutralised with 1 ml of 0.1 *N* NaOH containing sufficient NaCl to make an isotonic solution. The neutral and isotonic solution thus obtained was a 40 mg per 100 ml solution of the partially degraded extract. This was then used in the haemagglutination inhibition and erythrocyte sensitisation experiments.

Partial decomposition of extracts with NaOH was carried out by an analogous procedure.

Partial hydrolysis of extracts P_1 and P_2 for chemical analysis. Into a boiling waterbath 25 ml of an 0,1 per cent solution of extract and 6,25 ml of 0,5 *N* HCl were placed ; after 5 minutes the solutions were mixed and the mixture was allowed to stand in the boiling water until the sensitizing resp. agglutination inhibiting properties were lost. The length of time required was determined by serological activity tests after hydrolysis as described above. After completion of the treatment, the solutions were transferred to melting ice, the pH is adjusted to 6,2 and the volume to 62,5 ml diluting thereby the extract to make a 40 mg per 100 ml solution.

Partial degradation of the extracts with NaOH was carried out by an analogous procedure.

Fractionation with La-acetate. The La-acetate precipitation described in the previous paper [2] was carried out at the low pH (pH = 3) suggested to be optimal by STERN and STEINBERG [8]. The supernatant of extract P_1 still contains a part of the sensitizing agent. In later experiments it has been shown that by fractionating at pH = 6,2 the total amount of nucleic acid bound to the polysaccharide is split off and the centrifugate thus obtained does not sensitize or contain phosphorus. Fractionation was carried out by adding 1 ml 2,5 per cent La-acetate to 20 ml of the partially degraded solution and the mixture was kept in a refrigerator overnight. The centrifuged precipitate was washed three times with 2 ml cold 0,1 per cent La-acetate. The volume of the mixed washing fluids and the supernatant was made up to 40 ml with distilled water.

The material separated and washed with La-acetate was suspended in 2 ml 0,1 *N* Na_2CO_3. The resulting La-carbonate precipitate was centrifuged and repeatedly washed. The volume of the solution and the washing fluids was made up to 40 ml with distilled water.

Ten ml of a 100 mg per 100 ml solution of the original non-hydrolysed extract P_1 were fractionated in the same way. Since, however, the excess La in the solution agglutinates erythrocytes, the excess La in the supernatant was removed by the addition of 1 *N* Na_2CO_3. Finally, the volumes were made up to 20 ml. The NaCl content of the water used for dilution provided for isotonia.

Fractionation with Uranyl-acetate was made by the MACFADYEN method [9]. Twenty ml of a 1,56 per cent Uranyl-acetate, dissolved in 10 per cent trichloracetic acid was added to 20 ml of partially hydrolysed extract. After standing overnight in a refrigerator and centrifuging, the sediment was repeatedly washed with the reagent diluted 1 in 2,5. The washed fraction was dissolved in 2 ml 0,1 *N* Na_2CO_3 and its volume adjusted to 40 ml.

Ten ml of the 100 mg per 100 ml solution of the original non-hydrolysed extract P_1 were fractionated in the same way. The solution was diluted to 20 ml (50 mg per 100 ml concentration). The NaCl contained in the diluent ensured isotonia.

Dialysis of the partially hydrolysed extract. Dialysis was carried out against distilled water, at 4° C, for 60 hours. The distilled water was renewed at 12 hour intervals.

Erythrocytes for serological tests. Sheep erythrocytes washed three times and preserved in ALSEVER's solutions [10] were used.

Agglutinating serum. Serum was obtained by heart puncture from rabbits infected with live tubercle bacilli. After titration, the higher titre sera were mixed and stored in deep-freeze.

Assay of sensitizing activity. The sensitizing capacity of the extract P_1, the La- and Uranyl-acetate fractions and of the partially hydrolysed extracts was determined by the following method. Two ml of the 40 mg per 100 ml extract were incubated with 0,1 ml 20 per cent washed sheep erythrocytes at 37° C for 2 hours. The cells were then washed, taken up to make an 0,5 per cent suspension, of which 0,1 ml was added to each 0,1 ml-volume dilution of the serum of known titre. After incubation at 37° C for 2 hours the agglutination titre was read.

Specific inhibition of haemagglutination. Tests for specific inhibition of agglutination by extracts P_1 and P_2, by the La- and Uranyl-acetate fractions of P_1 and by the partially degraded extracts were made by the TAKÁTSY loop method [11], in total volumes of 0,2 ml. The dilutions of the extracts (0,1 ml in volume each) were incubated with 0,05 ml serum eight times more concentrated than the titre dilution (8 haemagglutination doses = 8 H. D.), at 37° C for 1 hour. After that, 0,05 ml of the 1 per cent suspension of sensitized red cells was added, the mixture was shaken, kept at 37° C for 2 hours and examined quantitatively for inhibition of agglutination.

Chemical analysis. Reducing components were estimated by the MOKRASCH method [13], using the DREYWOOD anthrone reagent [12]. Pentoses were determined quantitatively by the

MEYBAUM orcinol test [14]. DNA was estimated by the DISCHE method [15], as modified by BERGOLD and PISTER [16]. Quantitative tests for phosphorus were carried out according to HARWEY [17], and for nitrogen by the CLEGHORN and JENDRASSIK nesslerisation method [18]. Hexosamine was estimated by the modified [20, 21] method of ELSON and MORGAN [19]. The above colorimetric tests were made in 3 parallels of different quantity. The results presented represent the means of the values calculated from readings on the „Pulfrich-Photometer". The chromatographed extracts were hydrolysed with 4 N H_2SO_4 at 100° C for 4 hours neutralised with $BaCO_3$, chromatographed on Whatman No 1 paper at room temperature for 24 hours, using butanol-pyridine-water 3 : 2 : 1,5 as a solvent [22]. Reducing agents were demonstrated with anilinhydrogen phthalate [23], and the nucleic acid bases by the alkaline fluoresceine method of WIELAND [24].

Experiments and results

The experiments were intended to yield a sensitizing fraction which may be looked upon as being homogeneous, on the one hand, and also to use such destructive procedures which electively affect the sensitizing component. According to the results of a previous paper [2], the P_1 extract is not homogeneous. It has been namely found that the sensitizing action is bound to the NA-containing fraction of extract P_1. It seemed that the method of choice for producing the homogeneous fraction would be that causing specific precipitation of NA, while the sensitising power could electively be abolished by breaking down NA chemically or enzymatically. It has, however, been found that following the enzymic hydrolysis of NA there still remains a considerable quantity of nonhydrolysed nucleotide, the so-called "core" [25, 26]. Bearing in mind a possible action of the "core" unaffected by the enzymatic hydrolysis, the dilute alkaline and acid hydrolysis seemed to be more adequate. The results of enzymic hydrolysis will be published later [28].

Chemical and serological characteristics of the preparations

The characteristics of extracts P_1 and P_2 are summarised in Table I.

Table I

Chemical and serological analysis of extracts P_1 and P_2

Extract	Reducing subtances %	Hexose-amine %	Pentose %	DNA %	Phosphorus %	Nitrogen %	AI titre*
P_1	62,0	6,3	8,9	20,05	2,15	3 ,2	1 : 160 000
P_2	61,5	3,9	25,4	—	0,6	0,97	1 : 120 000

* Agglutination Inhibition.

It can be seen in Table I that while extract P_1 was relatively rich in DNA, this could not be demonstrated in extract P_2. The two extracts differed significantly in nitrogen and phosphorus content, too. It was remarkable that

extract P_2 should contain as much pentose (25,4 per cent), as compared with the 8,9 per cent in extract P_1.

Sensitizing activity of extract P_1. The quantitative data for sensitizing activity are presented in Table II. The data reveal that even a 10 mg per

Table II

Estimation of the sensitizing activity of extract P_1

1% red cells treated with	dilutions of serum							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
P_1 20 mg%	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—
10 mg%	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—
5 mg%	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—	—
2 mg%	++++	++++	++++	++++	++++	+++	—	—
1 mg%	++++	++++	++++	++++	+++	—	—	—
old tuberculin, 1:100	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—

cent dilution of extract P_1 could completely sensitize (a titre of 1 in 128) and that the 1 in 32 titre of the serum used was capable of agglutinating red cells sensitized by a dilution as low as 1 mg per 100 ml.

Serological activity of the La- and Uranyl-acetate fractions of extract P_1. If nucleic acids bound to the polysaccharide are attributed a specific role in the mechanism of sensitization, it should be expected that following fractionation with La- or Uranyl- acetate, the supernatant would not any more sensitize. Our results published earlier [2] do not corroborate this view, since a certain degree of sensitization occurred in the red cells exposed to the supernatant. Subsequent chemical analysis has, however, revealed that after fractionation with La-nitrate at pH = 3 the supernatant still contained about 40 per cent of the NA phosphorus. In a later work fractionation was made with La-acetate at pH = 6,2, followed by a detailed chemical analysis of the fractions. The serological activity of the fractions thus obtained is presented in Tables III and IV including the results of assays of the fractions obtained by precipitation with Uranyl-acetate.

According to the data in Table III, the 40 mg per 100 ml solution of the fraction separated by treatment with La-acetate was equivalent in sensitizing capacity with the whole extract. The same applies to the Uranyl-acetate fraction. The supernatant of the La-acetate fraction did not sensitize.

The single fractions differed from each other only slightly in agglutination inhibition titre (Table IV). It can be seen that an almost direct relationship

Table III

Erythrocyte sensitizing activity of extract P_1 and of its various fractions

1% red cells treated with	dilutions of serum							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Whole extract ...	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—
La-acetate fraction	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—
La-acetate supernatant	—	—	—	—	—	—	—	—
U-acetate fraction	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—

Table IV

Inhibition of haemagglutination by extracts P_1 and P_2 as well as by the different fractions of extract P_1, in the case of 8 H. D. sera

40 mg per cent solutions	Dilutions of extract in thousands						
	5	10	20	40	80	160	320
P_1 whole extract	—	—	—	—	—	+	++++
La-acetate fraction	—	—	—	—	—	++	++++
La-acetate supernatant	—	—	—	+	+++	++++	++++
U-acetate fraction	—	—	—	—	—	+++	++++
P_2 extract	—	—	—	—	—	+	++++

H.D. = haemagglutinating doses

existed between inhibitory action and polysaccharide content of the NA-polysaccharide fraction and, the supernatant (Table V).

Chemical analysis of the La- and Uranyl-acetate fractions of extract P_1. Chemical analysis has contributed interesting data to the information obtained by serological methods. The results of chemical analysis are presented in Table V.

Table V

Chemical analysis of extract P_1 and of its fractions precipitated with La-acetate and Uranyl-acetate, respectively

Analysis	Whole extract %	La-acetate		Uranyl-acetate fraction %
		fraction %	supernatant %	
Reducing substances	62,0	38,0	24,0	38,0
Pentose	8,9	5,25	3,60	5,25
Nitrogen	3,2	2,6	0,65	2,6
Phosphorus	2,15	2,15	0,0	2,15

It is seen first of all that after fractionation at pH = 6,2 the supernatant contained no phosphorus and, accordingly, it did not sensitize (Table III). Also that about 2/3 of the total amount of reducing agents were precipitated together with the NA ; the same applied to the pentoses. Thus the fraction split off by treatment with La- and Uranyl-acetate, respectively, must be considered NA bound to polysaccharide rather than pure NA. Only highly polymerised nucleotides are precipitated by the MACFADYEN method. Thus, from the fact that the fraction separated by La-acetate treatment contained just as much of both NA and linked polysaccharides as the Uranyl-acetate fraction, follows that the NA in extract P_1 is composed exclusively of highly polymerised nucleotides.

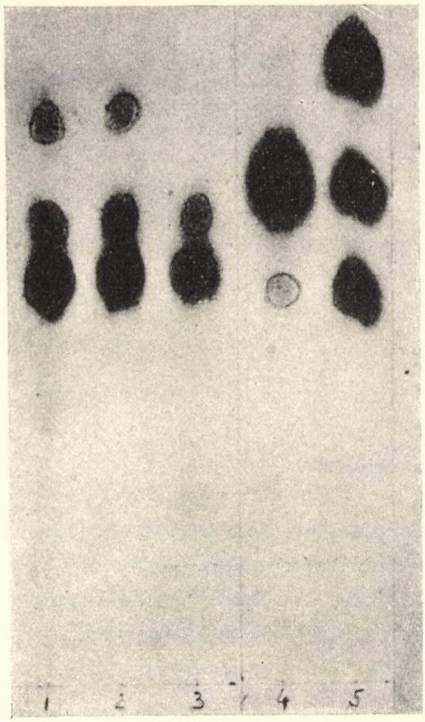


Fig. 1. 1. = Whole extract P_1 2. = The La-acetate fraction of P_2 3. = The supernatant of fraction 2. 4. = P_2 5. = D-ribose, arabinose, galactose

Chromatographic studies. The qualitative composition of the extracts and their fraction, as determined by chromatographic analysis, may be of interest. Since chromatography cannot be expected to yield absolute values, even an evaluation on a comparative basis will supply valuable information. In Fig. 1 the chromatograms of extracts P_1 and its La-acetate fractions are shown as well as those of known sugars, as standards.

As it can be seen, there is no difference in qualitative composition between the whole extract P_1 and its fraction prepared by treatment with La-acetate. The only sign indicating the presence of NA is the pale spot of ribose. Though DNA is present in a much higher concentration (20,5 per cent), its lability [27] prevents it from being demonstrable by this method. Except for the spot for ribose, the chromatogram of the supernatant seems to be identical with the patterns mentioned above. Thus on the basis of chromatography the structure of the polysaccharide in both the fraction containing NA and the supernatant is built up of the same units. Concerning the quality of the single components, parallel tests with known carbohydrates supplied valuable information. As determined by comparative chromatography, extract P_1 is composed of ribose, arabinose and glucose, and extract P_2 of galactose and arabinose units. The pattern of the NA-component demonstrable in these hydrolysates by the WIELAND-method indicates that the components of the whole extracts are present in the fractions separated by treatment with La-acetate.

Serological activity of extracts partially hydrolyzed by treatment with 0,1 N NaOH. The sensitizing activity of extract P_1 treated with 0,1 *N* NaOH is presented in Table VI.

Table VI

The sensitizing activity of extract P_1 after treatment with 0,1 N *NaOH at* 100° *C*

Duration of treatment, minutes	Dilutions of serum							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—
1	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—
2	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	—
3	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	—
4	++++	++++	++++	++++	++++	++	—	—
5	++++	++++	++++	++	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—
15	—	—	—	—	—	—	—	—

As seen, under the conditions employed the sensitizing capacity of extract P_1 decreased gradually and disappeared after 6 minutes.

The same result has been obtained with the La-acetate fraction of extract P_1, as determined by a similar method.

The agglutination inhibition titres for the same partially hydrolyzed extract are shown in Table VII.

Table VII

Inhibition of the 8 H. D. agglutinating serum by extract P_1 treated with 0,1 N NaOH at 100° C

Duration of treatment, minutes	Dilution of extract P_1 in thousands						
	5	10	20	40	80	160	320
0	—	—	—	—	—	+	++++
1	—	—	—	—	—	++	++++
2	—	—	—	—	+	+++	++++
3	—	—	—	—	++	++++	++++
4	—	—	—	+	+++	++++	++++
5	—	—	—	+	++++	++++	++++
10	—	—	—	+	++++	++++	++++
15	—	—	—	+	++++	++++	++++

The data in Table VII reveal that the agglutination inhibition titre of the treated extract decreases slightly for 5 minutes, then remains at the same level throughout the rest of the experiment. Thus, partial hydrolysis by alkali will reduce the agglutination inhibition capacity only until all sensitizing activity is lost but after that no change in agglutination inhibition titre occurs.

The effect of partial alkaline hydrolysis on the serological activity of extract P_2 is shown in Table VIII.

Table VIII

Inhibition of the 8 H. D. serum by extract P_2 treated with 0,1 N NaOH at 100° C

Duration of treatment, minutes	Dilution of extract P_2 in thousands						
	5	10	20	40	80	160	320
0	—	—	—	—	—	++	++++
1	—	—	—	—	—	++	++++
5	—	—	—	—	—	++	++++
10	—	—	—	—	—	++	++++
15	—	—	—	—	—	++	++++
20	—	—	—	—	—	++	++++

It is shown that, under the given conditions, partial hydrolysis with alkali had no influence whatsoever on the agglutination inhibiting property of extract P_2 which is of polysaccharide nature. The similar behaviour of extracts P_2 and P_1 under similar conditions was remarkable.

Chemical analysis of extract P_1 after partial hydrolysis with 0,1 N NaOH. The serological test on the partially hydrolysed extract P_1 were completed by chemical analysis of the extract treated until it had lost its sensitizing activity. The results of the analysis of the dialysed hydrolysates and of those fractionated with La-and Uranyl-acetate permit some insight into the structural

changes that had taken place. The pertaining data have been summarized in Table IX.

Table IX

Chemical analysis of extract P_1 alter partial hydrolysis with 0,1 N NaOH

Analysis	Dialysed extract %	La-acetate		Uranyl-acetate fraction %
		fraction %	supernatant %	
Reducing substances	54,0	34,0	28,0	26,5
Pentose	6,1	3,0	6,0	1,5
Nitrogen	2,55	2,55	0,60	1,6
Phosphorus	1,35	1,35	0,80	1,05

The data as compared with the data of Table V will reveal that nearly 1/3 of the total phosphorus in the partially degraded extract P_1 became dialysable. The amount of dialysable nitrogenous compo unds (about 1/5) and of pentoses was less. A comparison of the analytical data of the La-acetate fraction with those of the Uranyl-acetate fraction shows that on partial degradation the polynucleotides were partly depolymerised, as indicated by the decrease in the amount of NA separable by treatment with Uranyl-acetate.

Serological activity after partial hydrolysis with 0,1 N HCl. The results were different if partial hydrolysis had been carried out with hydrochloric acid. The changes in relation to time in the sensitizing titre of extract P_1 thus treated are shown in Table X.

Table X

The sensitizing activity of extract P_1 after treatment with 0,1 N HCl at 100° C

Duration of treatment, minutes	Dilutions of serum							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—
2	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—
4	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—	—
6	++++	++++	++++	++++	++	—	—	—
8	++++	++++	++++	++	—	—	—	—
10	++++	++++	++	—	—	—	—	—
12	++++	++	—	—	—	—	—	—
14	+++	+	—	—	—	—	—	—
15	—	—	—	—	—	—	—	—

As it can be seen, in the course of treatment extract P_1 gradually lost its sensitizing activity which disappeared altogether after 15 minutes.

Identical results were obtained with the similarly treated La-acetate fraction.

The agglutination inhibition titres of the same hydrolysate are shown in Table XI.

Table XI

Inhibition of the 8 H.D. serum by extract P_1 after treated 0,1 N HCl at 100° C

Duration of treatment, minutes	Dilutions in thousands of the treated extract P_1						
	5	10	20	40	80	160	320
0	—	—	—	—	—	+	++++
1	—	—	—	—	—	++	++++
2	—	—	—	—	—	++++	++++
3	—	—	—	—	++	++++	++++
4	—	—	—	++	++++	++++	++++
5	—	—	+++	++++	++++	++++	++++
6	—	+++	++++	++++	++++	++++	++++
7	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
10	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
15	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

The data in Table XI bring to light the remarkable fact that the agglutination inhibiting property is abolished as early as in the 7th minute of acid hydrolysis, *i. e.* considerably earlier than the sensitizing capacity.

The data for the partial hydrolysis of extract P_2 with hydrochloric-acid are presented in Table XII. Table XII reveals that extract P_2, which can be considered to be an NA-free polysaccharide, lost all agglutination inhibiting action capacity in the 7th minute, *i. e.* its sensitivity to hydrochloric acid is quantitatively similar to that of extract P_1.

Table XII

Inhibition of the 8 H.D. agglutinating serum by extract P_2 treated with 0,1 N HCl at 100° C

Duration of treatment, minutes	Dilution in thousands of the treated extract P_2						
	5	10	20	40	80	160	320
0	—	—	—	—	++	++++	++++
1	—	—	—	—	++	++++	++++
2	—	—	—	—	+++	++++	++++
3	—	—	—	+	++++	++++	++++
4	—	—	—	++	++++	++++	++++
5	—	—	+++	++++	++++	++++	++++
6	+	++++	++++	++++	++++	++++	++++
7	++ ++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
10	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
15	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

The experiments supplied evidence showing that the sensitivity to acid and the relative resistance to alkali of the neutralizing action of extract P_2 are comparable with the same properties of extract P_1 and of its fractions. In view of this finding it seems justified to consider the polysaccharide also in extract P_1, as the carrier of the common characteristic. The factor responsible for the high sensitivity to alkali of the sensitising property must be sought for in a component other than the polysaccharide.

Chemical analysis of extracts partially hydrolysed with 0,1 N HCl. The afore-mentioned serological studies have been supplemented by the chemical analysis of the dialysed hydrolysates and the La- and Uranyl-acetate fractions of the extracts. The pertaining data have been summarized in Table XIII.

Table XIII

Chemical analysis of extract P_1 hydrolysed with 0,1 N HCl, for 15 minutes

Analysis	Dialysed extract %	La-acetate	
		fraction %	supernatant %
Reducing substances	50,0	2,5	59,5
Pentose	4,25	1,9	7,0
Nitrogen	1,6	1,2	2,0
Phosphorus	1,05	1,30	0,80

The most remarkable fact is that no precipitate was obtained with Uranyl-acetate. This means that the 15-minute treatment with hydro-chloric acid had completely broken up the polynucleotide structure. The data for the La-acetate fraction reveal that as a result of partial degradation the polysaccharide—NA complex had been split up and most of the reducing components were to be found in the supernatant. The 2,5 per cent reducing substance in the NA fraction approximates the value for ribose in RNA. Other data of the La-acetate fraction analysis indicate a considerable decrease in the amount of nucleotides precipitated by La. Essentially similar conclusions can be drawn from the values showing a decrease in the quantity of dialysable components.

Discussion

Numerous structurally different polysaccharides have been isolated from tubercle bacilli. In a review by STACEY [29], the substances isolated are divided into 3 groups : 1. components from the somatic part of the cell, 2. components linked to the lipid fraction, and 3. polysaccharides isolated from the cell-free filtrate. Extracts P_1 and P_2 may be listed among the members of group

1, where the chemically well-defined polysaccharides are characterized by the classical precipitation test. Extracts P_1 and P_2 occupy a special place in this group, since finer differences in the serological activity of this polysaccharides could be demonstrated by the haemagglutination and inhibition tests and at the same time valuable information could be obtained concerning the essential structural differences. Other authors have produced extracts from tubercle bacilli [30] or from the filtrate of broth cultures [31] by different methods, in order to isolate the sensitizing agent. The serological activity of these extracts has been studied in detail by the above tests, but chemical analysis was either inadequate or was not carried out at all.

Extract P_1 cannot be considered homogeneous. It is composed of polysaccharides (containing 62 per cent reducing substances), more than 50 per cent of which form a complex with NA. Apart from a small amount of RNA, NA contains 20,5 per cent DNA. High dilutions of extract P_1 can sensitize sheep erythrocytes, while extract P_2, which is a polysaccharide with no NA-content, cannot. The two extracts contain a similar amount of reducing substances and it is only by chromatographic analysis that differences can be demonstrated in the buildstones of the polysaccharide part, inasmuch as extract P_1 is composed of ribose, arabinose and glucose, and extract P_2 of arabinose and galactose units.

The NA-polysaccharide fraction of extract P_1 fractionated with La-acetate at pH = 6,2 is equipotent with the whole extract in sensitization and the supernatant contains only the agglutination inhibiting property. This finding indicates that the NA-component of the NA-polysaccharide complex plays an active role in the mechanism of sensitization. This view has been corroborated by chromatographic analysis of the fractions. It has been found that both in the precipitate resulting from treatment with La-acetate and in the supernatant the polysaccharide parts are essentially identical and yet, the common polysaccharide alone cannot sensitize sheep red cells.

Further corroborative evidence has been obtained by the serological and chemical examination of the products of partial hydrolysis with dilute alkali or with acid. The agglutination inhibiting action of a 80 mg per 100 ml solution of extract P_1 is abolished already in the 7th minute of hydrolysis with 0,1 *N* HCl at 100° C, while the sensitizing capacity is lost only after 12 minutes. Under identical conditions, the same applies to the agglutination inhibiting action of extract P_2. Thus when testing the inhibitory action, in extract P_1 it is also the polysaccharide component that should be looked upon as the substrate of HCl hydrolysis. This view is fully supported by the result of degradation with dilute alkali. Under the given experimental conditions, the inhibitory action of extract P_2 remains unaffected and so is the serological activity of the polysaccharide. The behaviour of extract P_1 is essentially the same, though its sensitizing capacity is lost in the 6th minute of partial hydrolysis ; on the

other hand, no change in the inhibitory action occurs after that time. These facts suggest that alkaline hydrolysis acts on some component other than the polysaccharide. The results of chemical analysis have confirmed this assumption. In the La-acetate fraction of the partially degraded extract P_1 the polysaccharide part is practically unaffected (as determined from the reducing substance content), while the components of NA are markedly diminished. The sensitizing agent is more susceptible to alkali than to acid. Consequently, if we accept that the NA is responsible for sensitization, RNA should be thought of in the first place.

Certain details in the reports by other authors, as well as some data in the present knowledge of NA contribute in the above sense to the results of our experiments. MIDDLEBROOK and DUBOS [1] characterize the neutral solution of their extract as being thermostable and believe it to be a polysaccharide slightly contaminated with tuberculoprotein. KEOGH [4] has shown that the sensitizing extract is sensitive to both alkali and dilute acid, which deprive it of its sensitizing, antibody fixing and precipitating properties. Some Japanese authors believe the protein fraction to be responsible for the most part of sensitization [6, 7]. The observation by these authors, that their substance inactivated by alcohol-acid hydrolysis was reactivated after maintenance at pH = 3 overnight and neutralization, is remarkable [7]. An analogous phenomenon has been described by GULLAND [33], who found that the diminution in the viscosity of thymus DNA induced by treatment with acid or alkali was reversible. NETTER [32], too, has published noteworthy evidence. This author has found in sensitization experiments with extracts of the *E. coli* strains O 26, O 55 and O 111 that without boiling the filtrate of the broth culture did not sensitize, while both the filtrate of the boiled culture and the boiled filtrates could sensitize erythrocytes, which became agglutinatable by specific serum. Though NETTER has made no attempts at explaining this phenomenon, the studies by CALIFANO [34] and the data published by HAMER [35] make it clear and at the same time lend support to the view that NA has decisive role in sensitization. CALIFANO liberates and brings into solution NA from the bacterial body by heat treatment, at an optimum temperature. This he determined, among others, for *E. coli*. It is known that NA reacts very strongly with proteins. According to HAMER, this linkage is abolished by heat treatment, which denatures proteins. It is possible that in the sensitizing solutions which NETTER obtained by simple boiling, the sensitizing agent is liberated according to the above mechanism. BOYDEN [31] has also published observations concerning the effects of heat treatment. He demonstrated two different types of "haemosensitin" in cross inhibition test. Alpha haemosensitin is the characteristic component of fractions prepared without heat treatment and is believed to be a substance of polysaccharide while beta haemosensitin, whose chemical structure is unknown, is the characteristic component in heat-treated fractions.

According to GARD [36], the uppermost layer (in the chemical and immunological sense) of the erythrocyte surface is protein. This protein layer is highly reactive, being capable of adsorbing a wide variety of substances. Thus, in possession of our experimental results and summarizing the data available, it may be assumed that the NA in extract P_1 has role in sensitizing erythrocytes. The greatly active protein layer of the erythrocyte surface and the remarkable affinity to proteins of NA may be considered the bases of sensitization in the chemical sense, while the polysaccharide in extract P_1 still seems to remain the carrier of the specific immunological properties.

SUMMARY

In a previous report an account was given of the isolation of extracts from dried tubercle bacilli by different methods, and the chemical and serological characteristics of the extracts were also described. Extract P_1, derived from tubercle bacilli by mild treatment, sensitizes sheep red cells and inhibits agglutination. Extract P_2, which is obtained by rougher treatment is capable of only the latter. Extract P_1 contains both DNA and RNA, while extract P_2 contains no demonstrable nucleic acids. In view of this finding it has been suggested that the sensitizing property is bound to NA. Further investigations have borne out this view.

The La-acetate and the Uranyl-acetate fractions of extract P_1 are equipotent with the whole extract as regards sensitizing activity, while the supernatant has but inhibiting properties. The fractions contain the total amounts of DNA and RNA, with about 2/3 of the total of reducing substances. The supernatant is a NA-free polysaccharide. Chromatographic analysis has shown that the polysaccharide in the fraction is of the same composition as that in the supernatant.

In the 6th to the 7th minute of hydrolysis with dilute hydrochloric acid, both P_1 and P_2 extracts lose their properties inhibiting agglutination. Extract P_1 retains its sensitising activity until the 15th minute. In the course of partial hydrolysis with dilute alkali, extract P_1 loses its sensitising activity in the 6th minute, while the agglutination inhibiting action decreases slightly until the 5th minute after which time it undergoes no further change, the agglutination inhibiting activity of extract P_2 does not change at all during the experiment.

The serological investigations have been supplemented by chemical analysis of the whole P_1 and P_2 extracts, the dialysates of partially hydrolysed extracts, and the La-acetate and Uranyl-acetate fractions.

The serological investigations and also the results of chemical analysis confirm the view that the property of adsorption to the erythrocyte is bound to the NA component of the NA-polysaccharide complex, while the antibody fixing capacity is bound to the polysaccharide component.

LITERATURE

1. MIDDLEBROOK, G. and DUBOS, R. J.: J. Exper. Med. **88**, 521 (1948).
2. FÖLDES, J.: Acta Microbiol. Hung. **2**, 297 (1955).
3. MIDDLEBROOK, G.: Bull. N. Y. Acad. Med. **28**, 474 (1952).
4. KEOGH, E. V., NORTH, E. A. and WARBURTON, M. F.: Nature, Lond. **151**, 687 (1948).
5. GRABAR, P., BOYDEN, S. V., TACQUET, A. and BORDUAS, A.: C. R. Acad. Sci. **234**, 899 (1952).
6. NAOMITSU, NEZU: Japan J. Bact. **8**, 771 (1953). Cited: Biol. Abstr. 16422, 18759 (1954).
7. SINDO, T. and WAKAKURA, K.: Yokohama Med. Bull. **3**, 299 (1952). Cited: Biol. Abstr. 23959 (1954).
8. STERN, K. G. and STEINBERG, M. A.: Biochim. Biophys. Acta **11**, 553 (1953).
9. MCFADYEN, D. A.: J. Biol. Chem. **107**, 297 (1934).
10. BUKANTZ, S. C., REIN, C. R. and KENT, J. F.: J. Lab. Clin. Med. **31**, 394 (1946).
11. TAKÁTSY, GY.: Acta Microbiol. Hung. **3**, 191 (1955).
12. MORRIS, D. L.: Science **107**, 254 (1948).
13. MOKRASCH, S. C.: J. Biol. Chem. **208**, 55 (1954).
14. MEYBAUM, W.: Ztschr. Phys. Chem. **258**, 117 (1939).
15. DISCHE, Z.: Microchemie **8**, 4 (1930).

16. BERGOLD, G. and PISTER, L.: Z. Naturforsch. **3b**, 406 (1948).
17. HARWEY, H. W.: The Analyst **78**, 110 (1953).
18. CLEGHORN, R. A. and JENDRASSIK, L.: Biochem. Ztschr. **274**, 189 (1934).
19. ELSON, L. A. and MORGAN, W. T. J.: Biochem. J. **27**, 1824 (1933).
20. BELCHER, R., NUTTEN, A. J. and SAMBROOK, C. M.: The Analyst **79**, 201 (1954).
21. PALMER, J. W., SMYTH, E. M. and MEYER, K.: J. Biol. Chem. **119**, 491 (1937).
22. HORROCKS, R. H. and MANING, G. B.: Lancet **256**, 1042 (1949).
23. PARTRIDGE, S. M.: Nature **163**, 443 (1949).
24. WIELAND, TH. and BAUER, L.: Angew. Chemie **63**, 511 (1951).
25. MAGASANIK, B. and CHARGAFF, E.: Biochim. Biophys. Acta **7**, 396 (1951).
26. MARKHAM, R. and SMITH, J. D.: Biochem., J. **52**, 565 (1952).
27. CHARGAFF, E., VISCHER, E., DONINGER, R., GREEN, CH. and MISANI, F.: J. Biol. Chem. **177**, 405 (1949).
28. FÖLDES, J.: Unpublished observations.
29. STACEY, M.: Advances in Tuberculosis Research **6**, 7—17. Karger, Basel/New York. 1955.
30. POUND, A. W.: J. Path. Bact. **64**, 131 (1952).
31. BOYDEN, S. V. and SORKIN, E.: Bull. W. H. O. **12**, 285 (1955).
32. NETTER, E., BERTRAM, L. F. and ARBESMAN, C. E.: Proc. Soc. Exper. Biol. **79**, 225 (1952).
33. GULLAND, J. M.: Cold Spring Harbor Symp. Qant. Biol. **12**, 95 (1947).
34. CALIFANO, L.: W. H. O. Monograph Series No 10, Microbiol. Growth and its Inhibition. p. 19 (1952).
35. HAMER, D.: Trans. Faraday Soc. **50**, 290 (1954).
36. GARD, S.: Acta Path. Scand., Suppl. **91**, 107 (1951).

PLEUROPNEUMONIEÄHNLICHE EIGENHEITEN IN ALTEN E. COLI-KULTUREN

Von

J. SINKOVICS

Staatliches Institut für Hygiene, Budapest

(Eingegangen am 2. April 1956)

Als es festgestellt wurde, dass die L-Formen nicht fremde Symbionten, sondern spezielle Wachstumsformen sind und nicht nur in der Kultur des *Streptobacillus moniliformis*, sondern auch in der zahlreicher Mitglieder der Eubacteriales-Ordnung angetroffen werden können, tauchte sofort die bis heute unentschiedene Frage auf, ob sich diese neuen bakteriellen Mikroformen mit den von früheren Forschern häufig beschriebenen filtrierbaren Formen der Bakterien identifizieren lassen.

Laut KLIENEBERGER-NOBEL haben LÖHNIS, HAUDUROY, HADLEY, MELLON und viele andere bereits vor Jahrzenten in den filtrierbaren Formen eigentlich schon die L-Formen untersucht. KUHN und STERNBERG sowie PREISZ wären in den für bakterienphagozytierende Protozoen gehaltenen Pettenkoferia bereits den gigantischen Bakterienzellen der L-Kulturen begegnet [16]. HAUDUROY der sich als erster Forscher mit den in Phaglysaten von Bakterienkulturen enthaltenen filtrierbaren bakteriellen Partikelchen befasste, hatte 1954 noch nicht, aber 1 Jahr später bereits entschieden dahingehend Stellung genommen, dass sich die von den früheren Autoren beschriebenen filtrierbaren Formen und die Mikroformen der neu entdeckten L-Kulturen im wesentlichen nicht voneinander unterscheiden [11].

Demgegenüber halten DIENES und WEINBERGER die filtrierbaren Formen und die Mikroformen der L-Kulturen für im wesentlichen verschiedene Formen. Ihrer Ansicht nach unterscheiden sich die HADLEYschen g-Kolonien morphologisch von den L-Kolonien ; sie wachsen auch, wenn tierisches natives Serum nicht anwesend ist ; auch in Bouillon wachsen sie gut, in der sich die L-Formen gewöhnlich rasch zur üblichen Bakterienkultur zurückbilden [3]. SABIN vertrat 1952 die Meinung, dass man solange nicht im Zusammenhang mit den L-Formen von charakteristischer pleuropneumonieähnlicher Vermehrung sprechen könne, bis durch entsprechende Filtrationsversuche der Nachweis erbracht wurde, dass auch hier reproduktionsfähige Partikelchen von 125—250 Millimikron existieren. Die Filtrierbarkeit der L-Form des *Streptobacillus moniliformis* wurde von KLIENEBERGER bedauerlicherweise gerade bei einem L_1-Organismus nachgewiesen, der sich zu der üblichen Bak-

terienkultur nicht mehr zurückbilden lässt (er stabilisierte sich in L-Form) [27].

Diese wichtige Frage ist daher noch ungelöst. Das Hauptproblem, das wir auf Grund eigener Beobachtungen zu klären suchen, besteht also darin, ob sich die filtrierbaren Formen der Bakterien im Falle eines charakteristischen Mitgliedes der Eubacteriales-Ordnung mit den L-Formen identifizieren lassen. Dies schliesst auch die Frage ein, ob bei einer solchen, sich durch übliche Zweiteilung vermehrenden Bakterienart die als pleuropneumonieähnlich zu bezeichnende Vermehrungsart vorkommt.

Die Formveränderungen unseres *E. coli*-Stammes untersuchten wir erst auf penicillinhaltigen Agarplatten. Diese Versuche ergaben im Vergleich mit den Literaturangaben [2, 25, 28] keine neuen Resultate, weshalb wir sie nicht veröffentlichten ; im Rahmen vorliegender Arbeit sei jedoch eine Aufnahme gezeigt auf der die auf Penicillinwirkung gebildete, sich verzweigende Fadenform einer *E. coli*-Zelle und beachtenswerte Abschnürungserscheinungen zu sehen sind (Abb. 1).

In den letzten 2 Jahren beobachteten wir die Formveränderungen einzelner Individuen alter E. coli-Kulturen.

Versuchsmaterial und Methode

Unseren *E. coli*-Stamm züchteten wir aus dem Harn eines 34jährigen Mannes mit Cystopyelitis (V. J.) ; der Stamm weist einen geringen spontanen Polymorphismus auf. Alte Kulturen wurden in mit gekochter Pferdefleischbouillon gefüllten und mit Paraffin verschlossenen Kolben durch mehrmonatige Aufbewahrung bei 37° C im Thermostaten bzw. bei Zimmertemperatur hergestellt.

Präparate wurden aus der Bouillon nach dem Schütteln der Kultur aus der Supernatansflüssigkeit in der Weise bereitet, dass wir mit der Pipette herausgenommene kleine Tropfen, ohne sie zu verwischen, auf dem Objektträger eintrocknen liessen. Für Elektronenmikroskopie wurde das Material auf Mikrorost aufgenommen und mit Osmium fixiert. — Von festen Nährböden entnahmen wir mit Deckplatten Abklatschpräparate. Die Färbungsverfahren sind unter den einzelnen Abbildungen jeweils angegeben. Die elektronenmikroskopischen Präparate wurden von Dr. I. Hollós aufgearbeitet.

Filtrationsversuche. Wir filtrierten stets mittels Vakuum, mit höchstens 60, im allgemeinen aber 20—30 cm Hg. Vor der Filtration befreiten wir die Bakteriensuspension von den grossen Formelementen durch 15 Minuten Zentrifugieren mit 2000 Drehungen/min. Auch durch Seitzsche EK-Schichten und in verdampfendem Lösungsmittel gelöste Nitrozellulose-Membranen nahmen wir Filtrationen vor. Letztere wurden von Dr. F. Fornosi nach der Vorschrift von Elford hergestellt [6, 7]. Das Kalibrieren der Membranen erfolgte ebenfalls nach Elford. Gegenüber dem durch Berechnungen gewonnenen durchschnittlichen Porendurchmesserwert benutzten wir auf Grund der Filtration verschiedener biologischer Objekte eine gewisse — geringfügige — Korrektion. Diese zur Kalibrieriungskontrolle der Membranen dienenden biologischen Objekte waren folgende : B. prodigiosum, der Mikroorganismus der Pleuropneumonie, Veillonella parvula var. minima (für diese beiden Bakterienstämme sind wir Prof. P. Hauduroy zu Dank verpflichtet), Chorioallantoismembran-Kultur des Vakcinia-Virus, Allantoiskultur der Newcastle- und Influenza A PR8-Viren, Mäusehirnkultur des Herpes- und lymphozytären Choriomeningitis-Virus.

Versuche

Formveränderungen in alten Kulturen. Zuerst beschäftigten wir uns mit den Formveränderungen in alten — dreimonatigen — Bouillonkulturen. In den nicht verstrichenen, auf dem Objektträger getrockneten, in DUBOSQ—BRASIL—BOUIN-Lösung fixierten und nach GIEMSA gefärbten Präparaten dieser Kulturen waren geschwollene Bakterienzellen in sehr grosser Zahl sichtbar ; ihre Mehrzahl war rundlich, ei- und spindelförmig, dunkelblau oder dunkellila gefärbt (Abb. 2, 3, und 4). Die Färbung ist an vielen Stellen blasser, in einzelnen Bakterienzellen lässt sie eine körnige innere Substanz vermuten (Abb. 5), andere Zellen sind blasenartig leer (Abb. 6). Die Zellen mit körniger Substanz sind auch vakuolisiert und von zerfallendem Charakter (Abb. 7 und 8) ; die Granula sind dunkellila oder rötlich. Schliesslich sind Bakterienzellen zu sehen, in denen nach der Auflösung gut umschriebene, kleine dunkellila Klümpchen zurückbleiben (Abb. 9).

In den elektronenmikroskopischen Präparaten alter Kulturen sind so regelmässige Bakterienzellen, wie Abb. 10 zeigt, selten zu sehen ; hier ist in der Mitte der Zelle eine kleine Einschnürung sichtbar, die nukleare Substanz ist in Knotenpunkten zusammengeballt, welche die Elektronen kaum durchlassen. Bei der Mehrzahl der Bakterienzellen ist die nukleare Substanz in so grossen Klumpen sichtbar, wie aus Abb. 11 hervorgeht ; hier wird die in Klumpen kondensierte innere Substanz einer Bakterienzelle noch von der Zellwand und von plasmatischen Brücken zusammengehalten, während die andere Zelle völlig zerfallen ist. Beachtenswert sind die Plasmaaustrittserscheinungen. Man sieht Zellen, die bei der Teilung Kugelform angenommen und eine geplatzte Wand haben und aus denen klumpige Kernsubstanz und plasmatische Substanz tritt. Auf Abb. 12 scheint es als ob ein Stückchen der die Bakterienzelle verlassenden Kernsubstanz Teilungserscheinungen nachahmen würde. Auf Abb. 13 ist bereits zu sehen, dass sich die ausgetretene zellwandlose und ausserordentlich bildungsfähige Substanz in Stückchen gliedern oder zerfallen kann. Im daneben liegenden Gesichtsfeld (Abb. 14) ist die vollständige Desintegration einer Bakterienzelle zu beobachten. Man sieht sehr gut, dass die für Elektronen völlig undurchlässigen umschriebenen nuklearen Partikelchen von Plasmasubstanz eingehüllt und durch plasmatische Brücken verbunden sind ; dass die freigewordene bakterielle Substanz über eine starre Wand verfügen würde, ist nicht sichtbar, im Gegenteil, sie erscheint als sehr plastisch, gestaltbar. Auf Abb. 15 und 16 sind die an der Stelle der Bakterienzellen zurückbleibenden elektronenresistenten Klümpchen und die weiche Plasmasubstanz zu sehen. Abb. 17 zeigt eine andere Erscheinungsform der Desintegration. Hier ist statt der Bildung umschriebener Klümpchen ein Zerfall der ganzen Zelle zu sehen, in der die nukleare Substanz gleichsam fein zerfasert in Erscheinung tritt.

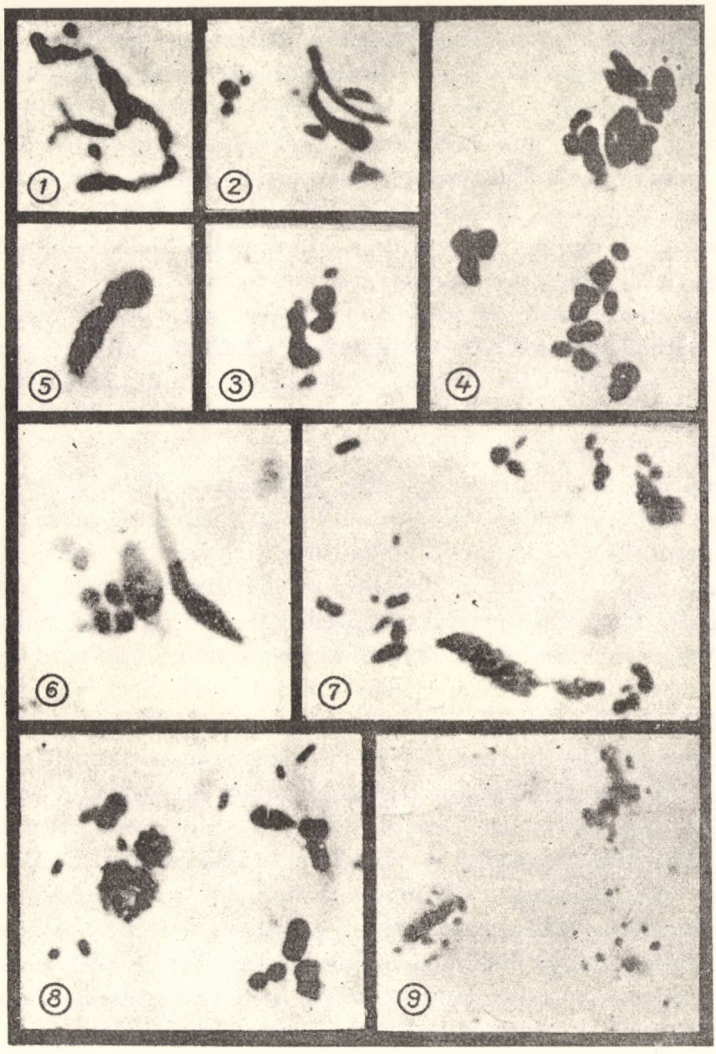


Abb. 1. E. coli vom penicillinhaltigen Agarblock: verzweigte Form mit Abschnürungserscheinungen. Abklatschpräparat. Fixierung mit Methylalkohol, Färbung nach GIEMSA. 1 : 4200.
Abb. 2, 3 und *4*. Geschwollene Bakterienzellen und verschiedene bizarre Formen in einer 3 Monate alten Bouillonkultur. Fixierung nach DUBOSQ—BRASIL—BOUIN, Färbung nach GIEMSA. 1 : 1600.
Abb. 5. Die körnige innere Substanz einer geschwollenen Zelle. Fixierung nach DUBOSQ—BRASIL—BOUIN, Färbung nach GIEMSA. 1 : 1800.
Abb. 6. Blassgefärbte, blasenartige Individuen. Fixierung nach DUBOSQ—BRASIL—BOUIN, Färbung nach GIMESA. 1 : 1600.
Abb. 7, 8. Entwicklung der körnigen Struktur der gigantischen Zellen und Zerfall der Zellen. Fixierung nach DUBOSQ—BRASIL—BOUIN, Färbung nach GIMESA. 1 : 1600.
Abb. 9. Nach Desintegration der Bakterienzellen zurückbleibende körnige Substanz. Fixierung nach DUBOSQ—BRASIL—BOUIN, Färbung nach GIEMSA. 1 : 1800.

Die Koloniemorphologie der alten Bouillonkulturen untersuchten wir auf weicher Agarplatte durch Zerstreuen. Drei verschiedene Kolonietypen traten regelmässig auf. Zwei derselben entsprachen in jeder Hinsicht charakteristischen *E. coli*-Kolonien in S- und R-Form. Der dritte Kolonietyp erschien von der 48. Stunde an in Form nadelstichgrosser Kolonien. Diese Kolonien wiesen auch kleine Nabelbildung auf. Bei der Überimpfung wuchsen aus ihnen regelmässige *E. coli*-Kolonien. Die winzigen nabeligen Kolonien erwiesen sich aber auch noch bei einer Weiterimpfung in einzelnen Ausnahmefällen als lebensfähig, jedoch nur dann, wenn wir nicht den sich über den Nährboden erhebenden Teil überimpften, sondern mit der Öse tiefergreifend die ganze Kolonie mit einem kleinen Agarstückchen auf die Oberfläche des neuen Nährbodens strichen. Dies scheint dafür zu zeugen, dass die in den Agar hineinwachsende Komponente nicht ganz die gleiche biologische Qualität aufweist wie der Teil der Kolonie, der über das Niveau des Nährbodens hinauswächst. Abb. 18 zeigt die in der zweiten Überimpfung wachsenden winzigen nabeligen Kolonien, die auf dem Bild deshalb etwas verzerrt erscheinen, weil sie durch das Agarstückchen photographiert wurden, mit welchem die Überimpfung erfolgte. Derartige Kolonien liessen sich nur in zwei Überimpfungen erhalten, später wuchsen aus ihnen stets wenige, aber regelmässige *E. coli* Kolonien. In den aus den winzigen Kolonien entnommenen Abklatschpräparaten sind polymorphe Gramnegative Stäbchen sichtbar. Es ist jedoch anzunehmen, dass der in den Agar hineinwachsende, aus viel polymorpheren Individuen bestehende Teil der Kolonien in diesen Abklatschpräparaten nicht enthalten ist.

Die Lebensfähigkeit der in alten Kulturen gebildeten bakteriellen Mikroformen. — Die Morphologie der Regeneration untersuchten wir in den mit Seitz EK-Filtraten geimpften Bouillonkulturen. Von unserem *E. coli*-Stamm wissen wir, dass die mit 3—4 seiner Zellen geimpfte Bouillon innerhalb von 48 Stunden reiches Wachstum aufweist. Infolgedessen verarbeiteten wir bei den Filtrationsversuchen mit solchen Filtratproben geimpfte Kulturen, bei denen das eben schon wahrnehmbare Bakterienwachstum nach 72 Studen in Gang kam. Makroskopisch betrachtet, ist in derartigen Röhren zunächst die Bildung eines sehr feinen pulverartigen Sediments zu sehen, wonach diffuse Opaleszenz entsteht. Wenn wir die Kulturen zu diesen Zeitpunkten öffnen und ohne Ausstreichen Präparate herstellen, ist ausserordentlicher Polymorphismus zu beobachten, der über kleine Kügelchen, deren Teilungserscheinungen, ihre Verlängerung und Vergrösserung zur Bildung kokkobazillärer Formen führt. Wird die Kultur nicht geöffnet, sondern weiterinkubiert, sehen wir 24—48 Stunden später kaum mehr Polymorphismus, vielmehr sind regelmässige Stäbchen im Übergewicht. Bei Überimpfung der im polymorphen Stadium befindlichen Kultur in Bouillon wächst innerhalb von 24 Stunden eine regelmässige, laktoseabbauende *E. coli*-Reinkultur.

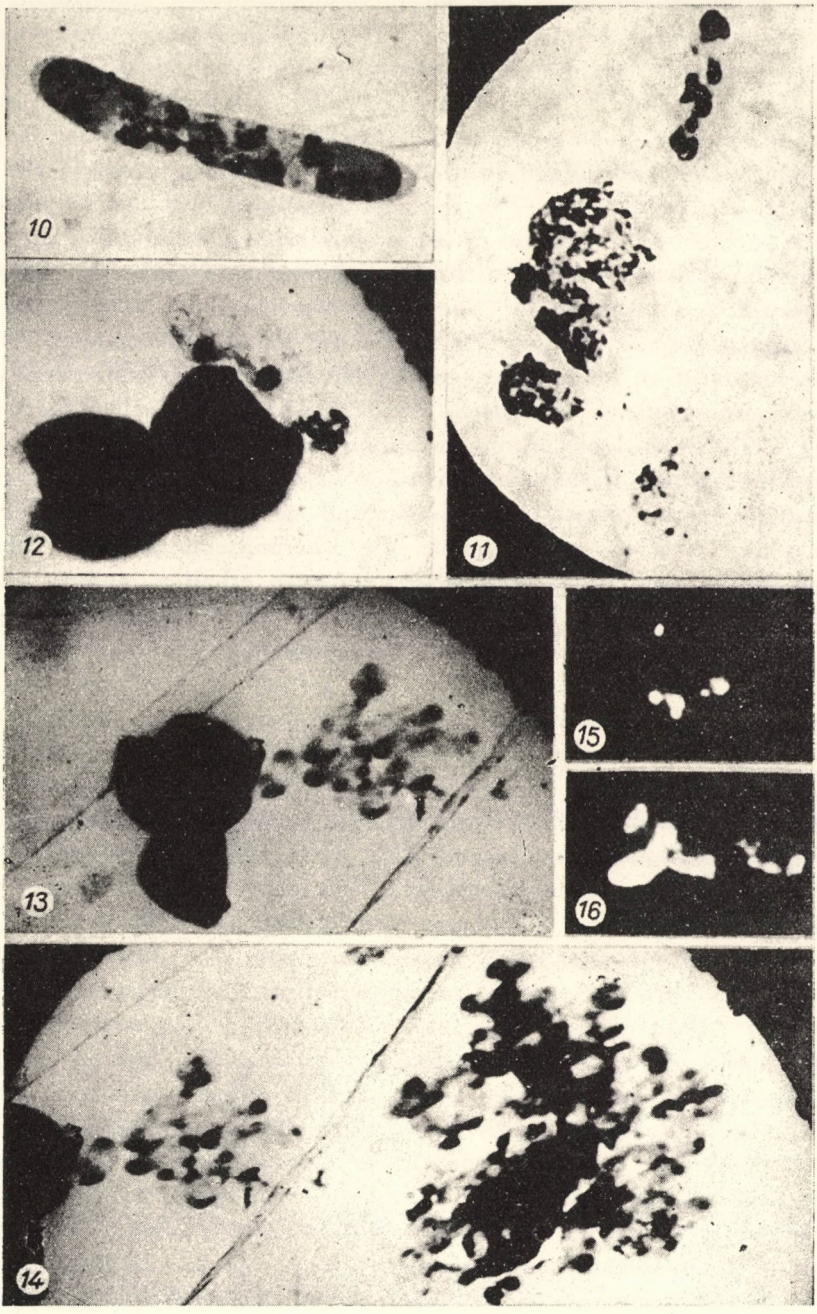


Abb. 10. Einschnürung aufweisende *E. coli*-Zelle aus einer alten Bouillonkultur mit zusammengeballter nuklearer Substanz. Elektronenmikroskopisches Präparat. 1 : 10 300.

Abb. 11. Die innere Substanz einer Bakterienzelle in grosse Klümpchen kondensiert; die andere Zelle ist völlig zerfallen. Elektronenmikroskopisches Präparat. 1 : 5000.

Abb. 19 und 20 wurden von der mit dem Filtrat einer alten Kultur geimpften Bouillonkultur im Frühstadium des gerade wahrnehmbaren Bakterienwachstums hergestellt. Wir sehen gut umschriebene kokkoide Partikelchen, ihre verlängerten Variationen sowie nach GIEMSA blassblau gefärbte plasmaartige Substanz. Die ausserordentliche Plastizität und der Polymorphismus der in Entwicklung befindlichen Partikelchen wird durch die Abb. 21 und 22

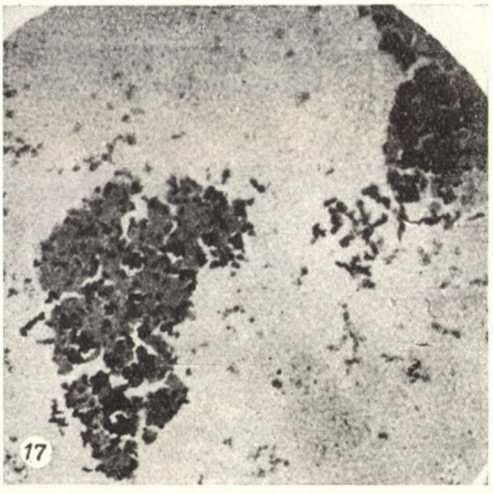


Abb. 17. Völliger Zerfall von Bakterienzellen; die elektronenundurchlässige Kernsubstanz ist zerfasert. Elektronenmikroskopisches Präparat. 1 : 10 000.

gut veranschaulicht. Abb. 23 ist bereits der bakterielle Charakter der Kultur zu entnehmen. Die zunehmende Stäbchenbildung ist recht anschaulich auf den Abb. 24 und 25 sichtbar, die aus dem Stadium der diffusen Opaleszenz stammen. Hier sind zusammen die an der Grenze der Sichtbarkeit befindlichen Granula in plasmatische Substanz eingebettet zu sehen, ferner die geschwollenen grossen Zellen, deren eiförmige und in Teilung befindliche Formen, die manchmal eine an den Buchstaben y erinnernde Form aufweisen, sowie auch sehr charakteristische Stäbchen. Abb. 26 zeigt ein elektronenmikroskopisches Präparat aus

Abb. 12. Infolge Ruptur der starren Zellwand tritt aus der rundlichen Bakterienzelle Plasmasubstanz aus; die Plasmasubstanz enthält in Klümpchen kondensierte Kernsubstanz. Elektronenmikroskopisches Präparat. 1 : 8500.

Abb. 13. Austritt der inneren Substanz der Bakterienzelle: die plasmatische Substanz enthält viele elektronenundurchlässige nukleare Klümpchen. Elektronenmikroskopisches Präparat. 1 : 10 000.

Abb. 14. Vollständige Desintegration einer Bakterienzelle. Die etwa 150—300 mμ Durchmesser aufweisenden nuklearen Klümpchen sind in Plasmasubstanz eingebettet und durch Plasmabrücken verbunden. Elektronenmikroskopisches Präparat. 1 : 10 000.

Abb. 15, 16. Aus desintegrierenden Bakterienzellen zurückbleibende Klümpchen. Elektronenmikroskopisches Präparat. 1 : 8000.



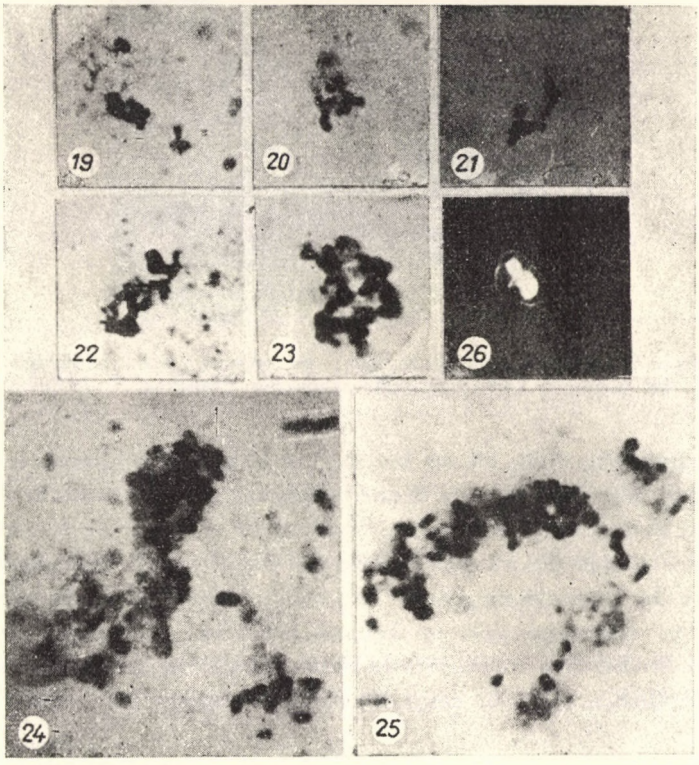


Abb. 18. Charakteristische L-Kolonien auf Weichagar aus alter *E. coli*-Bouillonkultur. 1 : 40.

Abb. 19, 20. Kokkoide und andere sehr plastische polymorphe Gebilde in dem mit dem Filtrat der alten Kultur beimpften Bouillonnährboden. Fixierung nach DUBOSQ—BRASIL—BOUIN, Färbung nach GIEMSA. 1 : 1600.

Abb. 21, 22. Der grosse Polymorphismus der aus dem Filtrat regenerierenden Partikelchen. Fixierung nach DUBOSQ—BRASIL—BOUIN, Färbung nach GIEMSA. 1 : 1600.

Abb. 23. Die Entwicklung der bakteriellen Eingenheiten in der aus dem Filtrat regenerierenden Kultur. Fixierung nach DUBOSQ—BRASIL—BOUIN, Färbung nach GIEMSA. 1 : 1600.

Abb. 24, 25. Die an der Grenze der Sichtbarkeit befindlichen Körnchen bilden über die polymorphen, an einzelnen Stellen kugel- oder Y-förmigen Elemente bis zu den stäbchenförmigen Bakterienzellen gleichsam eine kontinuie liche Reihe: die zunehmende Stäbchenbildung ist zu erkennen. Fixierung nach DUBOSQ—BRASIL—BOUIN, Färbung nach GIEMSA. 1 : 1600.

Abb. 26. Zellmembran rings um die aus dem Filtrat regenerierende bakterielle Mikroform. Elektronenmikroskopisches Präparat. 1 : 5000.

dem Frühstadium der Regeneration. Rings um das bakterielle Klümpchen ist hier auch bereits ein deutlich sichtbares membranartiges Gebilde vorhanden.

Impfen wir die Filtrate auf festen Nährboden (weichen Agar), so ist auf diesem nach wenigen Tagen bereits die Bildung weniger Kolonien mikroskopisch zu beobachten. Werden diese im durchfallenden Licht photographiert, sind die

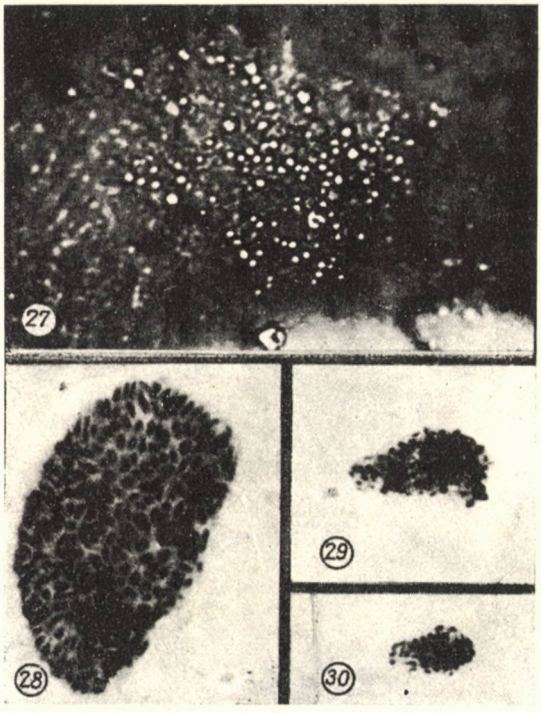


Abb. 27. Auf festem Nährboden aus dem Filtrat wachsende Mikrokolonie; die Umrisse gigantischer Zellen sind sichtbar.
Abb. 28, 29 und *30.* Abklatsch der aus dem Filtrat auf Weichagar gewachsenen Mikrokolonien. Neben zentralem Polymorphismus sind an den Randteilen bakterielle Eigenheiten deutlich sichtbar. Fixierung nach Dubosq—Brasil—Bouin, Färbung nach Giemsa. 1 : 1000.

Umrisse grosser, geschwollener Zellen zu entnehmen (Abb. 27). Wenn wir die Agarplatte nach Abimpfung des Filtrats mit sterilen Deckplatten bedecken (parzellieren), lässt sich die Morphologie der Mikrokolonien an den zeitweise abgehobenen, fixierten und gefärbten Deckplatten besser beobachten. Da auch diese Mikrokolonien in den Agar hineinwachsende Teile aufweisen, sind deren Elemente in diesen Präparaten bedauerlicherweise wiederum kaum enthalten. Die Abbildungen 28, 29 und 30 veranschaulichen Abdrücke von Mikrokolonien. Neben dem starken zentralen Polymorphismus der Zellen sind die bakteriellen Eigenarten an den Randteilen bereits deutlich zu erkennen. — Aus den Mikro-

kolonien wachsen schon bei der ersten Überimpfung charakteristische *E. coli*-Kolonien.

Um festzustellen, welche Grösse die zur selbständigen Reproduktion fähigen Partikelchen ungefähr aufweisen, nahmen wir an einer Gradokol-Membranserie *Filtrationsversuche* vor. Laut unseren mit Seitz EK-Schichten

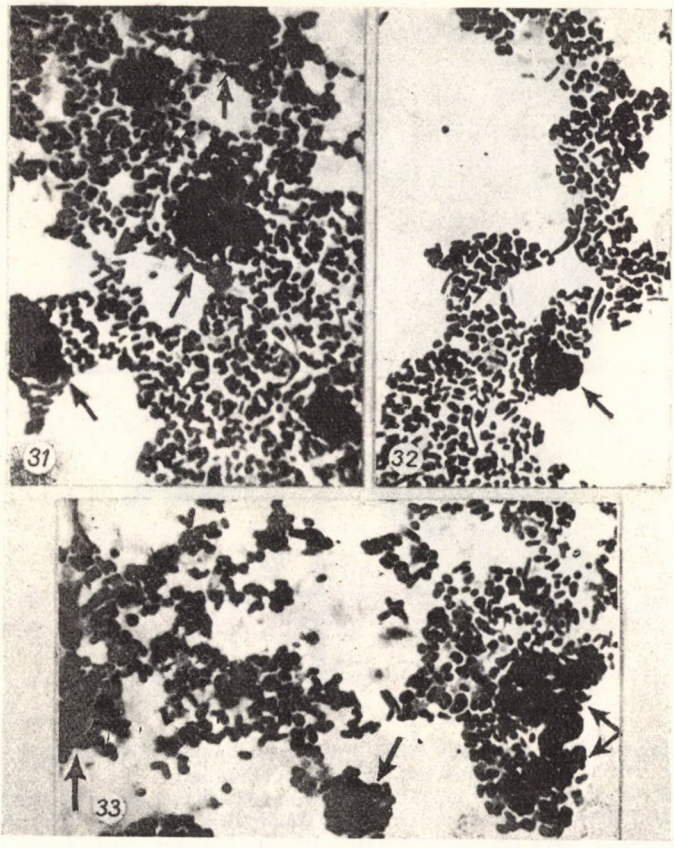


Abb. 31, 32 und *33.* Regeneration der *E. coli*-Kultur aus Filtrat auf der Agarplatte in Anwesenheit von *Sarcina lutea* (s. Pfeile). Auffallend ist der Polymorphismus der *E. coli*-Zellen. Abklatschpräparat. Färbung nach Gram. 1 : 1000

durchgeführten Filtrations-Vorversuchen wird die Regeneration durch die Zugabe einer jungen *Sarcina lutea*-Kultur zum Filtrat stimuliert (Vortrag auf der Wissenschaftlichen Fachsitzung des Staatlichen Instituts für Gesundheitswesen am 18. IV. 1955). Diese Frage untersuchten wir, indem wir das Filtrat in zwei Portionen teilten, einen Teil mit einigen Tropfen junger Sarcina-Kultur vermischten und 0,2 ml von den beiden Filtratproben in Röhrchen mit Bouillonkultur impften. Nach entsprechender Inkubation verglichen wir mit nach

GRAM gefärbten Ausstrichen die Anzahl der *E. coli*-Kulturen in den mit den beiden verschiedenen Filtratproben geimpften Kulturen. Ebensolche Versuche nahmen wir jetzt mit Gradokol-Membran-Filtraten vor. Die Versuchsergebnisse sind auf Tabelle I wiedergegeben.

Tabelle I

Filtrationsversuche mit alten E. coli-Kulturen

Porendurchmesser mμ	Filtrat	Filtrat + Sarcina lutea
900—1000	92	90
700—800	88	90
500—600	11	42
300—400	0	5
100—200	0	0

Nummern bedeuten die Regeneration der *E. coli*-Kulturen in den geimpften Bouillon-Nährböden in %; Zahl der mit je einem Filtrat geimpften Röhrchen war ungefähr 100—100.

Geschätzte Filtrationsendpunkte für »Filtrat« : etwa 450 mμ für »Filtrat + *S. lutea*«: etwa 300 mμ . Geschätzter Durchmesser der kleinsten regenerationsfähigen Partikelchen für »Filtrat«: 450 · 0,83 = 373 mμ, für »Filtrat + *S. lutea*«: 300 · 0,83 = 249 mμ (S.: D. E. LEA: Actions of Radiations on Living Cell, Cambridge, 1955, p. 103).

Das Ammenphänomen wollten wir auch auf festem Nährboden untersuchen, indem wir die mit zwei verschiedenen Seitz EK-Filtratproben geimpften Weichagar-Platten mit Deckgläser parzellierten, nach entsprechender Inkubation die Deckplatten entfernten, über der Flamme fixierten und nach GRAM färbten. Als wir die *E. coli*-Kolonien mikroskopisch zu zählen begannen, sahen wir, dass das Wachstum der *E. coli* in Anwesenheit von *Sarcina lutea* nicht in isolierten Kolonien, sondern diffus auf der ganzen Nährbodenoberfläche vor sich geht. Dies ist vielleicht darauf zurückzuführen, dass die Oberfläche des Nährbodens unter den Deckplatten nicht trocknet, so dass das Wachstum ungehindert diffus vor sich gehen kann. Trotzdem ist bemerkenswert, dass gleichzeitig aus der *Sarcina lutea*freien Filtratprobe die üblichen wenigen, separierten Mikrokolonien wuchsen. Die Abbildungen 31, 32 und 33 zeigen die Regeneration der polymorphen, aber bereits entschieden bakteriellen Charakter aufweisenden *E. coli*-Kultur auf der Agarplatte, unter Deckplatten, aus dem Filtrat einer alten Kultur, in Anwesenheit von *Sarcina lutea*.

Besprechung

Zur Bewertung unserer Ergebnisse erscheint es am zweckmässigsten, wenn wir vom Vergleich der Mikroformen der Pleuropneumonie-Organismen, der L-Formen und der im Sinne früherer Beschreibungen verstandenen

Tabelle II

Vergleich der Mikroformen der Pleuropneumonie-Organismen, der L-Formen sowie der filtrierbaren Formen

Vergleichende Angaben	Pleuropneumonie-Mikroorganismen	L-Formen	Filtrierbare Formen
Filtrierbarkeit	ja [6]	ja [16, 34] nein [3, 18]	ja [10, 11, 13, 14, 15, 20, 29]
Zellwand	nicht vorhanden [17]	nicht vorhanden [12, 24] vorhanden [30, 33]	nicht vorhanden [15]
Bildung in der Bouillon	ja [5]	nein [3] ja [1]	ja [10, 11, 15, 29]
Morphologie und ihr Verhältnis zu den Makroformen	Die Elementarkörper sind mit Plasmasaum umgebene nukleare Partikelchen; entstehen aus den Makroformen	Die Mikroformen sind mit Plasmasaum umgebene nukleare Partikelchen; entstehen aus den Makroformen	Bakterielle nukleare Klümpchen, in Plasmasubstanz eingebettet [4]; bilden sich aus den Makroformen
Wirksamkeit der Ammenmethode	ja [22]	nicht untersucht	ja [31] nein [26]
Koloniemorphologie, makroskopisch	klein, nabelartig, hineinwachsend [5]; pathogene Stämme wachsen nur in Anwesenheit von Serum, Saprophytenstämme auch ohne Serum	klein, nabelartig, hineinwachsend [3]; die kleinen (»3A«, DIENES) Kolonien wachsen nur auf weichem Serumagar	glasartig, wassertropfenartig, durchsichtig, sehr klein, abwaschbar [10]; können auch ohne Anwesenheit von Serum wachsen
Koloniemorphologie, mikroskopisch	hefepilzartige, aneinander gedrückte grosse Zellen, kleine Körnchen [5, 21]	hefepilzartige, aneinandergedrückte grosse Zellen, kleine Körnchen. Bakterielle Eigenheiten erkennbar [8,16,23,27]; nicht erkennbar [3]	ausserordentlich polymorphe Individuen: plastische grosse Zellen, Kugeln, kleine Körnchen [10, 20, 29]
Wachstumsgeschwindigkeit	rasch [5] manchmal langsam [19]	rasch [3] langsam [16]	langsam [10, 11, 14]
Kontinuierlichkeit der Bildung	ständig, als Entwicklungsstadium [5]	unter ungünstigen Umständen [3, 34]	unter ungünstigen Umständen [10, 20]; ständig, als Entwicklungsstadium [15]
Rückbildung zur normalen Bakterienkultur	niemals [5]	gewöhnlich leicht, seltener nicht (Stabilisierung in L-Form) [3, 21]	nach mehreren Nährboden- oder Tierpassagen ja [10, 11, 13, 16]; manchmal nicht (9]

Vergleichende Angaben	Pleuropneumonie-Mikroorganismen	L-Formen	Filtrierbare Formen
Penicillin	wirkungslos [25]	wirkungslos [25]	nicht untersucht
Neutralisierung mit Immunserum	positiv [5]	positiv [3, 5]	nicht untersucht

filtrierbaren Formen ausgehen. Diesem Zweck soll — in sehr einfacher Form — Tabelle II dienen.

Als Vergleichsgrundlage lässt sich unsere Tabelle nur unter Berücksichtigung dessen akzeptieren, dass sich die einzelnen Angaben nicht auf die L-Formen bzw. filtrierbaren Formen derselben Mikroorganismen beziehen. Bei den L-Formen gelten die meisten Angaben für die am eingehendsten untersuchten *B. proteus*, bei den filtrierbaren Formen auf Grund der sehr gründlichen Untersuchungen HADLEYS für Shigella. Wie aus Tabelle II hervorgeht, beziehen sich die gegensätzlichen Auffassungen hauptsächlich auf die Zellwand, die Filtrierbarkeit, die Koloniemorphologie, die Wirksamkeit der Ammenmethode und die abweichenden Eigenheiten der Bouillonkulturen. Unser Material liefert gerade zu diesen strittigen Punkten neue Angaben.

Die auf Abb. 18 sichtbare Kolonie, die wir bei der Weiterimpfung der alten Bouillonkultur gewannen, ist auch nach der Deutung von DIENES eine typische L-Kolonie. Mikroskopisch besteht sie aus polymorphen Zellen. Gleichzeitig besteht kein Zweifel, dass sie durch in der Bouillon gebildete bakterielle Elemente zustande gebracht wurde. Diese alte Bouillonkultur ist auch filtrierbar. Das Ausmass des kleinsten regenerationsfähigen Partikelchens beträgt etwa 400 mμ. Die Filtrierbarkeit der Partikelchen wird offenbar durch ihre ausserordentliche Plastizität ermöglicht ; wie auf einigen unserer Bilder, insbesondere auf den das Phänomen des Plasmaaustritts zeigenden (Abb. 12, 13 und 14) sichtbar, weist die die Bakterienzellen verlassende Substanz keine Zellwand auf. Die Zellwand entsteht nur im Frühstadium der Regeneration (Abb. 26). Die Ammenmethode erweist sich zur Stimulierung der Regeneration als wirksam ; nicht nur sind mehr Partikelchen imstande, sich in Anwesenheit von *Sarcina lutea* zu regenerieren, sondern auch etwas kleinere Partikelchen als die auch selbständig regenerationsfähigen.

Mit den Filtrations- und den Ammenmethodenversuchen müssen wir uns noch gesondert beschäftigen. Vor allem ist zu sehen, dass selbst bei den mit verhältnismässig beträchtlicher Porengrösse gewonnenen Filtraten keine 100%-ige Regeneration stattfindet. Daraus geht hervor, dass nur ein kleiner Teil der in alten Kulturen sichtbaren Mikroformen regenerationsfähig ist — im Gegensatz zum Pleuropneumonie-Organismus, wo wir auch die Verdün-

nungen 10^{-7} — 10^{-8} des Kulturfiltrats (Membran mit 300 — 400 mμ durchschnittlichem Porendurchmesser) regenerationsfähig fanden. Wahrscheinlich ist das Material der völlig zerfallenen Zellen, in dem die nuklearen Elemente fast zerfasert zu sehen sind, lebensunfähig (Abb. 17.); diese Substanz muss nämlich auch durch ganz kleine Poren treten. Ferner ist zu sehen, dass die Ammenmethode nur bei der Regeneration der ausgesprochenen Mikroformen als wirksamer Stimulationsfaktor in Frage kommt, bei der Regeneration der mittelgrossen Elemente jedoch indifferent ist. Den durchschnittlichen Porendurchmesser der vom Gesichtspunkt der Ammenmethode kritischen Membran mit 300—400 mμ Porendurchmesser haben wir durch Berechnung mit 311 mμ festgestellt. Im Filtrationsversuch hat jedoch diese Membran den Newcastle-Virus mit einem Partikelchendurchmesser von 150—200 mμ leicht und den Vaccinia-Virus mit einem Partikelchendurchmesser von 225—250 mμ gerade noch durchgelassen. Beim letzteren Virus bildete die nicht filtrierte Substanz in 10^{-1} Verdünnung an der Chorioallantoismembran des Hühnerembryos durchschnittlich mehr als 20 Herde ; nach der Filtration bildete das Ausgangsmaterial im Durchschnitt in zwei Membranen einen Herd. Der durchschnittliche Porendurchmesser liegt daher 400 mμ näher als 300 mμ. Dementsprechend kann der Durchmesser des durch diese Membran tretenden grössten Partikelchens *höchstens* etwa 300 mμ betragen ; diese Partikelchen regenerieren in Bouillon nicht selbständig, in Anwesenheit von *Sarcina lutea* jedoch in vereinzelten Fällen. Noch kleinere Partikelchen sind keinesfalls lebensfähig. Es scheint, demnach, als ob die Regenerationsfähigkeit an so hochmolekuläre Partikelchen, d. h. richtiger nicht an solche von molekulärer Dimension, sondern an die bereits in die Kategorie der Zellorgane gehörende *Partikelchen* gebunden ist, deren Fehlen die Ammenmethode nicht zu ersetzen vermag.

Aus den elektronenmikroskopischen Bildern folgern wir, dass diese Gebilde nur die die Elektronen nicht durchlassenden nuklearen Klümpchen sein können. Die Regenerationsfähigkeit der Mikroformen kann man sich selbständig und in Anwesenheit von *Sarcina lutea* so vorstellen, wie aus Abb. 34 ersichtlich. Auf dieser Zeichnung ist zu sehen, dass die Mikroformen aus zellwandloser Plasmasubstanz bestehen, welche einen nuklearen Klumpen umschliesst. Bei entsprechender Porengrösse des Filters tritt die Mikroform intakt durch diesen und bleibt regenerationsfähig. Bei kleinerem Porendurchmesser tritt der nukleare Klumpen mit wenig und lädierter Plasmasubstanz hindurch ; im Laufe der Filtration kann sich die Plasmasubstanz abtrennen. In diesem Fall kann die Ammenmethode die Regenerationsfähigkeit noch zurückgeben ; vermutlich adsorbieren die Sarcina-Zellen die kleinen Partikelchen und lassen sie zeitweise an ihrem eigenen Stoffwechsel teilnehmen, zumindest aber bereichern sie den gemeinsamen Nährboden mit Eiweissbausteinen, Vitaminen und Atmungsfermenten, ferner können sie das pH und Redoxpotential in günstiger Richtung verändern. (Die Morphologie und Biochemie dieser Frage bean-

sprucht naturgemäss noch zahlreiche Untersuchungen.) Schliesslich tritt durch Filter mit kleiner Porengrösse nur Plasmasubstanz ; die funktionelle Einheit zwischen Kernsubstanz und Plasma wird unterbrochen und infolgedessen die in das Filtrat gelangte bakterielle Substanz lebensunfähig.

Der erste Prozess der Partikelchenregeneration muss notwendigerweise in der Zellmembranbildung bestehen. Die Oberfläche der die nuklearen Partikelchen enthaltenden Plasmakugeln verfügt offenbar in Form von Oberflächenspannung über freie Energie, die sich im Sinne des CARNOT-CLAUSIUSschen II. thermodynamischen Gesetzes in allen derartigen Fällen zu vermindern sucht.

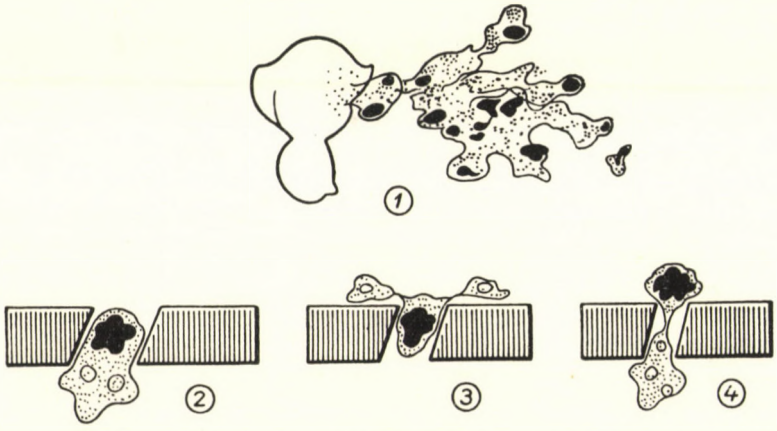


Abb. 34. (1) Austritt von Plasma- und Kernsubstanz aus einer geschwollenen Bakterienzelle ; die frei gewordene Substanz gliedert sich in bakterielle Mikroformen. (2) Filtration der Mikroformen durch einen Filter mit grosser Porengrösse, die völlig intakt durchtretenden Partikelchen sind auch selbständig regenerationsfähig. (3) Durch den Filter mit mittelgrosser Porengrösse gelangt das Partikelchen nur mit lädierter Plasmasubstanz ; bei Anwendung der Ammenmethode kann es noch regenerationsfähig werden. (4) Durch den Filter mit kleiner Porengrösse tritt nur Plasmasubstanz, der nukleare Klumpen bleibt zurück ; auch bei Anwendung der Ammenmethode besteht Unfähigkeit zur Regeneration

Die Senkung der Oberflächenspannung kann aber nur dann eintreten, wenn sich die die Oberflächenspannung vermindernden Substanzen aus dem Innern des Kügelchens an der Oberfläche sammeln. Derartige Stoffe sind verschiedene Seifen und Lezithine ; diese sind im bakteriellen Plasma stets in diffusiblem Zustand enthalten. Indem sich diese notwendigerweise an der Oberfläche sammeln, bilden sie die Zellmembran, d. h. eine Grenzoberfläche, die über die Fähigkeit des Emulsionsumschalgs verfügt und bereits zur selektiven Adsorption imstande ist. Für die Gestaltung eines selbständigen und synthetischen Stoffwechsels dieser Partikelchen stellt dies eine sehr wesentliche Voraussetzung dar. Dementsprechend verfügen — im Vergleich zu den frisch entleerten Plasmapartikelchen — die in Entwicklung befindlichen Kügelchen bereits über eine Zellmembran. Die Gestaltung der Zellwand, Kapselsubstanz oder Flagellen ist bereits ein viel komplizierterer Prozess, der unter streng spezifischer gene-

tischer Kontrolle steht (z. B. die Transformations-Desoxyribonukleinsäuren und die Pneumokokken-Kapselsubstanz). Auffallend ist jedenfalls, dass man gerade im Zusammenhang mit der Regeneration der bakteriellen Mikroformen bakterielle Typusveränderungen (Oberflächen-Antigenveränderungen) beobachten kann [14]. Nach Literaturangaben ist bei den aus der Zelle tretenden Mikroformen keine [12], bei den Makroformen hingegen eine Zellwand vorhanden [30, 33].

Untersuchen wir nunmehr Tabelle II unter Berücksichtigung unserer Resultate, können wir feststellen, dass die Eigenschaften der Mikroformen der L-Formen und der im Sinne der früheren Beschreibungen verstandenen filtrierbaren Formen einander bedeutend näherkommen. Diese bakteriellen Mikroformen lassen sich gemeinsam so charakterisieren, dass es sich um kleine Partikelchen aus Plasma- und Kernsubstanz handelt, von denen aus einer vergrösserten Bakterienzelle viele entstehen können. Der Pleuropneumonie-Gruppe gegenüber besteht der grundlegende Unterschied, dass neben dieser Vermehrungsart auch die bakterielle Vermehrungsart der Zweiteilung vorkommt. Bei *E. coli* lassen die quantitativen Verhältnisse die Annahme zu, dass sehr selten unter vielen Millionen Bakterienzellen bei einzelnen die Fähigkeit in Erscheinung tritt, sich auf eine von der Zweiteilung abweichende Art, durch Regeneration aus filtrierbaren Mikroformen zu vermehren. Diesen Prozess kann man als pleuropneumonieähnliche Vermehrung bezeichnen, da es keinen grundsätzlichen Unterschied bedeutet, dass die Mikroformen in diesem Fall grösser sind als die elementaren Partikelchen der Pleuropneumonie-Mikroorganismen (aber nur im gleichen Sinne, wie wir die Krankheitserreger sowohl der Pocken wie der Influenza als Viren bezeichnen, obwohl ihre Ausmasse sehr verschieden sind).

ZUSAMMENFASSUNG

In alten *E. coli*-Bouillonkulturen gehen für L-Formen kennzeichnende morphologische Veränderungen vor sich. Aus den geschwollenen Bakterienzellen treten nukleare Substanz enthaltende Plasmakügelchen ohne Zellwand aus. Unter den durch die Kollodiummembran mit durchschnittlich 500—600 mμ Porendurchmesser tretenden Partikelchen sind einige regenerationsfähig. Die Regeneration wird durch die Anwesenheit von Sarcina lutea gefördert.

Die L-Formen des untersuchten Bakterienstammes unterscheiden sich nicht wesentlich von den filtrierbaren Formen der früheren Beschreibungen; die Regeneration von Bakterienzellen aus Mikroformen lässt sich als pleuropneumonieähnliche Vermehrung bezeichnen.

LITERATUR

1. Carrère, L., Roux, J., Mandin, J.: C. R. Soc. Biol. 2050 (1954).
2. Dienes, L.: Proc. Soc. exp. Biol., **42**, 636 u. 773 (1939).
3. Dienes, L., Weinberger, H. J.: Bact. Rev., **15**, 245 (1951).
4. Drobotko, V. G.: (Дроботько, В. Г.: О полиморфизме бактерий. Труды научной конференции, Киев. 1939. 28.)
5. Edward, D. G.: J. gen. Microbiol., **10/1**, 27 (1954).
6. Elford, W. J.: Handbuch der Virusforschung. Doerr, R., Hallauer, C. Springer, Wien. p. 159 (1938).

7. Fornosi, F.: Kísérl. Orvostud., **6**, 657 (1955).
8. Freundt, E. A.: Acta Path. Microbiol. Scand. **31**, 508 u. 561 (1952).
9. Guelin, A.: Ann. Inst. Pasteur, **84**, 562 (1953).
10. Hadley, P., Delves, E., Klimek, G.: J. infect. Dis., **48**, 1 (1931).
11. Hauduroy, P.: Les ultravirus et les formes filtrantes des microbes. Masson, Paris. 1929. — Ann. Inst. Pasteur, **86**, 395 (1954). — Presse Méd., **52**, 1079 (1955).
12. Höpken, W., Bartmann, K.: Zbl. Bakt. I. Orig., **162**, 372 (1955).
13. Jelin, V. L.: (Елин, В. Л.: Изменчивость микробов. Медгиз. Москва. 1954).
14. Juhász, I.: Acta Physiol. Hung. **5**, 261 (1954). — Biológiai Közlemények, **2**, 51 (1954).
15. Kalina, G. P.: (Калина, Г. П.: Развитие микробных клеток из доклеточного вещества. Госмедиздат, Киев. 1954.)
16. Klieneberger—Nobel, E.: Bact. Rev. **15**, 77 (1951). — Problèmes actuels de virologie. P. Hauduroy (ed.). Masson, Paris, p. 58 (1954).
17. Klieneberger-Nobel, E., Cuckow, F. W.: J. gen. Microbiol., **12**, 95 (1955).
18. Liebermeister, K.: Zbl. Bakt. I. Ref., **156**, 109 (1955).
19. Lecce, I. G., Morton, H. E.: J. Bact., **67**, 62 (1954).
20. Mellon, R.: J. Bact., **10**, 481 u. 579. (1925) — **11**, 203 (1926).
21. Minck, R.: Rev. Immunol., **19**, 86 (1955).
22. Morton, H. E., Smith, P. F., Leberman, P. R.: Proc. Soc. Exp. Biol., **72**, 328 (1949).
23. Oerskov, J.: Acta Path. Microbiol. Scand., **19**, 575 (1942).
24. Prittwitz-Gaffron von, J.: Naturwiss., **40**, 590 (1953).
25. Pulvertaft, R. J. V.: J. Path. Bact., **64**, 75 (1952). — **65**, 175 (1935).
26. Raettig, H. J.: Ärztl. Forsch., **8**, 333 (1954).
27. Sabin, A. B.: Bacterial and Mycotic Infections of Man. Dubos, R. J. (ed.). Lippincott, New York p. 621. (1952).
28. Shanahan, A., Tanner, F. W.: J. Bact., **55**, 535 (1948).
29. Sinkovics, J.: Acta Microbiol. Hung. **2**, 257 (1955).
30. Stempen, H.: J. Bact., **70**, 177 (1955).
31. Suknew, W. W., Wolferc, G. A.: Zbl. Hyg., **30**, 391 (1934).
32. Vadász, J., Juhász, I.: Acta Biol. Hung., **6**, 171 (1955).
33. Taubeneck, U.: Zbl. Bakt. I. Orig. **163**, 478 (1955).
34. Tulasne, R.: Nature, **164**, 876 (1949). — C. R. Soc. Biol., **143**, 286 u. 289 (1949). — **144**, 1200 (1950). — Symp. Cit. Batt. VI. Congr. Internat. Microbiol. Roma. 144 (1953).

DURCH DESOXYRIBONUKLEINSÄUREN INDUZIERTE VERÄNDERUNGEN BEI RHIZOBIEN

Von

R. BALASSA

Genetisches Institut der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest

(Eingegangen am 20. April 1956)

Wir berichteten wiederholt über Wechselwirkungen zwischen und innerhalb von Rhizobienarten, die zwischen der aufgeschlossenen Zellsubstanz des induzierenden Organismus und den lebenden Zellen des induzierten Organismus zustande kamen und zu Veränderungen der symbiotischen Eigenschaften, der Antigenstruktur, der Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika, einiger biochemischen Merkmale und des Kolonietypus führten (1, 2, 3). Im nachstehenden sei nun über jene Versuche berichtet, in denen anstatt der aufgeschlossenen Zellsubstanz Desoxyribonukleinsäure-Auszüge verwendet wurden.

Methodischer Teil

Stämme: $M_{(32)}$ *(Rh. meliloti)*, $Lu_{(31)}$ *(Rh. lupini)*, $J_{(38)}$ *(Rh. japonicum)*, im folgenden kurz M, Lu und J. Von diesen Stämmen konnte auf Grund früherer In-vivo-Transformationsversuche [3] angenommen werden, dass sie sich zu Transformationsveränderungen eignen. Aus allen drei Stämmen wurden — unter Anwendung steigender Streptomycin- (STRM-) Konzentrationen — auch STRM-resistente Varianten ausgebildet. Der der Stammesbezeichnung beigefügte Index bezeichnet den Grad der STRM-Toleranz (in μg/ml) des Ausgangsstammes bzw. der auf STRM ausgebildeten Variante.

Nährlösungen: Die Transformationen wurden bei allen drei Stämmen auf folgender Nährlösung durchgeführt: K_2HPO_4 — 3,6 g, KH_2PO_4 — 0,4 g, $MgSO_4$ (7 H_2O) — 0,05 g, NaCl — 0,5 g, Ferriammoniumzitrat — 4,0 mg, Biotin — 0,3 μg, Kaseinhydrolysat — 1 g, Glukose — 10 g, Aqua dest. ad 1000 ml, pH 7,0.

Die Pflanzenkulturen wurden auf modifiziertem THORNTONschen Nähragar durchgeführt [1].

Desoxyribonukleinsäure- (DNS-) Auszüge. Das bei den Pneumokokken übliche Verfahren [5] musste modifiziert werden, da die Resistenz der Rhizobien gegenüber Natriumdesoxycholat weit grösser als die der Pneumokokken ist. 24stündige Kulturen der rasch wachsenden, bzw. 48stündige Kulturen der langsam wachsenden Stämme wurden abzentrifugiert, in natriumzitrathaltigem (0,01 M) physiologischem NaCl resuspendiert (10^{12-13} Zellen/ml), worauf zu 10 ml Zellensuspension 2 ml 5%iges Natriumdesoxycholat gegeben wurde. Da die Zellaufschliessung bei 4° C und bei Zimmertemperatur auch so nicht befriedigend war oder sich sehr hinauszog und da festgestellt werden konnte, dass eine höhere Temperatur bei pH 7,0 die biologische Aktivität nicht vermindert, wurde im allgemeinen bei 50° C (1 Stunde) und bei ein oder zwei Stämmen bei 70° C (½ Stunde) aufgeschlossen. Auf diese Weise liess sich eine weit grössere Ausbeute als bei niedrigerer Temperatur erzielen. Nach der Aufschliessung wurde der Zellrückstand durch Zentrifugieren entfernt und der Supernatant mit 4fachem Volum Alkohol ausgefällt. Manchmal wurde die Alkoholausfällung fraktioniert vorgenommen; bei den hier zu besprechenden drei Stämmen erwies sich dies jedoch als überflüssig, weil die Fällung mit einem Glasstäbchen gut aushebbare und von den übrigen Fraktionen des Niederschlags gut unterscheidbare, charakteristische lange Fibrillen ergab. Diese wurden in physiologischer Koch-

salzlösung gelöst (Lösen und Ausfällen wurden gegebenenfalls mehrmals wiederholt) und nach SEVAG [6] enteiweisst. Die so erhaltenen Präparate waren Biuret-negativ, hatten eine hohe Viskosität und zeigten im Spektrophotometer in ultraviolettem Licht die charakteristische Adsorptionskurve. Die vollständige Enteiweissung wurde später wegen der damit verbundenen grossen Verluste weggelassen und die Anzahl der Ausschüttelungen mit Chloroform vermindert.

Die Präparate wurden unter einem 4fachen Volum Alkohol bei 4° C aufbewahrt. Sie behielten ihre Aktivität 1 bis 2 Monate unverändert bei.

Das Trockengewicht der aus 10^{13} Zellen gewonnenen Präparate betrug 20—30 mg. In unseren Versuchen liessen wir im allgemeinen 20—50 μg des DNS-Präparates auf 10^7 Zellen in 2 ml Nährlösung wirken.

Desoxyribonuklease (DNase): Es wurde ein kristallinisches Präparat der Firma C. Mann, New York, verwendet.

Transformationen : Der 20 Stunden hindurch (bei M 44 Stunden) vorgezüchtete Stamm wurde in einer Zellenkonzentration von 10^7/ml in 2 ml Nährlösung eingebracht. Die DNS wurde am Ende der Lag-Periode zugegeben (bei J 3, bei Lu 4, bei M 6 Stunden) und eine zweiundeinhalb durchschnittlichen Zellteilungen entsprechende Zeit lang wirken gelassen. Diese Zeitspanne bezeichnen wir im nachstehenden als einen Transformationszyklus. Eine kürzere Einwirkung als diese zeitigte schlechtere Ergebnisse, während sich eine längere nicht als wesentlich erfolgreicher erwies (4).

Die transformative Ausbildung der *STRM-Resistenz* wurde nach der in (4) angegebenen Methode mit der Zahl des STRM-tolerierenden Anteiles der Gesamtpopulation gemessen. Diese Zahl wurde auf die identischen Werte der nichttransformierten Kontrolle bezogen und der Grad der transformativen Umwandlung grössenordnungsgemäss als Index der Verschiebung ausgedrückt.

Die transformative Ausgestaltung der *Knöllchenbildungsfähigkeit* wurde auf die bereits beschriebene Weise (1) in Pflanzenkulturen untersucht.

Experimenteller Teil

A) *Die transformative Ausbildung der STRM-Resistenz* wurde bei allen drei Stämmen mit der DNS der homologen STRM-resistenten Variante und den resistenten Varianten der anderen zwei Stämme induziert. Auf Grund der In-vivo-Transformation durfte nämlich angenommen werden, dass zwischen diesen Stämmen Wechselwirkungen stattfinden [3]. Ebenso konnte angenommen werden, dass der Grad der sich in einem transformativen Zyklus ausbildenden Resistenz bloss sehr niedrig ist, da die drei Stämme auch in Gegenwart von STRM nur sehr langsam und stufenweise eine Resistenz ausbilden und da eine Analogie zwischen diesen beiden Mechanismen von uns bereits festgestellt wurde [2]. Der Index der Verschiebung wurde deshalb in niedrigen STRM-Konzentrationen gemessen.

Auf DNS-Einwirkung der resistenten Varianten kommt es bei allen drei Stämmen zu einer deutlichen Verschiebung in der Zahl der STRM-resistenten Zellen (Tab. I). Diese ist bei J eine 1000fache, bei Lu eine 100—1000fache und bei M eine 10 000fache. Sie ist bei J unabhängig davon, ob sie durch die DNS der homologen oder die der heterologen Variante ausgelöst wird. Der limitierende Faktor ist hier also nicht die DNS, sondern die — genetisch oder physiologisch — begrenzte Transformabilität des Stammes.

Die DNS des Grundstammes ruft keine Veränderung hervor. Die Aktivität der DNS der resistenten Varianten wird durch DNase sofort zum Stillstand gebracht. Wie bereits erwähnt, war eine Wechselwirkung zwischen den drei Stäm-

Tabelle I

Ausbildung der STRM-Resistenz auf Einwirkung von DNS bei verschiedenen Rhizobiumstämmen

Index: Zahl der STRM-resistenten Zellen der mit DNS behandelten Population (grössenordnungsgemäss) bezogen auf e i n e STRM-resistente Zelle des Ausgangsstammes bei J auf 0,3 μg/ml STRM, bei M auf 0,2 μg/ml und bei Lu auf 10 μg/ml. DNase wurde vor Beginn der Zellteilung hinzugefügt. /: nicht geprüft.

DNS	Index		
	$J_{0,1}$	$M_{0,1}$	Lu_2
—	1	1	1
$J_{0,1}$	1	/	/
$M_{0,1}$	/	1	/
Lu_2	100—1000	/	1
J_{100}	1000	10—100	/
M_{500}	1000	10 000	/
Lu_{10000}	100	/	1000
J_{100} + DNase	1	1	/
M_{500} + DNase	1	1	/
Lu_2 + DNase	1	1	/
$Lu_{10\,000}$ + DNase	1	/	1

men zu erwarten. Trotzdem stellte sich die Frage, ob nicht die DNS jedes STRM-resistenten Rhizobiums eine gesteigerte Resistenz verursacht. Das negative Ergebnis eines Versuches mit den DNS-Auszügen einiger anderer STRM-resistenter Rhizobien [4] zeigte jedoch, dass die transformative Verschiebung nur in spezifischen Kombinationen zustande kommt. (Bei den In-vivo-Transformationen, auf Grund derer die hier untersuchten drei Stämme ausgesucht wurden, bestand das Ziel gerade in der Selektion solcher Kombinationen.)

Da J von den anderen zwei Stämmen gut unterscheidbare Kolonien bildet [3], wurden die auf STRM selektierten transformierten Zellen auf Platten gestrichen. Der Kolonietyp blieb in allen Kombinationen unverändert, auch in jenen, in denen heterologe DNS verwendet wurde. Es muss also angenommen werden, dass Änderungen des Kolonietyps in nachweisbarer Zahl entweder überhaupt nicht oder von der Ausbildung der STRM-Resistenz unabhängig auftreten und so auf STRM eliminiert wurden.

B) *Die transformative Ausbildung der Knöllchenbildungsfähigkeit* wurde in vier Kombinationen untersucht: am Stamme J nach Induktion mit der DNS von $M_{0,1}$ und M_{100} und am Stamme Lu nach Induktion mit denselben zwei DNS-Auszügen.

Die Transformationen wurden in der bereits beschriebenen Weise in vitro ausgeführt. Mit den nach DNS-Einwirkung erhaltenen Suspensionen wurden die steril gezogenen Pflanzenkulturen zur Zeit des Erscheinens der ersten Blät-

ter beimpft. Eine Serie wurde mit einer Suspension beimpft, die die auf STRM selektierten Zellen des mit der DNS von M_{100} induzierten $J_{0,1}$ enthielt.

Kontrollreihen sollten den Beweis erbringen, dass :

a) die lebenden Zellen von J und Lu allein keine Knöllchen auf Luzerne bilden,

b) die DNS-Präparate von M keine lebenden M-Zellen enthalten und deshalb allein zu keiner Knöllchenbildung führen (die Präparate wurden in 10facher Konzentration zugegeben),

c) der DNS-Auszug des auf Luzerne keine Knöllchen bildenden Ausgangsstammes keine Knöllchenbildung induziert,

d) DNase die biologische Aktivität des DNS-Auszuges aufhebt.

Tabelle II bringt die Zusammenfassung von drei Versuchsreihen. Aus den Angaben der Tabelle lassen sich folgende Feststellungen machen:

Tabelle II

Durch DNS-Auszüge von M induzierte Knöllchenbildung des Stammes $J_{0,1}$ auf Luzerne

8.—9. Reihe : DNase am Anfang der Lag-Periode (nach 0 Stunden) zugesetzt
10. Reihe : DNase nach zwei Zellteilungen (nach 4 Stunden) zugesetzt

Versuchsreihe	DNS	Transformierter Stamm	Zahl der		%
			beimpften	knöllchenbildenden	
			Pflanzen		
1	$M_{0,1}$	$J_{0,1}$	40	8	20
2	M_{100} praep. a)	$J_{0,1}$	15	15	100
3	M_{100} » b)	$J_{0,1}$	56	16 (+1)*	28,5
4	M_{100} » b)	$J_{0,1} \rightarrow STRM \rightarrow J_{0,5}$	20	—	—
	Kontrollen				
5	$M_{0,1}$	—	10	—	—
6	M_{100} praep. a)	—	10	—	—
7	M_{100} praep. b)	—	10	—	—
8	$M_{0,1}$ + DNase (nach 0 Stunden) .	$J_{0,1}$	20	—	—
9	M_{100} + DNase (nach 0 Stunden) a)	$J_{0,1}$	20	—	—
	M_{100} + DNase (nach 0 Stunden) b)	$J_{0,1}$	20	—	—
10	M_{100} + DNase (nach 4 Stunden) ..	$J_{0,1}$	20	4	20
11	$J_{0,1}$	$J_{0,1}$	10	—	—
12	—	$M_{0,1}$	20	18	90
13	—	M_{100}	10	8	80
14	—	$J_{0,1}$	10	—	—
15	—	—	10	—	—

* Spät gebildete, ineffektive Knöllchen

Die DNS-Auszüge von $M_{0\,1}$ und M_{100} induzieren die Ausbildung von J-Varianten, die auf Luzerne Knöllchen bilden (1., 2. und 3. Reihe). Die Knöllchen entstehen zur gleichen Zeit wie jene der als Kontrolle mit lebenden $M_{0,1}$ Zellen geimpften Pflanzen. An einigen nicht aufgearbeiteten Pflanzen konnte beobachtet werden, dass sie auch die gleiche Effektivität aufweisen. Die mit der DNS von M_{100} transformierten, auf STRM selektierten Zellen von $J_{0,1}$ bildeten keine Knöllchen (4. Reihe). Mit DNase abgebaute DNS zeigte keine transformative Wirkung, vorausgesetzt, dass das Enzym vor Einbau der DNS zugesetzt wurde (8., 9. und 10. Reihe). Der Effekt der DNS von $M_{0\,1}$ und M_{100} ist als spezifisch anzusehen, da die eigene DNS von $J_{0,1}$ keine Knöllchenbildung induzierte (11. Reihe).

Die Möglichkeit, dass die sich in vitro als steril erwiesenen DNS-Präparate dennoch lebende Zellen enthielten, kann auf Grund folgender Tatsachen ausgeschlossen werden :

a) In keiner der Reihen, die nur DNS enthielten, bildeten sich Knöllchen aus (5., 6. und 7. Reihe).

b) Mit enzymatisch abgebauter DNS behandelter J zeitigte keine Knöllchenbildung (8. und 9. Reihe).

c) Ein und dasselbe DNS-Präparat führte bloss bei J zur Bildung effektiver knöllchenbildender Varianten, während die transformierten Varianten von Lu lediglich ineffektive Knöllchenansätze zeigten (siehe weiter unten).

d) Auch die nachstehende Analyse der STRM-Empfindlichkeit der gebildeten Varianten schliesst die Möglichkeit der Anwesenheit von lebenden Zellen aus.

Mit M-Auszügen behandelte Lu_2-Suspensionen bildeten erst nach 2—3-wöchiger oder noch grösserer Verspätung 1—2 sehr kleine, ineffektive Knöllchenansätze (Tabelle III). In der unbehandelten Kontrollreihe kam es zu keiner solchen Knöllchenbildung (7. Reihe).

Die knöllchenbildenden Varianten von $J_{0,1}$ wurden einige Tage nach dem Erscheinen der Knöllchen aus diesen isoliert.

24 Stunden nach dem Ausstreichen erschien eine kleine Anzahl von charakteristischen $J_{0,1}$-Kolonien, von denen etwa 15 untersucht wurden. Sowohl in ihrer Antigenstruktur als auch in ihrer STRM-Empfindlichkeit glichen sie dem Ausgangsstamm, also J, und bildeten in einem neuerlichen Pflanzenversuch keine Knöllchen. Es ist anzunehmen, dass diese Kolonien ursprünglichen ruhenden J-Zellen entstammen, die den Knöllchen anhafteten und die Desinfektion überlebten. In einem Falle erhielten wir jedoch auch mit einem solchen Isolat eine Knöllchenbildung ; hier handelte es sich um eine Kultur, die erst einige Wochen nach Erscheinen der Knöllchen isoliert wurde.

Nach 48—96 Stunden erschienen massenhaft Kolonien vom M-Typus. Diese erwiesen sich auch in ihrer Antigenstruktur als mit M identisch, sie agglutinierten nur mit M-Serum und bildeten in wiederholten Pflanzenversuchen

Tabelle III

Durch DNS-Auszüge von M induzierte Knöllchenbildung des Stammes Lu_2 auf Luzerne

Die Knöllchen der 1. und 2. Reihe sind im Vergleich zu denen der 3. und 4. (Kontroll-) Reihe mit mehreren Wochen Verspätung erscheinende, sehr kleine, spärliche, knöllchenansatzartige Gebilde

Versuchsreihe	DNS	Transformierter Stamm	Zahl der beimpften Pflanzen	Zahl der knöllchenbildenden Pflanzen	%
1	$M_{0,1}$	Lu_2	20	2	10
2	M_{100}	Lu_2	20	8	40
	Kontrollen				
3	$M_{0,1}$	—	s. Tabelle II		
4	M_{100}	—			
5	—	$M_{0,1}$			
6	—	M_{100}			
7	—	Lu_2	10	—	—
8	—	—	10	—	—

wiederum Knöllchen. Sie waren STRM-empfindlich, und zwar auch jene Kolonien, die sich in den mit DNS von M_{100} induzierten Transformationen gebildet hatten (Tab. IV).

Tabelle IV

Kolonietypus der knöllchenbildenden Varianten

Die Nr. der Versuchsreihen bezieht sich auf Tabelle II.

(J) : in neuerlichen Pflanzenversuchen keine Knöllchen bildende, vermutlich ruhende Zellen
J : Spätes Isolat, in einem neuerlichen Pflanzenversuch knöllchenbildend
S : STRM-empfindlich
R: STRM-resistent

Versuchsreihe	Kombination	Kolonietypus
1	DNS $M_{0,1}$ → $J_{0,1}$	(J) — M^S
2	DNS M_{100} a) → $J_{0,1}$	(J) — J — M^S
3	DNS M_{100} b) → $J_{0,1}$	(J) — M^S
	Kontrollen	
12	⊖ → $M_{0,1}$	M^S
13	⊖ → M_{100}	M^R

Die Versuche wurden mit zwei verschiedenen M_{100}-Präparaten dreimal nacheinander angesetzt. In keinem einzigen Falle konnten STRM-resistente

Varianten isoliert werden, dagegen wurden aus der mit lebenden M_{100}-Zellen beimpften Kontrollreihe (Tabelle IV, 13. Reihe) M_{100}-Kolonien erhalten.

Wie bereits erwähnt, bildeten die transformativ entstandenen STRM-resistenten Zellen keine Knöllchen (Tabelle II, 4. Reihe). Nun sehen wir, dass die knöllchenbildenden Varianten nicht STRM-resistent sind. Die beiden Umwandlungen spielen sich also unabhängig voneinander ab und schliessen sich innerhalb eines Transformationszyklus aus.

Die Varianten der Lu_2-Reihen, die bloss eine geringfügige Zahl von ineffektiven Knöllchenansätzen aufwiesen, wurden nicht näher untersucht.

Besprechung der Ergebnisse

In jenen früheren In-vitro-Transformationen, die wir zwischen zwei Stämmen verschiedener Art und verschiedener Aminosäure-Verwertungsfähigkeit durchführten und in denen die induzierende Komponente noch aufgeschlossene Zellsubstanz war [2], traten zwei verschiedene Mechanismen in Erscheinung. Diese beiden Mechanismen werden von KALINA scharf unterschieden [7]. Der eine Mechanismus trat unter Bedingungen auf, die die Adaptation der induzierten Art begünstigten, und führte zur Veränderung nur einer einzigen Eigenschaft (niedrige STRM-Resistenz), während der zweite unter Verhältnissen in Erscheinung trat, die für den induzierenden Stamm günstig waren, und zu einer völligen Angleichung an diesen führte. In den vorliegenden Versuchen treten die beiden Mechanismen wieder in analoger Weise in Erscheinung, wenngleich unter anderen Versuchsbedingungen. Der eine führt auch hier zur Ausgestaltung einer einzigen neuen Eigenschaft (niedrige STRM-Resistenz), und zwar unter gut erfassbaren und quantitativ verfolgbaren physiologischen Verhältnissen [4]. Der andere (Erwerb der Knöllchenbildungsfähigkeit) vermittelt das Bild einer vollständigen Regeneration des DNS spendenden Stammes mit Ausnahme der STRM-Resistenz. Dieser zweite Mechanismus bleibt auch weiterhin unklar und lässt sich quantitativ nicht verfolgen. Fest steht nur, dass beide Prozesse gleichzeitig und mit demselben DNS-Auszug auslösbar sind, dass jedoch innerhalb eines Transformationszyklus in denselben Zellen entweder nur der eine oder nur der andere Prozess stattfinden kann. Der vorherige enzymatische Abbau der DNS verhindert die Ausbildung beider Prozesse.

Von jenen äusserst mannigfaltigen Umwandlungen, die wir in den durch Zellsubstanz induzierten Transformationen [1, 2] bzw. in den In-vivo-Transformationen [3] beobachteten, konnten wir mit DNS-Auszügen vorläufig nur zwei reproduzieren. So konnte z. B. weder die Ausbildung einer hochgradigen STRM-Resistenz noch die einer gemischten Antigenstruktur nachgewiesen werden. Ebenso fehlen unter den knöllchenbildenden Varianten jene, die ihren ursprünglichen Kolonietypus beibehielten, von einem einzigen Fall — einem späten

Isolat — abgesehen. Dies bekräftigt unsere Auffassung, dass ein Grossteil der in den In-vivo-Transformationen eintretenden Veränderungen das Ergebnis mehrerer aufeinanderfolgender transformativer Schritte ist. Es ist jedoch auch möglich, dass es im Laufe der DNS-Extraktion zur Schädigung irgendeiner der heterogenen Komponenten kommt oder dass die mit DNS-Auszügen nicht reproduzierbaren Veränderungen keine Transformationsmechanismen im engeren Sinn, sondern die Ergebnisse anderer genetischer Wechselwirkungen sind.

*

An dieser Stelle sei B. GYŐRFFY für seine Ratschläge und kritischen Bemerkungen sowie Frau S. LETENAY für ihre Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen der beste Dank ausgesprochen.

ZUSAMMENFASSUNG

Desoxyribonukleinsäure-Auszüge eines *Rhizobium meliloti*-Stammes führen bei einem *Rh. japonicum*-Stamm zur Bildung von Varianten, die auf Luzerne effektive Knöllchen bilden, und bei einem *Rh. lupini*-Stamm zur Bildung von Varianten, die späte ineffektive Knöllchenansätze entwickeln.

Desoxyribonukleinsäure-Auszüge von Streptomycin-resistenten Rh.-Stämmen, bzw. deren Streptomycin-resistenten Varianten bilden aus Streptomycin-empfindlichen Stämmen Streptomicin-resistente Varianten aus. Innerhalb eines Transformationszyklus entsteht nur eine niedrige Resistenz. Diese ist in der Zahl der überlebenden Zellen messbar, die sich im Vergleich mit den analogen Werten des Ausgangsstammes um das 100—10 000fache erhöht.

Desoxyribonuklease bringt die biologische Aktivität der DNS-Auszüge zum Stillstand.

LITERATUR

1. BALASSA, R.: Agrártudományi Osztályközlemények **2**, 307 (1953).
2. BALASSA, R.: Acta Microbiol. Hung. **2**, 51 (1954).
3. BALASSA, R.: Naturwissensch. **42**, 422 (1955).
4. BALASSA, R.: Acta Microbiol. Hung. **IV**, 87 (1956).
5. EPHRUSSI-TAYLOR, H.: Exp. Cell. Res. **2**, 589 (1951).
6. SEVAG, M. G.: Biochem. Z. **273**, 419 (1934).
7. *Калина, Г. П.:* Вегетативная гибридизация и направленная изменчивость бактерий. Изд. мед. лит. УССР Киев, 1952.

EINIGE BEDINGUNGEN DER AUSBILDUNG EINER DURCH DESOXYRIBONUKLEINSÄUREN INDUZIERTEN NIEDRIGEN STREPTOMYCINRESISTENZ BEI RHIZOBIEN

Von

R. BALASSA

Genetisches Institut der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest

(Eingegangen am 20. April 1956)

Es wurde von uns nachgewiesen, dass sich an Rhizobien (Rh.) durch Desoxyribonukleinsäure- (DNS-) Auszüge von Stämmen anderer Rhizobienarten Knöllchenbildungsfähigkeit und eine niedrige Streptomycin- (STRM-) Resistenz ausbilden lassen. Im nachstehenden sollen einige Bedingungen der Ausbildung der STRM-Resistenz erörtert werden. Der grösste Teil der Untersuchungen wurde mit dem mit $J_{(38)}$ bezeichneten Stamm von *Rh. japonicum* durchgeführt, da sein rasches Wachstum mit grossen methodischen Vorteilen verbunden ist, obwohl der langsam wachsende Stamm $M_{(32)}$ von *Rh. meliloti* in der Zahl der STRM-tolerierenden Zellen eine weit grössere transformative Verschiebung zeigte. Bei den Stämmen $M_{(32)}$ und $Lu_{(31)}$ *(Rh. lupini)* beschränkten wir uns auf die Wiederholung der bei $J_{(38)}$ gemachten Beobachtungen.

Methodischer Teil

Stämme : Die auf Grund von In-vivo-Transformationen [2] ausgewählten Stämme $J_{(38)}$, $M_{(32)}$ und $Lu_{(31)}$ (im folgenden kurz J, M, Lu). Der der Bezeichnung des Stammes (der Variante) beigefügte Index gibt den Grad der STRM-Toleranz (in μg/ml) an.

DNS-Extraktion : s. (3).

DNS-Konzentration : Im allgemeinen, wo dies nicht anders angegeben ist, liessen wir 20—50 μg (Trockengewicht) DNS-Präparat auf 10^7 Zellen in 2 ml Nährlösung wirken. Um 10 μg zeigten schon viele Präparate eine verminderte Aktivität. Bei weniger als 1μg erwiesen sich nur 1—2 Präparate als wirksam.

Desoxyribonuklease (DNase) : Es wurde ein kristallinisches Präparat der Firma C. Mann, New York, verwendet.

Nährlösung : s. (3).

Transformationen : Die 20 Stunden (bei M 44 Stunden) vorgezüchteten Zellen wurden in 1,8 ml Nährlösung eingebracht, und zwar, wenn nicht anders angegeben, in einer Zellkonzentration von etwa 10^7/ml. Wo nicht anders angegeben, fügten wir am Ende der darauffolgenden Lag-Periode (bei J $1\frac{1}{2}$, bei Lu 2 und bei M 6 Stunden —29° C) die entsprechende Verdünnung der DNS in 0,2 ml Nährlösung hinzu und liessen sie eine zweiundeinhalb durchschnittlichen Zellteilungen entsprechende Zeit lang wirken. Vor und nach der Teilung bestimmten wir in flüssiger Nährlösung mit Hilfe der Verdünnungsmethode die wahrscheinlichste Zellenzahl. Aus der transformierten Suspension und ihrer 10^1—10^2—10^3-fachen Verdünnung wurden je 0,2 ml in Nährlösungen von verschiedener STRM-Konzentration verteilt. Die Verschiebung

wurde in jenen STRM-Konzentrationen gemessen, in denen der nichttransformierte Ausgangsstamm in der grössten angewandten Zellkonzentration noch Wachstum zeigte und in einer geringeren bereits nicht mehr. Dabei wurde die transformative Verschiebung dadurch ausgedrückt, um wieviel Grössenordnungen diejenige Konzentration niedriger war, in der die transformierte Suspension noch Wachstum zeigte. Wenn z. B. auf 0,3 μg/ml STRM $2{,}5 \cdot 10^6$ Zellen der DNS-freien Suspension noch Wachstum zeigten und 10^5 Zellen nicht mehr, die mit DNS transformierte Suspension hingegen bei Einbringung von 10^3 Zellen noch Wachstum zeigte und bei 10^2 Zellen nicht mehr, so wurde dies als 1000fache Verschiebung betrachtet und grössenordnungsgemäss durch den Index der transformativen Verschiebung ausgedrückt (im vorliegenden Fall 1000).

Nach der Standardisierung dieser Methode arbeiteten wir im allgemeinen nur noch mit drei Zellkonzentrationen.

Experimenteller Teil

Die Rolle der Zellteilung. Anfänglich verwendeten wir grosse Zellenmengen und erhielten auch dann serienweise negative Ergebnisse, wenn wir die DNS-Konzentration erhöhten. Erst die Verminderung der Zellkonzentration erwies sich als erfolgreich.

Tabelle I

Rolle der Zellkonzentration in der Transformabilität von $J_{0,1}$ (ausgedrückt im Index der Verschiebung)
a) Zahl der Zellen am Ende der Lag-Periode (bei Zugabe der DNS)
b) Zahl der Zellen 1½ Stunden später

DNS	Zahl der Zellen/ml a	Zahl der Zellen/ml b	Index (auf 0,3 μg/ml STRM)
— (Kontrolle)	$9{,}3 \times 10^3$	$9{,}3 \times 10^3$	1
— „	$9{,}3 \times 10^5$	$5{,}9 \times 10^6$	1
J_{100}	$9{,}3 \times 10^8$	$9{,}3 \times 10^8$	10
„	$9{,}3 \times 10^7$	$9{,}3 \times 10^7$	10
„	$9{,}3 \times 10^6$	$5{,}4 \times 10^7$	100
„	$9{,}3 \times 10^5$	$5{,}4 \times 10^6$	1000
„	$9{,}3 \times 10^4$	$5{,}4 \times 10^5$	1000
$J_{0,1}$ (Kontrolle)	$2{,}3 \times 10^8$	$2{,}3 \times 10^8$	1
„ „	$2{,}3 \times 10^4$	$1\,8 \times 10^5$	1
Lu_2	$2{,}3 \times 10^8$	$2{,}3 \times 10^8$	1
„	$2{,}3 \times 10^6$	$1{,}8 \times 10^7$	1000
„	$2{,}3 \times 10^4$	$1{,}8 \times 10^5$	1000

Aus Tabelle I geht hervor, dass sich ausgeprägte transformative Verschiebungen nur dann ergaben, wenn die Zellkonzentration 10^7 oder weniger betrug. Gleichzeitig ist auch ersichtlich, dass in den höheren Zellkonzentrationen, die nicht mehr zu Verschiebungen führten, während der andert-

halb Stunden zwischen dem Ende der Lag-Periode und dem Testen (Einbringung in STRM) keine Zellteilung stattfand. Der Zusammenhang zwischen der Zellteilung und der Zellkonzentration ist in Abb. 1 dargestellt.

Die Teilung setzt bei jeder Zellkonzentration nach einer gleich langen Latenzperiode ein, gibt jedoch (in den ersten 3 Stunden) nur bei Konzentrationen von 10^7 und weniger exponentielle Werte.

Die DNS übt also nur in solchen Zellkonzentrationen eine biologische Aktivität aus, die eine exponentielle Teilung ermöglichen.

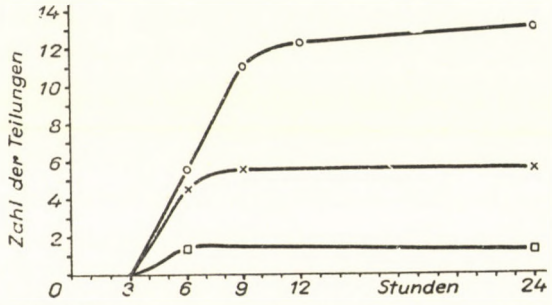


Abb. 1. Abhängigkeit der Zellteilung von verschiedenen Ausgangszellkonzentrationen bei $J_{0,1}$
Nährlösung: 2 ml
—o— $3{,}8 \times 10^5$ Zellen/ml
—×— $3{,}8 \times 10^7$ „
—□— $3{,}8 \times 10^8$ „

Der Zusammenhang zwischen DNS-Aktivität und Zellteilung geht auch aus Tabelle II hervor. Hier wurde die DNS zu $2{,}5 \cdot 10^7$ Zellen am Anfang der Lag-Periode hinzugefügt und die Verschiebung in verschiedenen Wachstumsperioden gemessen.

Tabelle II

DNS-Einwirkung auf $J_{0,1}$ in verschiedenen Wachstumsabschnitten ($2{,}5 \times 10^7$ Zellen/ml)
a) Mit DNS-Auszug von J_{100} behandelte Zellen
b) Mit DNS-Auszug von Lu_2 behandelte Zellen
c) Unbehandelte Zellen

Dauer der DNS-Einwirkung	Zahl der Teilungen	Index (auf 0,3 µg/ml STRM) a	b	c
10 Minuten	—	1	1	1
1 Stunde	—	1	1	1
2 Stunden	—	1	1	1
4 Stunden	1,6	10	/	1
4½ „	2,5	1000	100	1
6 „	4,75	100	100	1
8 „	5,35	10	10	1

Die auf die Lag-Periode beschränkten DNS-Einwirkungen führten zu keiner Verschiebung. Nach 2½ Zellteilungen erhielten wir eine maximale Ver-

schiebung. Nach etwa 5 Zellteilungen ist die exponentielle Phase beendet (s. auch Kurve in Abb. 1) und neuere Zellen werden nicht mehr transformiert. Im Sinken des Indexes gelangt vermutlich die langsamere Teilung der transformativ umgestalteten Zellen oder vielleicht eine »transformative Verzögerung« zum Ausdruck.

Nach durchschnittlich einer Zellteilung erhielten wir noch keine optimale Verschiebung. Die naheliegende Erklärung hierfür dürfte sein, dass in dieser Zeitspanne noch nicht jede Zelle der Population bis zur Teilung gelangt ist.

HOTCHKISS [5] konnte mit einem Verfahren, das zur Synchronisierung der Zellteilung führte, eine erhöhte transformative Aktivität nachweisen.

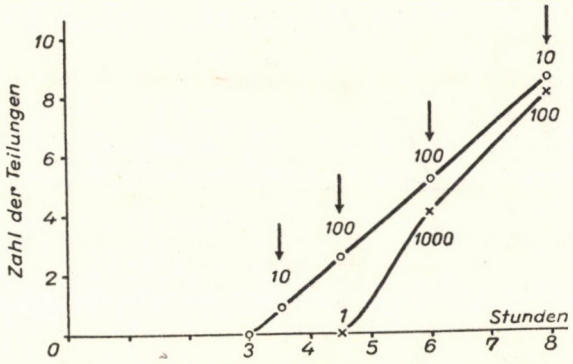


Abb. 2. Teilung von $J_{0,1}$ nach Behandlung mit DNS von J_{100} (10^5 Zellen/ml).
: — X — : Ultraschallsensibilisierung am Ende der 3stündigen Lag-Periode
: — O — : Ohne Ultraschallsensibilisierung

Wir machten den Versuch, die Zellen mit Ultraschall zu sensibilisieren und zwar setzten wir die zu transformierende Population am Ende der Lag-Periode kurzen, noch kaum eine Letalität verursachenden Ultraschalleinwirkungen von verschiedener Zeitdauer aus und fügten unmittelbar nach der Bestrahlung die DNS von J_{100} hinzu (Abb. 2).

Eine dieser Ultraschallbehandlungen bewirkte eine $1\frac{1}{2}$ stündige Teilungshemmung, nach 3 Stunden erreichte jedoch die Zellenzahl der mit Ultraschall behandelten Suspension die der unbehandelten Kontrolle, d. h. dass sich während $1\frac{1}{2}$ Stunden ebenso viele Zellen teilten wie in der nicht mit Ultraschall bestrahlten Kontrolle während 3 Stunden. Der Zusammenhang zwischen der transformativen Verschiebung und der Zellteilung ist augenfällig.

Desoxyribonuklease vernichtet die biologische Aktivität der DNS, wenn sie vor dem Einsetzen der Zellteilung zugegeben wird. Bei Zufügung nach $2\frac{1}{2}$ Zellteilungen ist sie bereits wirkungslos (S. Tab. III).

Aus diesen Versuchen geht jedoch auch die Lehre hervor, dass wir unter den angewandten Versuchsverhältnissen — in einem geschlossenen System — mehrere aufeinander beruhende Transformationsschritte nicht nachweisen

Tabelle III

Inaktivierende Wirkung von DNase in verschiedenen Abschnitten des Wachstums (DNS-Zugabe am Anfang der Lag-Periode. Dauer der DNS-Einwirkung 4½ Stunden)

DNS	DNase Zugabe	Index (auf 0,3 µg/ml STRM)
J_{100}	nach 30 Minuten (0 Teilung)	1
J_{100}	„ 3 Stunden (0 Teilung)	1
J_{100}	„ 4 Stunden (1,6 Teilungen)	100
J_{100}	„ 4 Stunden 20 Minuten (2½ Teilungen)	1000
J_{100}	—	1000

können, selbst dann nicht, wenn wir die DNS-Einwirkung am Ende des ersten Zyklus nicht unterbrechen, und auch dann nicht, wenn wir mit DNS-Überschuss arbeiten. Gehen wir nämlich z. B. von einer Konzentration von 10^7

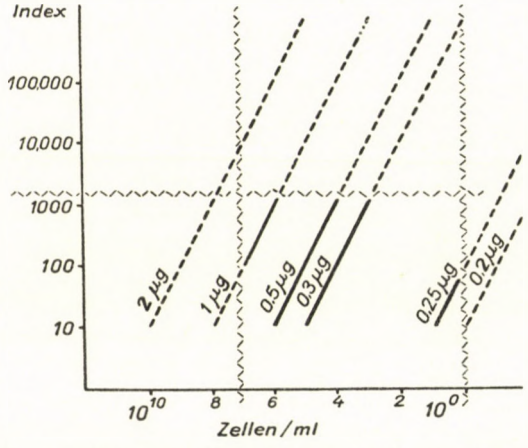


Abb. 3. Die Grenzen der transformativen Verschiebung bei $J_{0,1}$ in einem geschlossenen System. Auf der Abszisse ist jene Zellkonzentration aufgetragen, die in der gegebenen STRM-Konzentration noch ein Wachstum zeigt. Ein höherer Index als 1000 kommt bei $J_{0,1}$ nicht vor. Bei Anwendung von ungefähr 10^7 Zellen tritt keine transformative Umwandlung mehr ein. DieVerschiebung kann deshalb nur in jenen STRM-Konzentrationen (µg/ml) gemessen werden, bei denen der 10—1000fache Index in das rechte untere Quadrat fällt

Zellen aus, so erhalten wir nur 4—5 exponentielle Zellteilungen, wonach die Möglichkeit der transformativen Umwandlung aufhört. Stellen wir hingegen niedrigere Zellkonzentrationen ein, so fallen in den Kontrollreihen der mit DNS nicht behandelten Suspension die Grenzwerte der STRM-resistenten Zellen schon aus, so dass wir keine Vergleichsgrundlage haben. Ebenso ist das geschlossene System ungeeignet, eine eventuelle Zunahme von Zellen höherer STRM-Resistenz nachweisen zu können. So ist z. B. unter 10^9 Zellen des $J_{0,1}$ eine Zelle

(grössenordnungsgemäss) 1 μg/ml STRM gegenüber resistent. Käme es nach DNS-Einwirkung schon aus einer Population von 10^6 Zellen zu einem Wachstum, so bedeutet dies eine 1000fache Verschiebung, d. h. den bei $J_{0,1}$ empirisch maximalen Wert. Zu seinem Nachweis wären jedoch Zellkonzentrationen von 10^6—10^7 und 10^8 notwendig, doch kommt in letzterer keine Transformation mehr zustande, weil keine Teilung stattfindet. Auf 2μg/ml STRM kommt es schon in keiner der zum Nachweis des 1000er Indexes notwendigen Zellkonzentration (10^{10}, 10^9, 10^8) zu einer Teilung (Abb. 3).

Zum Nachweis von Transformationen, die aus aufeinander folgenden Schritten bestehen, ist deshalb nur der Chemostat geeignet.

Zwischen dem *Grad der STRM-Resistenz der DNS spendenden Variante* und dem Index der Verschiebung wurde von uns kein Zusammenhang gefunden (Tab. IV).

Tabelle IV

Ausbildung der STRM-Resistenz bei $J_{0,1}$ nach Induktion mit DNS-Auszügen von J-, Lu- und M-Varianten verschiedenen Resistenzgrades

DNS	Index (auf 0,3 μg/ml STRM)
$J_{0,1}$	1
J_{10}	1
J_{100}	1000
J_{1000}	10
Lu_2	1000
$Lu_{10\,000}$	100
M_{100}	1000
M_{500}	1000

J_{10} führte zu keinen Veränderungen, J_{100} zeigte die grösste, J_{1000} wiederum verminderte Aktivität. Bei Lu hingegen erwies sich die Aktivität des Lu_2 grösser als die des $Lu_{10\,000}$. In der Aktivität der untersuchten M-Varianten zeigten sich keine Unterschiede.

Der gleichzeitige Zusatz mehrerer verschiedener DNS-Auszüge führt zu keiner kumulativen Verschiebung. (Eine eventuelle additive Wirkung ist mit dieser Methode, die nur grössenordnungsmässige Abweichungen anzeigt, weder nachweisbar noch ausschliessbar. S. Tab. V.)

Unter den *heterologen DNS-Einwirkungen* wurden bisher nur jene der resistenten Varianten von M und Lu auf den Stamm J besprochen. Tabelle VI fasst nun das Ergebnis von Untersuchungen über die Einwirkung von verschiedenen DNS-Auszügen auf verschiedene Rh-Stämme zusammen.

Tabelle V

Ausbildung der Resistenz bei $J_{0,1}$ nach gleichzeitiger Einwirkung mehrerer DNS-Auszüge. (Eine kulumative Wirkung ist nicht nachweisbar)

DNS	Index (auf 0,3 µg/ml STRM)
J_{100}	1000
M_{100}	1000
Lu_2	1000
$J_{100} + M_{100} + Lu_2$ ..	1000

Tabelle VI

Die Wirkung der DNS von Rhizobiumstämmen verschiedener Arten und ihrer resistenten Varianten auf die Ausbildung der Resistenz bei $J_{0,1}$

(Von den drei bisher nicht besprochenen Arten zeigt die Variante des Stammes Pi_2 ebenfalls DNS-Aktivität)

DNS	Rhizobium-Art	Index (auf 0,3 µg/ml STRM)
$J_{(38)0,1}$	japonicum	1
$J_{(38)100}$	,,	1000
$Lu_{(31)2}$	lupini	1000
$Lu_{(31)10\,000}$ ...	,,	100
$M_{(32)0,1}$	meliloti	1
$M_{(32)100}$	,,	1000
$O_{(7)10}$	legumin.	100
$Pi_{(2)10}$	,,	1
$Pi_{(2)100}$	,,	1000
$H_{(1)5}$	lupini (Hartweghii)	1
$H_{(1)10\,000}$	,,	1

Die Aktivität von $Pi_{(2)}$ und die Indifferenz von $0_{(7)}$ (beide Rh. leguminosarum-Stämme) war auf Grund vorheriger In-vivo-Transformationen [2] zu erwarten. Desoxyribonuklease inaktivierte sämtliche aktive Präparate.

Wir verfügen noch über keinerlei Kriterium der *DNS-Kompatibilität.* Eine DNS, die transformative Aktivität besitzt, ist naturgemäss auch kompatibel, doch sind die beiden Eigenschaften nicht unbedingt identisch. Als kompatibel müssen wir auch die eigene DNS eines Stammes betrachten, obwohl sie keine von den genetischen Gegebenheiten des Stammes abweichende und somit nachweisbare Veränderungen hervorzurufen vermag. So führt die DNS des $J_{0,1}$ zu keiner Veränderung der STRM-Resistenz. Wenn wir aber die Kompatibilität als eine spezifische Adsorption an irgendwelche Rezeptoren der Zell-

oberfläche auffassen, dann dürfen wir erwarten, dass die nur kompatible DNS die Adsorption einer später zugefügten, an sich transformativ aktiven DNS spezifisch hemmt. Dieser Gedankengang wird durch Tabelle VII bekräftigt.

Tabelle VII

Hemmwirkung der kompatiblen DNS des STRM-empfindlichen Ausgangsstammes auf die Aktivität der später zugesetzten kompatiblen DNS des STRM-resistenten Stammes

a) Zusatz am Ende der Lag-Periode
b) Zusatz nach einer Zellteilung
Thymus: Kalbsthymus-DNS

DNS a	+	DNS b	Index (auf 0,3 µg/ml STRM)
—		$J_{0,1}$	1
—		J_{100}	1000
—		Thymus	1
$J_{0,1}$		M_{100}	1
Thymus		M_{100}	100
—		—	1

Der zuerst verabreichte kompatible, aber nicht aktive $J_{0,1}$-Auszug hemmt vollständig die Wirkung des an sich aktiven M_{100}-Präparates. Die nicht aktive, aber auch nicht kompatible Kalbsthymusnukleinsäure verursacht nur eine geringere Hemmung.

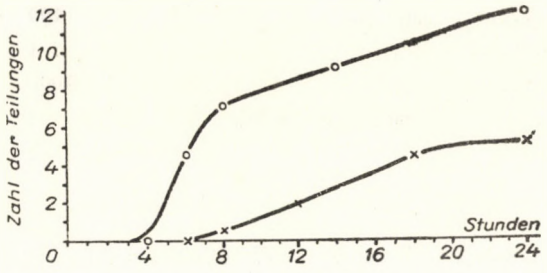


Abb. 4. Teilung von $M_{0,1}$ und Lu_2.
— O —: Lu. 2,3 × 10^6 Zellen/ml
— X —: M, 2,45 × 10^6 „
2 ml Nährlösung

Die transformative Verschiebung der STRM-Resistenz bei $M_{0,1}$ und Lu_2. Die Zellteilung gestaltet sich in einer Konzentration von etwa 10^6 Zellen bei den beiden Stämmen laut Abb. 4.

Auf Grund der erhaltenen Kurven wurde die DNS bei Lu nach 4 Stunden, bei M nach 6 Stunden zugesetzt und nach 5½ bzw. 14 Stunden in STRM übergeführt. Tab. VIII und IX.

Tabelle VIII

Ausbildung der STRM-Resistenz von Lu_2 auf Einwirkung der DNS seiner resistenten Variante

DNS	Index (auf 10 µg/ml STRM)
Lu_2 — 40 µg	1
$Lu_{10\,000}$ —200 µg	100
$Lu_{10\,000}$ — 20 µg	1000 (100)
$Lu_{10\,000}$ — 2 µg	100
$Lu_{10\,000}$ — 0,2 µg.....	—
DNase (vor der Teilung):	
+ $Lu_{10\,000}$ —200 µg.....	1
+ $Lu_{10\,000}$ — 20 µg.....	1

Die Transformabilität von M ist bei Induktion durch DNS der homologen resistenten Variante um eine Grössenordnung höher als die von J. Die Aktivität von heterologen DNS-Präparaten ist im Gegensatz zu den Beobachtungen bei J vermindert.

Tabelle IX

Ausbildung der STRM-Resistenz von $M_{0,1}$ auf Einwirkung der DNS verschiedener resistenter Varianten

DNS	Index (auf 0,2 µg/ml STRM)
$M_{0,1}$ — 40 µg	1
M_{500} — 40 µg	10 000
M_{500} — 4 µg	10 000
M_{500} — 0,4 µg.....	100
J_{100} — 60 µg	10
Lu_2 — 30 µg	1 000
M_{500} + DNase — 40 µg	
vor der Teilung	1
nach 2½ Teilungen	10 000

Besprechung der Ergebnisse

Unsere DNS-Auszüge wurden von Desoxyribonuklease in allen Kombinationen inaktiviert. Das beweist, dass die aktive Komponente unserer rohen Auszüge hochpolymerisierte DNS ist. In früheren Versuchen konnte bereits

mit grösster Wahrscheinlichkeit darauf hingewiesen werden [1], dass die Adsorption der DNS binnen weniger Minuten und auch an ruhenden Zellen eintritt. Wenn wir jetzt fanden, dass die DNS während der ganzen Dauer der Lag-Periode enzymatisch abgebaut werden kann, so müssen wir annehmen, dass sie auch noch nach der Adsorption für das Enzym zugänglich ist, und zwar bis zum Zeitpunkt, wo das Molekül in die Zelle eingebaut wird. Dies ist der kritische Zeitpunkt, der — wie wir gesehen haben — mit einem der Abschnitte der Zellteilung zusammenfällt. Nachher hört die Wirksamkeit der DNase auf.

Wir benutzten mehrere Male den Begriff der »Transformabilität«. Die in den Versuchen eintretenden Veränderungen erstrecken sich im allgemeinen auf 1—0,01% der Population. Bei M können z. B. nach Transformation unter 10^7 Zellen 10 000 Zellen gefunden werden, die 0,2 μg/ml STRM überleben (1%), in der nichttransformierten Ausgangspopulation hingegen nur eine. Müssen wir annehmen, dass nur 1% der Population transformierbar ist? Es war zu sehen, dass die Transformation an äusserst charakteristische physiologische Bedingungen gebunden ist. Es ist ferner zu berücksichtigen, dass in demselben Transformationszyklus unabhängig von der Ausbildung der STRM-Resistenz auch andere Umwandlungen stattfinden, so z. B. die Ausbildung der Knöllchenbildungsfähigkeit [3] sowie in ihren Einzelheiten noch nicht geklärte biochemische Umwandlungen und solche der Antigenstruktur. Die Anzahl der transformierten Zellen beträgt also möglicherweise soviele Male 1% (oder mehr oder weniger), als wir Veränderungen untersuchen.

Die »Transformabilität« setzt sich aus mehreren Phasen zusammen. Die erste Phase — die Adsorption von kompatibler DNS — tangiert anscheinend die überwiegende Mehrzahl der Zellen. Die mit der Zellteilung zusammenhängenden physiologischen Bedingungen spielen wahrscheinlich in der zweiten Phase — irreversibles Eindringen der DNS — eine wesentliche Rolle. Dies schafft die potentielle Möglichkeit für die transformativen Veränderungen. Welche Umwandlungen in der dritten Phase stattfinden, wird ausser Umweltbedingungen (Rolle der Aminosäuren) [1] durch die Heterogenität der DNS und durch die innere Selektion von Stoffwechselalternativen im Sinne HINSHELWOODS [4] bestimmt.

Einige wenige Angaben sprechen für die Unterscheidbarkeit von Kompatibilität und transformativer Aktivität der DNS. Wenn sich diese auf Grund eines grösseren Versuchsmaterials bestätigen sollten, würde sich vielleicht eine Möglichkeit bieten, an die Frage der Spezifität mit einer neuen Methode heranzugehen. Im vorliegenden Falle müsste man z. B. jeden Rhizobium Typus als mit J nahe verwandt betrachten, dessen DNS die transformierende Wirkung der DNS von J_{100} — falls sie vor dieser zugesetzt wird — hemmt.

*

Es sei hier B. GYŐRFFY der beste Dank für sein ständiges Interesse am Fortschritt dieser Arbeit und für seine kritische Durchsicht des Manuskriptes und Frau S. LETENAY für die gewissenhafte und selbständige Ausführung der Untersuchungen ausgesprochen.

ZUSAMMENFASSUNG

Desoxyribonukleinsäure-Auszüge von Streptomycin-resistenten Varianten dreier Rhizobiumstämme verschiedener Art erhöhte die Anzahl der niedrigen Streptomycin-Konzentrationen gegenüber resistenten (überlebenden) Zellen der Ausgangsstämme um mehrere Grössenordnungen. Diese transformative Veränderung trat nur dann ein, wenn die Desoxyribonukleinsäure auf sich teilende Zellen zu wirken vermochte. Eine bloss auf die Lag-Periode beschränkte Desoxyribonukleinsäure-Einwirkung oder die Anwendung einer Zellkonzentration, bei der die Zellteilung nicht mehr exponentielle Werte erreicht, führte dagegen zu keiner transformativen Veränderung. Vor Beginn der Zellteilung zugesetzte Desoxyribonuklease verhinderte die Desoxyribonukleinsäure-Aktivität. Nach durchschnittlich zwei Teilungen ist Desoxyribonuklease bereits wirkungslos.

Die eigene Desoxyribonukleinsäure des Ausgangsstammes hemmt die biologische Aktivität der später zugesetzten Desoxyribonukleinsäure einer resistenten Variante vollständig. Kalbsthymus Desoxyribonukleinsäure hingegen bewirkt nur eine partielle Hemmung.

LITERATUR

1. BALASSA, R.: Acta Microbiol. Hung. **2**, 51 (1954).
2. BALASSA, R.: Naturwissensch. **42**, 422, (1955).
3. BALASSA, R.: Acta Microbiol. Hung. **IV**. 79 (1956).
4. HINSHELWOOD, C. N.: Symp. Soc. Exp. Biol. VII. Adaptation in Microorganisms. (1953)
5. HOTCHKISS, R. D.: J. Cell. Comp. Physiol. **45**. Suppl. 2. (1955).

IMMUNOBIOLOGICAL STUDIES ON ENDOTOXINS

III. DERMAL REACTIONS TO ENDOTOXINS IN THE RABBIT*

By

S. Bozsóky

State Institute of Hygiene, Budapest

(Received April 25, 1956)

In previous reports [1, 2] the problems of active immunity producible against lethal doses of endotoxins have been dealt with. In the experiments discussed in this paper it has been examined whether it is possible to induce immunity against the toxic dermal reactions and against the Shwartzman phenomenon elicited by endotoxins.

Rabbits were immunized intravenously with killed typhoid bacteria. The immunized animals and the untreated controls were inoculated once or several times with different intradermal doses of *S. typhi*, *Sh. flexneri-5* and *S. typhimurium* endotoxins. Observing the inoculation reactions, in the majority of the rabbits attempts were made to elicit the Shwartzman phenomenon by the intravenous injection of typhoid endotoxin. The typhoid O agglutinin titres were determined several times in the course of the experiments.

Materials and methods

Endotoxins. The endotoxins used in this work were extracted with trichloracetic acid, dialysed and dried in vacuum [1]. The *Sh. flexneri-5* endotoxin was obtained from I. Hollós. The MLD values of the endotoxins in the rabbit were: *S. typhi* endotoxin, 2,0 mg/kg; *Sh. flexneri-5* endotoxin, 2,0 mg/kg; *S. typhimurium* endotoxin, 1,0 mg/kg.

Immunization. Rabbits weighing from 3 to 4000 g were inoculated intravenously at 3-day intervals with increasing doses of a suspension of *S. typhi* 0—901 boiled for 1 hour (the doses administered of the 5000 million germs per ml suspension were 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 3,0 and 3,0 ml).

Intradermal inoculations. The intradermal inoculations were made 3 days, 2 weeks or 3 months after the last immunizing dose, into the epilated back skin of 22 immunized and 14 control rabbits. Different doses of the *S. typhi*, *Sh. flexneri-5* and *S. typhimurium* endotoxins were injected, the volume of single inocula being 0,1 ml. The doses varied according to the tenfold dilution series, from 1,0 mg to 0,01 μg.

Shwartzman reaction. 24 or 48 hours after the intradermal inoculation, 15 immunized and 12 non-immunized rabbits were injected intravenously with 0,5 to 5,0 mg/kg *S. typhi* endotoxin, in an attempt at eliciting the Shwartzman reaction.

* Lecture delivered at the October, 1955, Meeting of the Hungarian Microbiological Society.

Results

A) *Toxic dermal reactions*

As the first step in our work it has been examined whether the active immunization of rabbits against typhoid had a modifying action on the development of toxic dermal reactions to endotoxins.

Sixteen rabbits were immunised at 3-day intervals intravenously with increasing doses of the killed typhoid 0—901 bacterium suspension. Following the sixth immunizing dose after 3 days, 8 rabbits; after 2 weeks, 4 rabbits; and after 3 months, 4 rabbits were inoculated intradermally with different dilutions of the *S. typhi*, *Sh. flexneri* and *S. typhimurium* endotoxins. At the time when the first group of immunized rabbits was inoculated intradermally, 8 untreated animals were also inoculated in the same way. The inoculations were made into the epilated back skin, the doses varying from 1,0 mg to 0,01 μg, in 0,1 ml single volume. The reactions to inoculation were checked after 6 and 24 hours, then each day over a period of 1 week. On the day of the intradermal inoculations the typhoid O-agglutinin titres were determined in the rabbits.

The observations made can be summarized as follows:

1. In non-immunized rabbits the same dilutions of the *S. typhi*, *Sh. flexneri* and *S. typhimurium* endotoxins elicited dermal reactions of comparable intensity. The 1,0 mg doses produced within 6 to 24 hours erythema measuring 20 to 30 mm in diameter and a dense infiltration, which showed partial necrosis 2 to 3 days after inoculation, then healed with scar formation. The 100 μg doses produced redness of the skin 20 mm in diameter and an infiltration, which disappeared in 3 to 4 days. The 10 μg doses produced transitory erythema 5 to 8 mm in diameter and infiltration. Doses of 1 μg and smaller produced no visible dermal reaction.

2. The inoculation reactions of rabbits immunized intravenously with killed typhoid bacteria were not milder than those seen in the non-immunized animals. The rabbits inoculated intradermally 2 weeks or 3 months after the last immunizing dose exhibited the same changes as in non-immunized animals. This applies also to 5 of the 8 rabbits inoculated intradermally 3 days after the last immunizing dose. However, the remaining 3 rabbits showed an increased sensitivity to endotoxins, as indicated by the fact that in these animals a marked dermal reaction and infiltration, 10 to 15 mm in diameter, developed at the site of the 10 and 1,0 μg inoculations, too. The dermal changes disappeared within 3 to 4 days, except for the reactions to the 1,0 mg doses, which necrosed and healed with scar formation.

3. The level of the typhoid O-agglutinin in the blood of non-immunized rabbits varied from 1 : 8 to 1 : 128 on the day the intradermal inoculations were made. The immunized animals showed the following typhoid O-agglutinin titres on the day of intradermal inoculations : group 1. (intradermal inoculations

3 days after the last immunizing dose) : 1 : 40 960 to 1 : 81 920 ; group 2. (inoculations 2 weeks after the last immunizing dose) : 1 : 20 480 to 1 : 40 960 ; group 3. (inoculations 3 months after the last immunizing dose) : 1 : 1 280 to 1 : 5 120.

Summing up the above observations, it can be stated that, in general, equal doses of *S. typhi*, *Sh. flexneri* and *S. typhimurium* endotoxins elicited dermal reactions of comparable intensity in both the immunized and the untreated rabbits. Thus, immunization with killed typhoid bacteria (although it produced high levels of antibody in blood) did not diminish the severity of the dermal reaction to typhoid endotoxin. On the contrary, immunization induced in a few cases an increased dermal sensitivity to both homologous and heterologous endotoxins.

B) *Shwartzman phenomenon*

Next, the effect of active immunization against typhoid on the development of Shwartzman reaction was studied in rabbits. Attempts were made at eliciting the phenomenon in 3 rabbits from each of the afore-mentioned 3 immunized groups and in 6 rabbits which had received only the intradermal inoculation. On the day following intradermal inoculations the non-immunized rabbits were given 0,5 mg/kg, and the immunized ones 0,5 to 5,0 mg/kg *S. typhi* endotoxin intravenously.

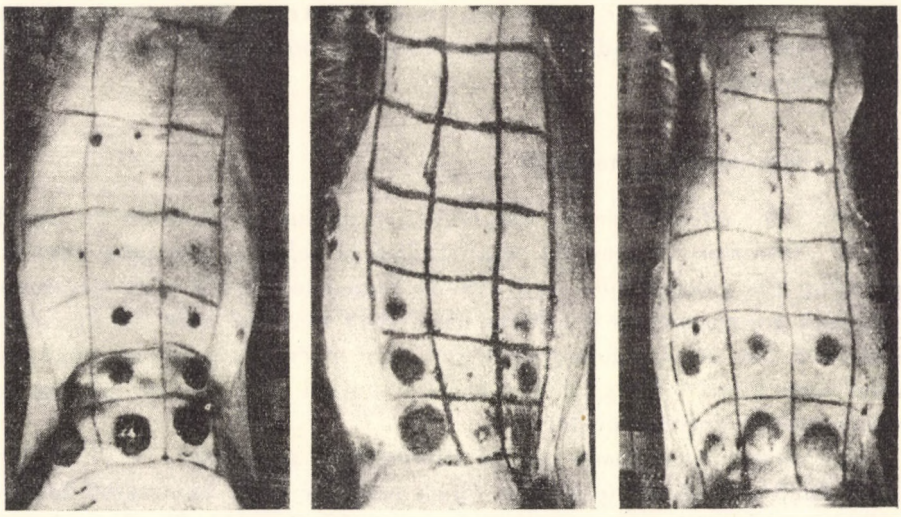
The observations made can be summarized as follows:

1. In 5 out of the 6 rabbits which had not been immunized but were inoculated with various intradermal doses of the *S. typhi*, *Sh. flexneri* and *S. typhimurium* endotoxins and given 24 hours later typhoid endotoxin intravenously, the Shwartzman phenomenon developed 2 to 3 hours after the administration of the intravenous injection. The dermal haemorrhage was most marked at the area inoculated with 1,0 mg endotoxin and decreased in intensity with the reduction of the eliciting dose. No Shwartzman phenomenon appeared in the areas inoculated with 1,0 μg or smaller doses of the endotoxins. In 4 of the 5 rabbits Shwartzman phenomenon developed in the areas pre-treated with any of the 3 endotoxins, with comparable intensity (Fig. 1). In 1 rabbit, however, it was only to the *S. typhi* and to the antigenically related *S. typhimurium* endotoxins that haemorrhage developed following the intravenous administration of the typhoid endotoxin, while in the areas pre-treated with the *Sh. flexneri* endotoxin the haemorrhage was absent or insignificant in degree (Fig. 2).

The sixth rabbit of this group did not develop the dermal signs of Shwartzman phenomenon. This animal died about 3 hours after the administration of the intravenous typhoid endotoxin injection. At necropsy, haemorrhages were found in the peritoneum, in the mucosa of the small intestine and in the

renal cortex. The necropsy findings showed the pattern of a generalised Shwartzman phenomenon.

2. In the rabbits immunized intravenously with killed typhoid bacteria and inoculated intradermally 3 days and 2 weeks later, respectively, Shwartzman phenomenon was of little intensity, or could be elicited by large intravenous endotoxin doses only. Intravenous doses of typhoid endotoxin as high as 0,5 to 1,0 mg/kg induced not appreciable changes. Even 3,0 to 5,0 mg/kg doses produced only slight haemorrhages at the sites where the 1,0 mg and 100 μg



Figs. 1—3. Shwartzman phenomenon, as it occurred in non-immunized rabbits *(Fig. 1, Fig. 2)* and in a rabbit immunized intravenously with *S. typhi* endotoxin *(Fig. 3)*.

The order of the intradermal inoculations is as follows. From left to right : inoculations with *S. typhi*, *Sh. flexneri-5* and *S. typhimurium* endotoxins. In the upward direction : inoculations with doses of 1,0 mg, 100 μg, 10 μg, 1.0 μg and 0,1 μg.

Interval between preparatory and eliciting inoculations, 24 hours.

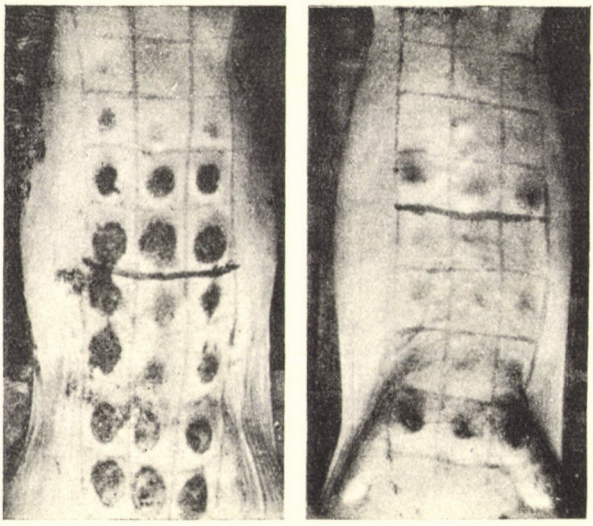
Eliciting dose for non-immunized rabbits 0,5 mg/kg, for immunized ones 5,0 mg/kg, *S. typhi* endotoxin intravenously.

The photographs show the changes 4 hours following administration of the eliciting endotoxin dose.

doses of the 3 endotoxins had been injected (Fig. 3). The inhibitory action of immunization on Shwartzman phenomenon was not any more present 3 months after the immunization cycle. In the rabbits inoculated intradermally at that time Shwartzman phenomenon developed with the same intensity and could be induced with comparable doses of typhoid endotoxin as in the non-immunized animals.

As it has been mentioned already, in 1 of the 6 non-immunized rabbits involved in the Shwartzman phenomenon series the development of the pheno-

menon showed a certain grade of specificity. In response to the intravenous typhoid endotoxin, extensive haemorrhages appeared only in those dermal areas which had been pre-treated with *S. typhi* and *S. typhimurium* endotoxins, but not in those inoculated with the *Sh. flexneri* endotoxin. In further studies it was investigated whether one could not make the Shwartzman phenomenon specific in nature by changing experimental conditions. Six rabbits were immunized by the described method with intravenous typhoid bacteria. The observations were made 10 to 14 days after the immunization cycle.



Figs 4—5. Shwartzman phenomenon, as it occurred in a non-immunized rabbit *(Fig. 4)*, and in a rabbit immunized intravenously with *S. typhi* endotoxin *(Fig. 5)*.

The order of intradermal inoculations is as follows. From left to right: inoculations with *S. typhi*, *Sh. flexneri-5* and *S. typhimurium* endotoxins. In the upward direction: inoculation of 1,0 mg, 100 μg, 10 μg, 1,0 μg, then again 1,0 mg, 100 μg, 10 μg, 1,0 μg.

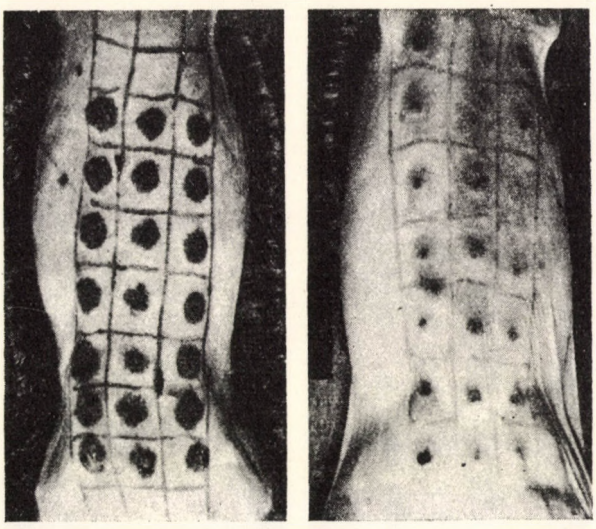
Interval between the preparatory and eliciting inoculation in the case of the four lowermost rows of inoculations, 24 hours; in the case of the 4 uppermost rows, 48 hours.

Eliciting dose for the non-immunized rabbit, 0,5 mg/kg; for the immunized one, 5,0 mg/kg, *S. typhi* endotoxin, intravenously.

The photographs show the changes 4 hours following administration of the eliciting endotoxin dose.

a) At first, attempts were made to increase the length of the interval between the preparatory and the eliciting inoculations. Three immunized and 3 control rabbits were inoculated intradermally with *S. typhi*, *Sh. flexneri* and *S. typhimurium* endotoxins, the doses of each endotoxin varying from 1,0 mg to 1,0 μg. The intradermal inoculations were repeated the following day, this time in other areas of the skin of the back. Another 24 hours later the non-immunized animals were given 0,5 mg/kg, the immunized ones 5,0 mg/kg typhoid endotoxin intravenously. In the non-immunized rabbits the intravenous typhoid endotoxin elicited much more extensive haemorrhages in the dermal

areas inoculated 24 hours prior to the administration of the eliciting dose than in those areas which had been inoculated 48 hours prior to the administration of the eliciting dose. However, comparable changes were induced in the areas inoculated with any of the 3 endotoxins (Fig. 4). The lengthening of the interval between the preparatory and the eliciting doses failed to enhance the specificity of Shwartzman phenomenon in immunized rabbits, too. In the areas inoculated 24 hours prior to the administration of the eliciting dose the haemorrhage was somewhat more extensive and developed faster, but there was no appreciable



Figs 6—7. Shwartzman phenomenon, as it occurred in a non-immunized rabbit *(Fig. 6)*, and in a rabbit immunized intravenously with *S. typhi* endotoxin *(Fig. 7)*.

The order of intradermal inoculations is as follows. From left to right : inoculations with *S. typhi*, *Sh. flexneri-5* and *S. typhimurium* endotoxins. In the upward direction : 100 μg doses in each dermal area.

Interval between the preparatory and eliciting inoculations, 24 hours.

Eliciting dose for the non-immunized rabbit, 0,5 mg/kg, for the immunized one 5,0 mg/kg, *S. typhi* endotoxin, intravenously.

The photographs show the changes 4 hours following administration of the eliciting endotoxin dose.

difference in this respect between the areas inoculated with the different endotoxins (Fig. 5).

b) In subsequent experiments it was examined whether the development of Shwartzman phenomenon in the areas inoculated with the *Sh. flexneri* endotoxin could not be inhibited by increasing the preparatory doses of *S. typhi* and *S. typhimurium* endotoxins. Three immunized and 3 control rabbits were inoculated with *S. typhi*, *Sh. flexneri-5* and *S. typhimurium* endotoxins, injecting single doses of 100 μg at 7 different sites of the skin of the back. Next day the non-immunized animals were given 0,5 mg/kg, the immunized

ones 5,0 mg/kg, of the typhoid endotoxin, intravenously. About 3 hours after the eliciting typhoid endotoxin dose, one of the non-immunized rabbits died. No haemorrhages were visible in the skin of the dead animal. At necropsy, much clotted blood was found in the abdominal cavity and in the small intestine. The peritoneum, the mucosa of the small intestine and the renal cortex equally displayed haemorrhages. The necropsy findings exhibited the pattern of a generalised Shwartzman phenomenon. Shwartzman phenomenon developed in the form of extensive dermal haemorrhages in the non-immunized rabbits and in a considerably less severe form in the immunized ones. However, the attempt at making the Shwartzman phenomenon specific failed under the experimental conditions employed.

Discussion

According to the results, rabbits immunized intravenously with killed typhoid bacteria do not acquire protection against the toxic action of intradermally injected typhoid endotoxin, in spite of the presence of a high homologous antibody titre. These observations have lent further support to the view that antibodies produced to endotoxins can "neutralize" the latter only in the serological sense of the word, but do not abolish their toxic action [1, 2]. Studies on the immunization of human subjects against typhoid fever likewise show that the toxic component of the typhoid inoculation reaction cannot be suppressed by immunizing the organism [3].

As it has been reported [2] rabbits immunized intravenously with typhoid endotoxin acquire resistance to the pyrogenic and lethal actions of the endotoxin. This resistance is not specific in nature, nor is it based on the presence of antibodies. It can be demonstrated to take effect against serologically indifferent endotoxins, too, and not only against the homologous endotoxin. According to the results just described, the anti-endotoxic resistance, which can be induced by intravenous inoculation of typhoid endotoxin, is not effective against the toxic action on the skin of intradermally injected endotoxins. This finding may bring us nearer to a better understanding of the mechanism of anti-endotoxic resistance. According to MORGAN [4] and BEESON [5], resistance against the pyrogenic action of endotoxins is based on an increased rate of endotoxin elimination by the reticulo-endothelial apparatus — when this is blocked, the anti-endotoxic resistance is suspended [5, 6]. BIOZZI, BENACERRAF and HALPERN [7] have presented reliable evidence showing that, parallel with the development of the anti-endotoxic resistance induced by intravenous inoculation of typhoid endotoxin, the reticulo-endothelial system is greatly activated. If the mechanism of the anti-endotoxic resistance is actually based on an increased rate of elimination from the blood stream of endotoxin, this resistance will

obviously not be able to influence the toxic action on the skin of intradermally injected endotoxin.

On the other hand, it is known that by repeated intradermal inoculations the sensitivity of the skin to endotoxins can be diminished. HEGEMANN [8] injected *E. coli* vaccine intradermally in man and found that erythema and oedema developed and persisted for about 30 hours at the site of inoculation. The same skin area was then repeatedly inoculated at 3 to 4 day intervals with the same doses of the vaccine and the dermal reaction gradually decreased in both intensity and duration. Likewise, the skin area thus treated was less sensitive to intradermal typhoid or cholera vaccine, or to histamine. According to HEGEMANN, the phenomenon observed by him was one of promunity, thus, it would be analogous with the resistance that can be induced against the pyrogenic and lethal actions of the endotoxins. However, it is not at all impossible that the experimental results obtained by HEGEMANN were based on a mechanism much more general in nature than that of anti-endotoxic resistance. An inflamed area of the skin namely responds less intensely to a new but similar stimulus, as it has been demonstrated by KAUFMANN [9] for treatment with cantharidine, iodine and ultraviolet irradiation.

In the second part of our investigations we have been concerned with the Shwartzman phenomenon. It has been known since long that this phenomenon is nonspecific, *i. e.* it develops also when different antigens have been used for the preparative and eliciting inoculations [10, 11]. In spite of this, we endeavoured to clarify whether the Shwartzman phenomenon did not show some degree of specificity. Notably, if the preparatory inoculations had been carried out simultaneously with different endotoxins and the eliciting inoculation was made with only one of them, would the dermal haemorrhage not develop more markedly or faster in the areas that had been injected with the same antigen as the one used for eliciting the response. In the pertaining experiments, different doses of the *S. typhi* endotoxin, and simultaneously, of the serologically closely related *S. typhimurium* endotoxin, as well as of the serologically indifferent *Sh. flexneri-5* endotoxin were injected in the preparatory phase. The eliciting dose of typhoid endotoxin, which was injected 24 hours later, mostly produced dermal haemorrhages of comparable intensity in the areas inoculated with the three endotoxins. It occurred in one animal only that the extensive haemorrhage developed exclusively in the areas inoculated with the *S. typhi* and *S. typhimurium* endotoxins, but not in those inoculated with the *Sh. flexneri* endotoxin. We are unable to offer any acceptable explanation, nor have we succeeded in reproducing the phenomenon. In further studies, in which the experimental conditions employed have been varied (changing the number of preparatory inoculations, the dosage, the duration of the interval between the preparatory and eliciting inoculations), the Shwartzman phenomenon showed no specificity whatsoever.

The rabbits immunized intravenously with typhoid bacteria and inoculated intradermally 3 days and 2 weeks, respectively, after the last immunizing inoculation, exhibited a definite resistance against the development of Shwartzman phenomenon. Thus, our experimental results confirm the similar findings described by CLUFF and BENNETT [17]. The inhibitory action of immunization on Shwartzman phenomenon was not demonstrable 3 months after the immunization cycle.

The resistance of immunized animals to Shwartzman phenomenon seems to be best explainable by the assumption that the typhoid agglutinins produced in response to immunization neutralize the intravenously injected homologous endotoxin, and prevent thereby the development of the phenomenon. We do not believe, however, that this would actually be the responsible mechanism, since the dose of typhoid endotoxin lethal for the rabbit can *in vitro* be completely neutralized serologically, *i. e.* completely precipitated, by 5,0 ml of a 1 : 5 000 titre homologous rabbit immune serum [13]. 3 months after the immunization cycle our rabbits had typhoid O-agglutinin titres varying from 1 : 2 800 to 1 : 5 160. Thus, fractions of the circulating antibodies were amply sufficient for serological neutralization of the intravenous doses of the typhoid endotoxin and yet the rabbits showed no resistance to Shwartzman phenomenon. Earlier investigations in other directions showed that the antibodies produced against endotoxins "neutralized" the latter only in the serological sense of the word, but could not abolish their toxic action [1, 2]. The toxic component of the endotoxins is identical with the part of the molecule responsible for the Shwartzman activity [14]. On the basis of all these, it seems justified to assume that the resistance against Shwartzman phenomenon, as it occurs in rabbits immunized intravenously with typhoid bacteria, is not based on the presence of homologous antibodies, but rather on a change in the responsiveness of the organism, just as it is the case with the resistance against the pyrogenic and lethal actions of the endotoxins.

Two of the total of 12 non-immunized rabbits involved in the studies of Shwartzman phenomenon developed no dermal haemorrhage in response to the intravenous inoculation with the typhoid endotoxin, but died within a few hours. The post-mortem changes corresponded to a generalized Shwartzman phenomenon. Presumably, part of the intradermally injected endotoxins had been absorbed from the skin and elicited the same response which would have been given to an intravenous preparatory injection. Since none of the 15 immunized and intradermally inoculated rabbits invo ved in that series developed the generalized form of Shwartzman phenomenon, intravenous immunization probably induces resistance not only to the local, but also to the generalized Shwartzman phenomenon.

SUMMARY

1. Rabbits immunized intravenously with killed typhoid bacteria and untreated rabbits were intradermally inoculated simultaneously with *S. typhi*, *Sh. flexneri-5* and *S. typhimurium* endotoxins. Equal doses of the 3 endotoxins elicited dermal responses of a comparable intensity, in both the immunized and the untreated animals. Thus, immunization of rabbits with killed typhoid bacteria, although it led to ample antibody production, has failed to diminish the toxic action of the typhoid endotoxin on the skin.

2. Rabbits inoculated simultaneously with *S. typhi*, *Sh. flexneri-5* and *S. typhimurium* endotoxins through the intradermal route and given 24 hours later typhoid endotoxin intravenously, developed, with one exception, Shwartzman phenomenon in all areas inoculated with the three kinds of endotoxin with about the same intensity. Rabbits immunized intravenously with typhoid bacteria and inoculated intradermally with *S. typhi*, *Sh. flexneri-5* and *S. typhimurium* endotoxins required much greater doses of intravenous typhoid endotoxin to develop Shwartzman phenomenon, which was even then of slight intensity. The inhibitory effect on Shwartzman phenomenon of immunization was demonstrable 3 days and 2 weeks after the immunization cycle alike, but was not any more present after 3 months, although the level of typhoid antibody in the rabbits was still high at that time.

LITERATURE

1. BOZSÓKY, S.: Acta Microbiol. Hung. **3**, 67 (1955).
2. BOZSÓKY, S.: Acta Microbiol. Hung. **3**, 77 (1955).
3. HEGYESSY, GY., BOZSÓKY, S., UHL, K.: Acta Microbiol. Hung. **3**, 261 (1955).
4. MORGAN, H. R.: J. Immunol. **59**, 129 (1948).
5. BEESON, P. B.: J. Exp. Med. **86**, 39 (1947).
6. BEESON, P. B.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **64**, 146 (1947).
7. BIOZZI, G., BENACERRAF, B., HALPERN, B. W.: Br. J. Exp. Path. **36**, 226 (1955)
8. HEGEMANN, F.: Ztschr. Immunforsch. **111**, 155 (1954).
9. KAUFMANN, F.: Ztschr. Klin. Med. **135**, 572 (1939).
10. SANARELLI, G.: Ann. Inst. Pasteur **38**, 11 (1924).
11. SHWARTZMAN, G.: Phenomenon of Local Tissue Reactivity. Ed. P. Hoeber N. Y. (1937).
12. CLUFF, L. E., BENNETT, I. L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **77**, 461 (1951).
13. BOZSÓKY, S.: Unpublished data.
14. TAKEDA, Y., KASHIBA, M.: Jap. J. Exp. Med. **22**, 9 (1952).

ISOLATION AND CHARACTERISATION OF SOME PSEUDOMONAS PYOCYANEA BACTERIOPHAGES*

By

L. ALFÖLDI

Institute of Microbiology, Medical University of Szeged

(Received April 24, 1956)

Considerable attention has lately been paid to the bacteriophage of *Ps. pyocyanea*. DICKINSON [1], DICKINSON and CODD [2] and CHANTRILL et al. [3] studied the lysogenic properties of pyocyaneus strains and investigated to what extent their phage production is influenced by various chemical substances. WARNER [4, 5] isolated pyocyaneus phages from lysogenic strains and studied the relationship between lysogeny and iridescence. VAN DEN ENDE et al. [6, 7, 8, 9] isolated 15 phage strains from lysogenic pyocyaneus cultures and described the serological, electron-microscopic, and biological characteristics of some selected strains.

Of great significance is JACOB's work aimed at clarifying the lysogenic property of the strains of *Ps. pyocyanea*. His results and general bearings have been summarized in an excellent monograph [10].

All the above studies deal with temperate phages, although a well-defined virulent strain has also been included in JACOB's investigations. JACOB and WOLLMAN [12] and DICKINSON [13], have shown that temperate pyocyaneus phages may have virulent variants.

The properties of virulent pyocyaneus phages had been hardly studied and our aim was to isolate some of them and to make a biological study of the strains characterized.

The present paper gives an account of the isolation and characterisation of some phage strains of *Ps. pyocyanea*.

Material and methods

Bacterium. The strain *Ps. pyocyanea* 3R was used as indicator. It originated from the collection of the Institute of Microbiology of Medical University of Szeged. It produces on horse-meat-peptone agar pyocyanin; in peptone broth it ferments glucose in 48 hours; it clots and peptonizes milk and liquefies gelatin. The stock culture was transferred bi-monthly. The cultures used in the experiment were subcultured from day to day.

* The present paper forms part of the author's thesis "Studies of virulent and temperate bacteriophages of *Pseudomonas pyocyanea*" submitted to the Hungarian Academy of Sciences.

Nutrient media. The following were employed :

a) Horsemeat-peptone broth (subsequently referred to as broth). In aqueous horsemeat extract 1 per cent Richter peptone and 0,5 per cent NaCl were dissolved. The pH was adjusted to 7,2 with NaOH. The medium was sterilised in an autoclave at 120° C for 30 minutes.

b) Synthetic medium (F medium). The strain *Ps. pyocyanea* 3R grew well in the lactate medium described first by FRIEDLEIN [14], composed of 10 g of Na lactate, 1 g of NH_4Cl, 0,7 g of K_2HPO_4, 0,3 g of KH_2PO_4, 0,1 g of $Na_2SO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g of $MgSo_4 \cdot 7H_2O$, and distilled water to 1000 ml. pH = 7,2.

The solid media were prepared by adding suitable quantities of agar in the liquid medium.

Cultivation methods. The indicator bacterium suspension (strain *Ps. pyocyanea* 3R), required for the titration of bacteriophages, was obtained by washing a 16-hour slant agar culture in physiological saline.

A homogeneously suspended culture of the bacterium was also obtained if the culture has been grown in a shaking apparatus, at 37° C in a water bath.

One step growth experiments. They were carried out according to DELBRÜCK and LURIA's method [15], in gently shaken cultures.

Plaque count methods. In isolating the phages the generally applied agar-layer method [16] was used, while for quantitative titrations HORVÁTH and ALFÖLDI's [17, 18] plexiplate method was employed.

Preparation of antiphage serum. The lysates prepared in broth or lactate medium were filtered through a Seitz EK pad to free them from bacterial debris. Of the phage suspension containing 10^9 to 10^{10} particles per ml, 5 ml were injected intravenously into each of two rabbits, twice weekly for three weeks. The lysates proved to be toxic to the rabbits, and by the end of the immunisation procedure about one third of their body weight was lost. On the tenth day following the last injection 20 to 30 ml samples of blood were drawn from the ear of the animals. The sera obtained were inactivated for 30 minutes in a water bath at 56° C and stored, without preservatives, in the frozen state at —20° C.

Experimental

Isolation of pyocyaneus phage strains from sewage water

An equal volume of sewage water was added to an 8-hour broth culture of the strain of *Ps. pyocyanea* 3R and the mixture was placed in a thermostat at 37° C for 24 hours, whereafter it was filtered through a Seitz EK pad. Repeated single plaque isolation yielded one phage strain of a small-plaque-type, and one of a large-plaque-type (strains Fl and F2). Each phage strain titrated on the surface of horsemeat-peptone agar appeared to be of a homogeneous population.

However, when each of the two strains were titrated simultaneously on the surface of horsemeat-peptone agar and lactate agar, it was found that while their populations were apparently homogeneous on the former, on the latter there appeared great numbers of small turbid plaques among those of both phage strains.

Repeated experiments led us to conclude that the lysate of each of the Fl and F2 phage strains, appearing homogeneous on horsemeat-peptone agar, must contain a third phage. This third phage does not form visible plaques on horsemeat-peptone agar and its existence could be demonstrated on lactate agar only. Therefore, the phage material of Fl and F2 strains was freed of this third phage (F3 strain), by plaque isolations carried out on the surface of lactate agar.

Preparation of a pure phage material of the strain F3 was rendered difficult by the fact that from its lysate, prepared in lactate medium, the virus particles were absorbed by the Seitz EK asbestos pad. It was, however, found that the F3 lysates, prepared in lactate medium can also be filtered without a considerable loss of phage particles, if one third volume of broth was added to the lysate before filtration.

Characterisation of phage strains F1, F2 and F3

a) *Plaque morphology*. Twenty ml of 1 per cent horsemeat-pepton agar medium were poured into Petri dishes and by total amount of 3 ml of agar medium and phage dilution mixed with the indicator bacterium suspension was

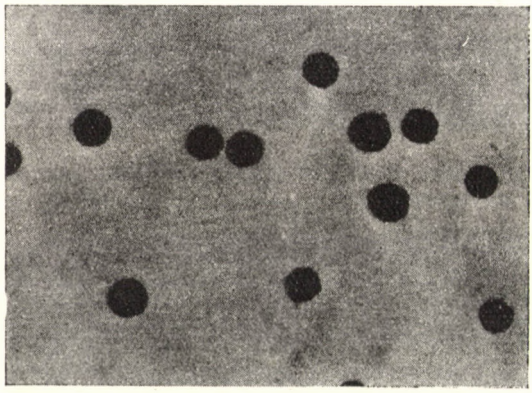


Fig. 1. 24-hour plaques of phage F1 in broth agar (x 1,5)

layered on its surface. The final concentration of agar in the top layer was 0,75%.

Phage F1 formed clear-cut plaques 1 to 1,5 mm in diameter which in the tenth hour increased to 2 to 3 mm. The 24-hour old plaques were 3 to 4 mm in diameter and still clear (Fig. 1).

Phage F2 yielded plaques 2 to 2,5 mm in diameter in 5 hours, with the diameter increasing to 3 to 3,5 mm by the tenth hour. At that time numerous resistant bacterial colonies were observed in the plaques (Fig. 2).

In contrast with these, F3 phage formed no visible plaques on horsemeat-peptone agar, whereas well developed plaques were seen on lactate agar inoculated under identical conditions by the agar layer technique.

The turbid plaques of F3 grew to 1 to 3 mm in size by the 5th hour (Fig. 3). Ten-hour old plaques surrounded by a turbid halo developed to 3 to 5 mm in diameter.

The stock lysate of F3 phage prepared at the first isolation of this strain was stored for a considerable time in the frozen state. The lysate of a passage of this material in lactate medium gave rise to plaques of a different character. Most plaques were turbid, as already described. Among these turbid plaques some clear ones occurred. This clear plaque type strain will be designated subsequently as F3c.

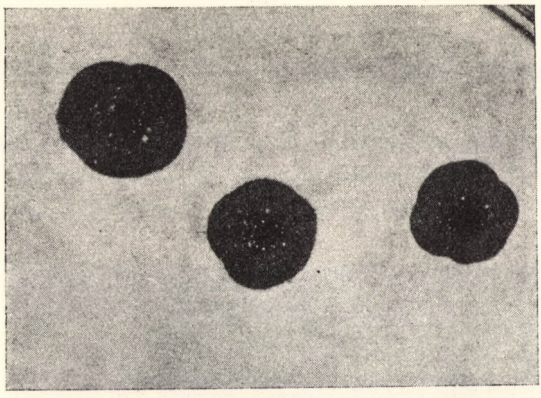


Fig. 2. 24-hour plaques of phage F2 in broth agar (× 1,5)

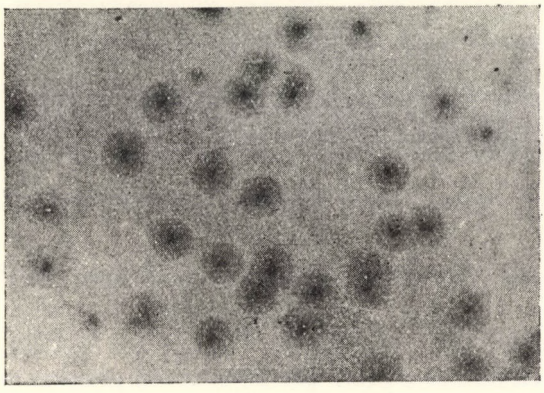


Fig. 3. 10-hour plaques of phage F3 in F medium (× 1,5)

On lactate agar the plaques of F3c developed to a size of 2 to 2,5 mm in 5 hours, and were of a clear-cut appearance. In the tenth hour, they measured 2,5 to 3 mm in diameter and were surrounded by a turbid halo (Fig. 4).

A striking feature of the F3c phage, as compared to its parent strain, was its ability to form plaques on horsemeat-peptone agar. These plaques were well visible for 5 to 10 hours and were identical with those observable on lactate agar.

b) *Bacterial spectrum of strains.* We have examined the activity of the strains F1 and F2 on 55 *Ps. pyocyanea*, 9 *S. typhi*, 1 *S. paratyphi A*, 1 *S. paratyphi B*, 1 *S. paratyphi Hirszfeld*, 1 *S. breslauensis*, 1 *S. gärtneri*, 1 *Aërobacter aërogenes*, 4 *E. coli*, 1 each of *Sh. shigae*, *Sh. flexneri*, *Sh. schmitzi*, *Sh. sonnei*, *Proteus morgani*, and 2 *Micrococcus pyogenes* var. *aureus strains.*

The sensitivity of the 55 strains of *Ps. pyocyanea* is illustrated in Table I. The strains of other bacterium species were not sensitive to the two phages.

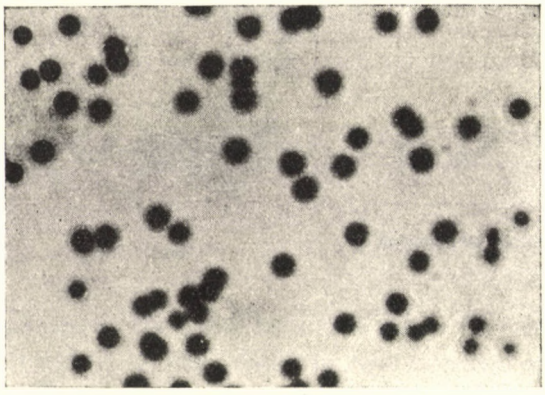


Fig. 4. 10-hour plaques of phage F3c in F medium (x 1,5)

Table I

Activity of phage F1 and F2 on Ps. pyocyanea *strains*

Number of pyocyaneus strains tested	Number of pyocyaneus strains			
	equally lysed by F1 and F2 phages	lysed only by F1 phage	lysed only by F2 phage	equally resistant to F1 and F2 phages
55	27	11	7	10

Table I shows that 11 strains of *Ps. pyocyanea* were only lysed by the virus F1, and 7 only by the virus F2, which means that there was a clear-cut host range difference between the two phages.

The specificity of the F3 strain could not be examined as widely, because its effect could be demonstrated only on the strain of *Ps. pyocyanea 3R*, used for isolation.

c) *Antigenic structure.* The results of the neutralisation tests are shown in Tables II and III.

The data in Table II show that the anti-F1 serum was without effect on the F2 strain ; in a 1 : 10 dilution it failed to reduce the number of infective phage particles even as late as in 60 minutes.

Table II

Inactivation of the F1 and F2 phages with immune serum

Immune serum		Anti-F1			Anti-F2			Control (broth)	
Serum dilution		1:10	1:100	1:1000	1:10	1:100	1:1000		
Phage tested		F2	F1		F1	F2		F1	F2
Number of infective phage particles	0 min.	412 000	140 000	140 000	140 000	412 000	412 000	140 000	412 000
	5 „	—	100	126 000	—	100	30 000	—	—
	10 „	—	—	64 000	—	—	7 000	—	—
	20 „	—	—	26 100	—	—	100	—	—
	30 „	—	—	23 600	—	—	10	—	—
	40 „	—	—	9000	—	—	—	—	—
	50 „	—	—	4300	—	—	—	—	—
	60 „	400 000	—	2000	182 000	—	—	186 000	490 000

The sign — means: not tested

The homologous F1 strain was most markedly neutralized by the serum, and from the phage material kept in touch with its 1 : 100 dilution it was not possible to demonstrate infective virus particles even after as short a time as 10 minutes.

By the anti-F2 serum the homologous phage was likewise neutralised to a great extent, but even in a 1 : 10 dilution it failed to have an effect on the strain F1.

Table III

Inactivation of the F3 and F3c phages with immune serum

Immune serum		Anti-F3						Control (broth) F3
Serum dilution		1:100	1:1000	1:100	1:1000	1:10	1:10	
Phage tested		F3		F3c		F1	F2	
Number of infective phage particles	0 min.	542 000	542 000	203 000	203 000	663 000	677 000	542 000
	5 „	2060	22 700	1400	13 400	—	—	—
	10 „	1160	3500	375	8000	—	—	—
	20 „	500	910	0	5600	—	—	—
	30 „	80	930	—	1630	—	—	—
	40 „	—	380	—	880	—	—	—
	50 „	—	820	—	1250	—	—	—
	60 „	—	750	—	960	502 000	423 000	620 000

The sign — means: not tested.

The data listed in Table III permit the statement that strain F3 has no serological affinity with strains F1 and F2. At the same time it shows that the anti-F3 serum neutralises the F3 and F3c strains in almost the same degree.

d) *Heat resistance.* Heat resistance of the strains was compared in lactate medium. From the lysates prepared in that medium dilutions were made containing $5{,}10^8$ particles per ml. However, the diluting medium was kept in a water bath at the temperature required by the experiments. Thereafter, the number of infective particles in the samples drawn at intervals were determined.

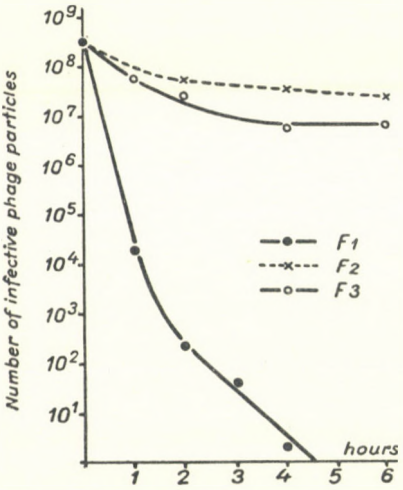


Fig. 5. Heat inactivation at 60° C in F medium

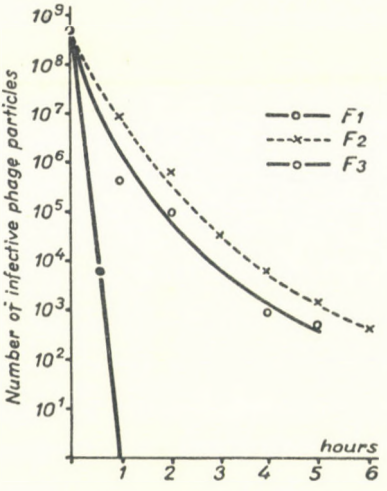


Fig. 6. Heat inactivation at 65° C in F medium

Figs. 5 and 6 illustrate the differences in the heat sensitivity of the virus strains. Remarkable is the heat lability of strain F1.

e) *Sensitivity to citrate.* In the lactate medium, Na citrate was substituted for Na-lactate, and parallel particle counts were made on the two media from the lysate of every virus strain. The strain *Ps. pyocyanea 3R* was found to grow equally well in both media.

On titrating the F2 and F3 viruses, the same number of particles was encountered in each of the two media ; in other words, the particles of the strains are not sensitive to citrate. On the other hand, the F1 virus was found to form 50 per cent less plaques in citrate than in lactate medium, *i. e.* 50 per cent of the particles of the F1 strain can be regarded as sensitive to citrate.

f) *One step growth.* The experiments were carried out in shaken cultures in a water bath at 37°C, using DELBRÜCK and LURIA's method [15].

The details characteristic of the growth cycle of the F1 strain, obtained at various input ratios

$$\left(\text{input ratio} = \frac{\text{number of the bacterial cells}}{\text{number of the phage particles}}\text{present}\right.$$

in the system studied) in expertiments made on different dates, are presented in Table IV.

Table IV

Data characterising one step growth of phage F1 in broth

Serial No.	Input ratio	Adsorption in 8 min.	Latent period,* min.	Burst size**
1	0.057	64%	30	244
2	0.056	66%	30	179
3	0.041	67%	30	213
4	0.16	82%	30	238
5	0.51	71%	30	230

* The latent period is the minimum length of time from adsorption of virus to host cell to lysis of the host cell and release of the progeny of the infecting virus particle.

** Burst size is the average yield of virus particles per infected host cell.

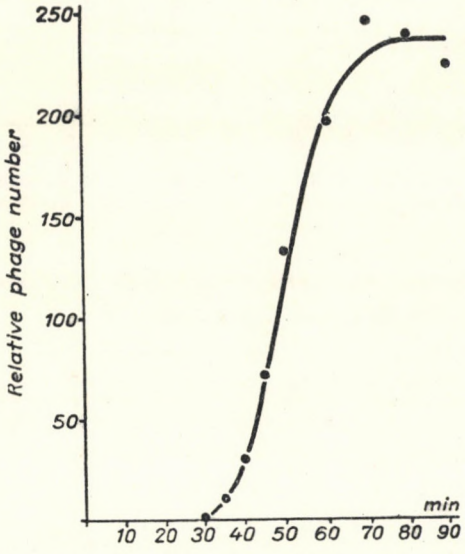


Fig. 7. One step growth curve of phage F1 in broth

Table IV clearly shows that the latent period was uniformly 30 minutes in each of the 5 experiments. For determining the percentage of adsorption the centrifugation method was used. From 66 to 82 per cent of phage F1 were found to adsorb on the susceptible bacteria in 8 min. adsorption time. The burst size

ranged from 179 to 244. The one step growth curve for the F1 phage is illustrated in Fig. 7.

Another characteristic of the growth of the strain F1 was the marked viscosity of the liquid medium when the susceptible bacteria had been lysed. However, in an hour or two this viscosity of the lysate ceased altogether. In cultures undergoing lysis upon the action of the other two viral strains investigated no change in viscosity was observed.

The results obtained by the one step growth experiments made with the strain F2 are shown in Table V.

Table V

Data characterising one step growth of phage F2 in broth

Serial No.	Input ratio	Adsorption in 8 min.	Latent period, min.	Burst size
1	0.67	21%	15	33
2	0.80	18%	15	56

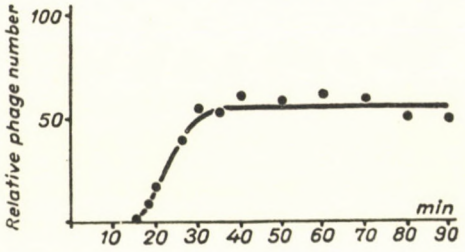


Fig. 8. One step growth curve of phage F2 in broth

The features characterising the growth of this phage were a low adsorption of about 20 per cent, a short latent period not exceeding 15 minutes, and a low average burst size. Accordingly, the one step growth curve differed greatly from that of phage F1 (Fig. 8).

The F3 virus was found completely to lyse the culture in lactate medium at the beginning, but unable to bring about complete lysis after a few passages. In broth, it caused no significant lysis of the culture, with the one step technique its growth was nevertheless demonstrable.

The details characterising the growth cycle of the F3 strain are presented in Table VI.

Low adsorption of about 30 per cent, a 20-minute latent period, and average burst size about 170 or 180 distinguish this virus. Accordingly, its one step growth curve is similar to that of phage F1 (Fig. 9).

Table VI

Data characterising one step growth of phage F3 in F medium

Serial No.	Input ratio	Adsorption in 8 min.	Latent period, min.	Burst size
1	0.32	27%	20	179
2	0.30	30%	20	169

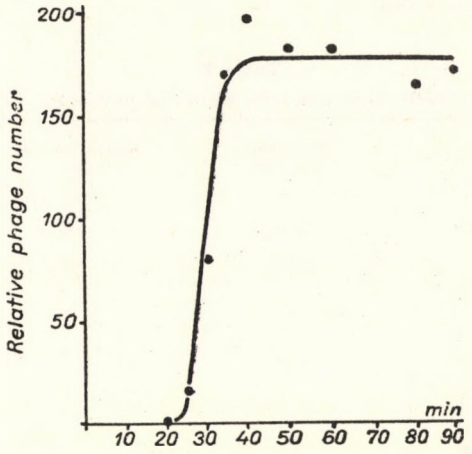


Fig. 9. One step growth curve of phage F3 in broth

Discussion

Phage strains can be classified by their individual properties. In ADAM'S opinion [19], the following properties are of importance in grouping bacterial viruses; 1. serological relationship; 2. size and shape; 3. sensitivity to inactivating agents ; 4. physiological properties ; 5. the results of mixed infections. Comparing these features it is possible to differentiate between phage strains that are very similar to one another.

In characterising the *Ps. pyocyanea* phages studied by us it appeared sufficient to compare the morphological traits of the plaque, the bacterial spectrum, antigenic structure, heat inactivation, sensitivity to citrates, and the characteristics of growth. On the basis of these properties it was possible to establish that each of the phages F1, F2, and F3, represents an independent species. Under the electron microscope all three phages are spherical [20]. Table VII presents a summary of the characteristic properties of the three strains.

According to the nomenclature of JACOB *et al.* [21], the F1 and F2 strains can be regarded virulent phages, as they cannot transform the susceptible bacterium to a lysogenic one, and the plaques they form are of a clear-cut character.

To define the character of the strain F3 is fairly difficult. As to its property of forming plaques it resembles the temperate phages. However, it cannot be regarded as a typical one, for it is a well-defined physiological property of temperate phages that they are capable of giving rise to a lysogenic system [21], and no such capacity could so far be demonstrated in the strain F3.

Table VII

Summary of characteristics of isolated phage strains

Phage	Plaque size	Antigenic structure	Sensitivity to		Percentage adsorption	Latent period, min.	Average burst size	Remarks
			citrates	heat				
F1	small	A	50%	high	60—80	30	150—250	
F2	large	B	0	low	20—25	15	30—60	
F3	large	C	0	low	25—30	20	120—180	Plaque formation on F agar only
F3c	small	C	—	—	—	—	—	

The sign — means, not studied.

On the other hand, the plaque formation of the strain F3 may be of interest for not giving plaques in a complete medium. The particles of this phage can only be demonstrated on the surface of lactate agar poor in nutritive ingredients. Further experiments are needed to elucidate this phenomenon.

As to the process of origin of the F3c mutant further researches are required. Among the colonies of the F3 strain these variants appeared in a single occasion, but then in large numbers. The F3c mutant is not stable. If an isolated colony is picked from the agar, suspended in lactate medium, and its individual particles are immediately tested for plaque formation, each will bear the F3c character. If, on the other hand, the suspension of the picked F3c plaque will be once passaged in the liquid medium, on the strain *Ps. pyocyanea* 3R, in the lysate there will again appear large numbers of particles of the original F3 type plaques. Closer studies of this phenomenon are in progress.

SUMMARY

From sewage water, three different bacteriophages of *Pseudomonas pyocyanea* have been isolated and designated as strains F1, F2, and F3, respectively. Separation of the strains was possible only on lactate agar as the strain F3 failed to form plaques on complete horsemeat-peptone agar.

The plaque morphology, bacterial spectrum, antigenic structure, sensitivity to heat and citrate, and the one step growth cycle of all three strains have been determined. Each of the three phages has been found to represent an independent pyocyaneus phage species. A mutant of the F3 strain forming clear-cut plaques has also been demonstrated.

LITERATURE

1. DICKINSON, L.: J. Gen. Microbiol. **2**, 154 (1948)
2. DICKINSON, L., CODD, S.: J. Gen. Microbiol. **6**, 1 (1952)
3. CHANTRILL, B. H., COULTHARD, O. E., DICKINSON, L., INKLEY, G. W., MORRIS, W., PYLE, A. H.: J. Gen. Microbiol. **6**, 74 (1952)
4. WARNER, P. T. J. C. P.: Brit. J. Exp. Path. **31**, 112 (1950)
5. WARNER, P. T. J. C. P.: Brit. J. Exp. Path. **31**, 242 (1950)
6. DON, P. A., VAN DEN ENDE, M.: J. Hyg. Camb. **48**, 196 (1950)
7. VAN DEN ENDE, M., MEAD, T. H.: S. Afr. J. Clin. Sci. **3**, 23 (1952)
8. VAN DEN ENDE, M., DON, P. A., ELFORD, W. J., CHALLICE, C. E., DAWSON, J. M., HOTCHIN, J. E.: J. Hyg. Camb. **50**, 12 (1952)
9. MEAD, T. H., VAN DEN ENDE, M.: J. Hyg. **50**, 12 (1952)
10. JACOB, F.: Les bactéries lysogènes et la notion de provirus. Masson, Paris, 1954
11. JACOB, F.: Ann. Inst. Past. **82**, 433 (1952)
12. JACOB, F., WOLLMAN, E. L.: Cold Spring Harb. Symp. **18**, 101 (1953)
13. DICKINSON, L.: J. Gen. Microbiol. **11**, 105 (1954)
14. FRIEDLEIN, F.: Biochem. Ztschr. **194**, 273 (1928)
15. DELBRÜCK, M., LURIA, S. E.: Arch. Biochem. **1**, 111 (1943)
16. HERSHEY, A. D., KALMANSON, G., BRONFENBRENNER, J.: J. Immun. **46**, 267 (1943)
17. HORVÁTH, I., ALFÖLDI, L.: Kisérl. Orvostud. **6**, 150 (1954)
18. HORVÁTH, I., ALFÖLDI, L.: Acta Microbiol. Hung. **1**, 495 (1954)
19. ADAMS, M. H.: J. Bact. **64**, 387 (1952)
20. LOVAS, B., ALFÖLDI, L.: To be published.
21. JACOB, F., LWOFF, A., SIMINOVITCH, A., WOLLMAN, E.: Ann. Inst. Past. **84**, 222 (1953)

FREQUENCY OF LYSOGENIC STRAINS IN PSEUDOMONAS PYOCYANEA*

By

L. ALFÖLDI

Institute of Microbiology, Medical University of Szeged

(Received, May 7, 1956)

It is well-known that lysogeny is a frequent property of bacteria. As BURNET [1] stated, many Salmonella strains are lysogenic. However, their frequency varies from one species to another. For instance, *Salmonella thompson* strains may be lysogenic up to 84 per cent. In contrast with this, no lysogenic strains have been found in the *S. pullorum* species [2]. According to BOYD [3, 4], most of the strains of *S. typhimurium* are lysogenic, and so are many *E. coli* strains [5]. FISK [6] found that *Staphylococcus* strains were phage carriers to 44,2 per cent and, according to ROUNTREE [7], some of them can be poly-lysogenic. In *C. diphtheriae*, lysogeny appears to be closely related to the toxin-producing property of the bacterium [8].

Among the strains of *Ps. pyocyanea*, lysogeny is a very common phenomenon, as it may be concluded from the work of WARNER [9] and DON, and VAN DEN ENDE [10]. Their investigations, however, do not state us the frequency of lysogeny among pyocyaneus strains.

The present paper is a study on the frequency of lysogeny in different strains of *Ps. pyocyanea*.

Materials

Bacterial strains. Twenty-six of the 50 *Ps. pyocyanea* strains investigated had been isolated from pus, urine, etc. at our Institute and 24 by Mrs. G. IVÁDY in the Szeged Station of the State Institute of Hygiene. All strains were identified by means of staining, culturing, and biochemical methods. The characteristic biological traits of the strains are listed in Table I.

Culture media. YP medium (yeast extract and peptone): In 200 ml of yeast extract 10 g of Witte peptone were dissolved and the solution was made up to 1 litre. The pH was adjusted to 7,2. Sterilization was made at 120° C for 20 minutes.

Yeast extract: 2 kg of baker's yeast were suspended in 8 litres of tap water, then autoclaved at 110° C for 30 minutes. The supernatant obtained after sedimentation was made to pass through an asbestos filter pad.

UV lamp: A "Hanau" mercury lamp was used as source of ultraviolet light. The characteristics of the lamp was given earlier [11].

* The present paper forms part of the author's thesis, "Studies of virulent and temperate bacteriophages of *Pseudomonas pyocyanea*", submitted to the Hungarian Academy of Sciences.

Table I

Characteristics of the Pseudomonas pyocyanea strains studied

Number of strains	Producing pyocyanin	Liquefying gelatin	Clotting milk	Forming indole	Fermenting		Iridescent
					glucose	sucrose	
50	50	50	50	0	42 (A) 8 (AG)	9 (A) 1 (AG)	23

(A) = acid

(AG) = acid, gas

Experiments and results

LWOFF et al. [12] have shown that by UV irradiation certain lysogenic strains of *B. megaterium* can be induced to produce phages. Inducible strains of *Ps. pyocyanea* have been discovered and properly investigated by JACOB [13]. The inducing effect of UV irradiation, stated by the above mentioned authors, was used to increase the demonstrability of the lysogenic properties of our own pyocyaneus strains : From each of the cultures grown in YP broth for 16 hours, 7 ml were transferred into Petri dishes of 10 cm in diameter to be exposed to UV light from a distance of 40 cm for 30 seconds. Following irradiation the Petri dishes were kept at 37° C for two hours, then the cultures were centrifuged. The supernatants were then investigated for the presence of phages.

The presence of phages was demonstrated on the surface of a YP medium containing 2% agar, poured on metalframed glass plates measuring 30 cm by 15 cm.

Twenty-hour slant agar cultures of *Ps. pyocyanea* were used as indicators. The bacteria were washed with physiological saline and diluted to standard turbidity (0,400 optical density) by an "ORIPHOT" microphotometer. With these suspensions, 5 mm wide streaks were drawn on the surface of the agar plate and the plates were dried. Thereafter, from all supernatants to be examined for presence of temperate phages a loop-ful was dripped on each of these streaks of indicator strains.

All 50 of our *Ps. pyocyanea* strains were investigated for the presence of temperate phages and as indicator 37 of the strains were used.

Since the only purpose of the tests was to show whether the strains were or were not lysogenic, whenever the supernatant caused lysis in any other strain, the given strain was regarded as lysogenic and was not studied any further. The results of these experiments are summarized in Table II.

Table II gives the number of indicator strains used, and the number of those found to be susceptible. It shows that each of the 50 strains of *Ps. pyocyanea* was lysogenic. However, the demonstrability of the lysogenic property is

greatly dependent on the number of strains used as indicators. Thus, for instance, some supernatant lysed only 2 out of the 37 strains used as indicators.

Table II

Lysogenic properties in Pseudomonas pyocyanea strains

Reg. No. of bacteria tested	Number of indicator strains used	Number of indicator strains found to be susceptible	Reg. No. of bacteria tested	Number of indicator strains used	Number of indicator strains found to be susceptible
54159	17	2	3R	24	5
55701	17	1	3S	24	3
56219	17	4	4	24	12
56709	17	13	006	24	13
56765	17	13	188	24	14
57279	17	4	214	24	13
57440	17	6	320	24	9
57455	17	12	525	24	16
53896	20	17	859	24	5
54127	20	5	888	24	12
54149	20	6	931	24	8
54155	20	7	2263	24	10
54159	20	1	2263S	24	14
54185	20	3	2263R	24	14
54205	20	6	2559	24	6
54207	20	6	2560	24	8
54221	20	3	2604	24	10
54244	20	2	44	37	8
54257	20	8	342	37	2
54259	20	4	681	37	12
54263	20	6	53886	37	6
54346	20	6	54247	37	2
1	24	3	54253	37	4
2	24	9	54261	37	4
3	24	3	54269	37	3

Discussion

The experiments reported in this paper were carried out to see how frequently lysogens occurred in strains of *Ps. pyocyanea*. To demonstrate the lysogenic property of our strains numerous indicator strains were used, it being well known that some phages are very markedly specific. It was therefore endeavoured to use as indicators as many strains as possible, and thereby to increase the pro-

bability of demonstrating the lysogenic property. The results of these efforts have indeed confirmed that the more readily is lysogeny demonstrated the greater the number of strains used as indicators. With the number of indicator strains raised to 37, it was possible to prove the lysogenic nature of all the 50 strains of *Ps. pyocyanea* tested.

JACOB [14] has shown that among *Ps. pyocyanea* strains there are some which are capable of producing an antibiotic substance (pyocin), and that this substance is demonstrable on certain sensitive *Ps. pyocyanea* strains. The method applied by us did not exclude the possible presence of pyocin-producers among the strains tested, for the growth of the sensitive *Ps. pyocyanea* strains may equally be inhibited by phage or by pyocin. In the present study no particular effort was made to distinguish between these two phenomena.

SUMMARY

In 50 strains of *Ps. pyocyanea* of different origin the frequency of the lysogenic property was studied. By increasing the number of strains used as indicators it has been possible to prove that all the 50 strains were lysogenic.

Acknowledgement

We are indebted to Mrs. G. IVÁDY for the isolation of 24 *Ps. pyocyanea* strains.

LITERATURE

1. BURNET, F. M.: J. Path. Bact. **35**, 851 (1932)
2. SMITH, H. W.: J. Gen. Microbiol. **5**, 458 (1951)
3. BOYD, J. S. K.: J. Path. Bact. **62**, 501 (1950)
4. BOYD, J. S. K.: J. Hyg. Camb. **49**, 442 (1951)
5. GILDEMEISTER, E., AHLFELD, I.: Zbl. f. Bakt. **147**, 417 (1941)
6. FISK, R. T.: J. Infect. Dis. **71**, 152 (1942)
7. ROUNTREE, P. M.: J. Gen. Microbiol. **3**, 153 (1949)
8. FREEMAN, V. J., MORSE, J. V.: J. Bact. **63**, 403 (1952)
9. WARNER, P. T. J. C. P.: Brit. J. Exp. Path. **31**, 112 (1950)
10. DON P. A. AND VAN DEN ENDE, P. A.: J. Hyg. Camb. **48**, 196 (1950)
11. IVÁNOVICS, G., ALFÖLDI, L.: Acta Microbiol. Hung. **2**, 275 (1955)
12. LWOFF, A., SIMINOVITCH, L., KJELDGAARD, N.: C. R. Acad. Sci. **231**, 190 (1950)
13. JACOB, F.: C. R. Acad. Sci. **231**, 1585 (1950)
14. JACOB, F.: Ann. Inst. Past. **86**, 149 (1954)

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója Műszaki felelős: Farkas Sándor
A kézirat nyomdába érkezett: 1956. VIII. 15. — Terjedelem: 10,75 (A/5) ív, 74 ábra

Akadémiai Nyomda, Gerlóczy u. 2. — 40437 — Felelős vezető: Puskás Ferenc

THE VIRULENCE OF CHLORAMPHENICOL-RESISTANT S. TYPHI STRAINS

By

L. VÁCZI and G. TOLNAI

State Institute of Hygiene, Budapest

(Received January 13, 1956)

Gram-negative intestinal bacteria, including *S. typhi*, can readily be rendered resistant to chloramphenicol *in vitro*. Many aspects of the development of this resistance are, however, not yet clear and there is no sufficient information available concerning the changes in the virulence of resistant strains, either.

The pertaining data in the literature are contradictory. MCKEE and HOUCK [1], BLAIR et al. [2], RAKE et al. [3] claim that the development of *in vitro* resistance to penicillin is associated with a simultaneous decrease in general enzymic functions and in virulence. According to other authors (PETROFF and LUCAS [4], ROBINSON [5]), the streptomycin-resistant Gram-negative bacteria would be not less pathogenic than the susceptible ones. This view has not gained universal acceptance (SCHWARTZ and LAZARUS [6]). CARRERE et al. [7] have reported that the Gram-negative intestinal bacteria resistant to chloramphenicol (including *B. proteus)* show an unchanged virulence. DE and BHUTTACHARYA [8] found that there was almost no difference in MLD between chloramphenicol-resistant and chloramphenicol-susceptible S. typhi strains.

In this paper the changes taking place in the biochemistry, virulence and other properties of chloramphenicol-susceptible and resistant variants of S. typhi strains will be discussed.

Materials and methods

S. typhi strains. These were : Panama carrier 42A58, its avirulent mutant 42A58V, a laboratory strain designated 300, and a strain of Ty2.

Induction of in vitro resistance. The strains were passaged every other day in broth with increasing chloramphenicol concentration.

Biochemical properties. Essential nitrogen demand and fermentation, carbohydrate degradation were examined. The soluble and total N-content of different strains was also estimated.

Essential nitrogen demand was determined in the following basal medium :

ammonium sulphate	0,5 g
NaCl	0,05 g
KH_2PO_4	0,2 g
glucose	0,5 g
distilled water, ad	100,0 g

To this medium were added the different amino acids, in 0,05 and 0,02 per cent concentrations.

Soluble and total nitrogen content was estimated by the KJELDAHL method. The suspensions prepared from 24-hour solid-medium cultures were washed twice with physiological saline and maintained at 100° C in a water bath for 20 minutes. Subsequently the suspensions were centrifuged at 3000 r. p. m. and nitrogen was estimated in the supernatant and sediment.

Test for virulence. Albino mice weighing 16 to 18 g were inoculated intraperitoneally with 0,5 ml of bacterial suspensions prepared from HARTLEY agar slope cultures of different strains, or with organisms from peptone water cultures after dilution with a 5 per cent mucin solution. Virulence was tested on groups of 20 to 24 mice each. Potency ratios were calculated by probit analysis.

Results

The various test strains of S. typhi did not differ significantly in their adaptation to chloramphenicol. The statements made earlier (VÁCZI, MIHÁLYFI [9]) concerning laboratory strains of S. typhi apply also to these well-defined strains of typhoid organisms. Adaptation to chloramphenicol developed in steps and after 6 weeks resistance was about 50 times higher than the original, having risen from 2 μg/ml to 100 μg/ml. The only strain different in this respect was the avirulent mutant of the Panama carrier strain, the one designated 42A58V, which developed resistance to chloramphenicol at a slower rate.

Morphological and biochemical studies of resistant strains

The carbohydrate-degrading activity of susceptible and resistant strains are presented in Table I.

Table I/a

Fermentation by the chloramphenicol-resistant S. typhi strain 42A58

Strain	Carbohydrate	Acid production at		
		6 hrs	8 hrs	24 hrs
S. typhi, susceptible	Dextrose	+	++	+++
	Maltose	+	++	+++
	Mannit	±	++	+++
	Xylose	±	++	+++
	Lactose	—	—	—
	Arabinose	—	—	—
S. typhi, resistant	Dextrose	±	+	++
	Maltose	—	—	+
	Mannit	—	±	++
	Xylose	—	±	++
	Lactose	—	—	—
	Arabinose	—	—	—

Table I/b

Fermentation by the chloramphenicol-resistant S. typhi strain 42A58V

Strain	Carbohydrate	Acid production at		
		6 hrs	8 hrs	24 hrs
S. typhi, susceptible	Dextrose	+	++	+++
	Maltose	+	++	+++
	Mannit	±	++	+++
	Xylose	—	++	+++
	Lactose	—	—	—
	Arabinose	—	—	—
S. typhi, resistant	Dextrose	—	+	++
	Maltose	—	±	++
	Mannit	—	±	++
	Xylose	—	±	++
	Lactose	—	—	—
	Arabinose	—	—	—

As the data in Table I reveal, the only difference in the biochemical characters tested between the susceptible and resistant S. typhi strains was that the latter fermented at a slower rate.

There are no significant morphological differences between susceptible and resistant strains. Although shorter, rodlet, or coccus-like forms did occur in stained preparations of resistant strains, such forms did not constitute more than a few percents of the population.

The fact that susceptible strains differ biochemically from resistant ones, is indicated by the following observation. The resistant strains of S. typhi do not grow in the bismuthsulfite agar (a medium commonly used in routine laboratory practice) and if resistance to chloramphenicol rises above 50 μg/ml, the colonies of the resistant strains on blood agar are surrounded by a beta haemolytic halo (VÁCZI and MIHÁLYFI [9]).

The multiplication of these resistant bacteria was retarded parallel with the increase in the degree of resistance (VÁCZI and MIHÁLYFI [9]).

Is this reduction in the rate of multiplication due to a change in the essential nitrogen demand, or is it the result of an interference with the intracellular utilisation of nitrogen? To elucidate this question, we determined the essential nitrogen demand of susceptible and resistant strains in media containing inorganic nitrogen and different amino acids. The results are shown in Table II.

It can be seen that for growth in synthetic media strain Ty2 needs only inorganic nitrogen and tryptophane. The Panama 42A58 strain demands also cystine, and the avirulent strain 42A58V xanthine, too. The chloramphenicol-resistant variants of these strains also multiply in the media containing the above

amino acids, though their growth is somewhat protracted. Thus, there is no difference between resistant and susceptible strains in essential nitrogen demand.

Table II

Amino acid demand of chloramphenicol-resistant and chloramphenicol-susceptible S. typhi strains

Amino acid	Strains						
	42A58		42A58V		310		Ty 2
	S	R	S	R	S	R	S
Phenylalanine	—	—	—	—	—	—	—
Lysine	—	—	—	—	—	—	—
Tyrosine	—	—	—	—	—	—	—
Cystine	—	—	—	—	—	—	—
Tryptophane	—	—	—	—	+	±	+
Tryptophane + cystine	+	+	—	—	+	+	+
Tryptophane + cystine + xanthine	+	+	+	+	+	+	+

Is there any difference between the two types of strain in the utilisation of nitrogen and amino acids?

To answer this question, 18-hour cultures of susceptible and resistant S. typhi strains were tested for soluble amino acids and for other soluble substances containing nitrogen. The technique of elution was essentially that described by GALE [10]: after boiling for 20 minutes, the bacterial suspensions were centrifuged and the nitrogen in the original suspension and in the supernatant of the boiled product was estimated by the KJELDAHL method. In Table III the amount of soluble N is given as the percentage of total N.

Table III

Soluble N content of chloramphenicol-susceptible and chloramphenicol-resistant S. typhi strains in percentage of total N

Strains	susceptible	resistant
No. 1	25	31
No. 2	26	27
No. 3	24	32
No. 4	17,5	25
Mean	23,1	28,7

The data in Table III reveal that the resistant cells contained somewhat more soluble nitrogen than the susceptible ones, indicating that the synthetic processes were somewhat slower.

How do these changes affect the virulence of resistant microorganisms?

The different strains of S. typhi were tested for virulence by the technique already described. The results are presented in Table IV. In the upper section of theTable the mouse MLD of strain Ty2 is the reference mouse MLD, while in the lower section it is the mouse MLD of strain 42A58. Potency ratios have been determined by probit analysis.

Table IV

Lethal action on mice of the test strains of S. typhi
(Mucin method)

Strains	Potency ratio		
Ty2		1	
42A58	0,3	1,3	6,4
300 S	$2{,}3 \cdot 10^{-4}$	$8{,}7 \cdot 10^{-4}$	$2{,}8 \cdot 10^{-3}$
300 R		0	
42A58		1	
42A58R	$2{,}0 \cdot 10^{-8}$	$1{,}2 \cdot 10^{-6}$	$1{,}1 \cdot 10^{-5}$
42A58V	$3{,}4 \cdot 10^{-7}$	$2{,}5 \cdot 10^{-6}$	$1{,}1 \cdot 10^{-5}$
42A58VR	$6{,}7 \cdot 10^{-7}$	$3{,}2 \cdot 10^{-6}$	$1{,}3 \cdot 10^{-5}$

It is obvious that as resistance to chloramphenicol increased, the virulence declined. As compared to other strains, the laboratory strain 300 É had a very low virulence for mice and its chloramphenicol-resistant variant was practically non-lethal for the mouse.

On reaching a 100 U/ml level of resistance to chloramphenicol, the virulence of the Panama strain 42A58 decreased by 6 logarithmic units. Like BATSON et al. [11] we, too, found the avirulent mutant 42A58V to possess almost no lethal effect on mice. The chloramphenicol-resistant of this mutant was closely similar in lethal action on the mouse to the resistant variant.

What is responsible for the decreased virulence of chloramphenicol-resistant S. typhi strains?

In detalied studies of the S. typhi strains 42A58 and 42A58V, FORMAL et al. [12] found that the avirulent mutant non-lethal for mice (strain 42A58V) increased its virulence to almost the level of the original strain when injected into mice in combination with xanthine. It has been pointed out above that on becoming resistant to chloramphenicol the virulence of the avirulent mutant does not decrease further in a measurable degree, yet, the strain undergoes at the same time all the biochemical changes described for the other strains.

The question therefore arose whether it would be possible to action on mice of the avirulent, chloramphenicol-resistant mutant by xanthine? If so, than this

would speak against the claim that while acquiring resistance to chloramphenicol the strains undergo such important qualitative changes which affect virulence. To decide the problem, mice were injected with the resistant strain suspended in mucin, together with 10 mg of xanthine, suspended in a pH 7,2 buffer, in a total volume of 0,5 ml, by the intraperitoneal route. The results are presented in Table V.

Table V

Lethal action on mice of the mutants of strain 42A58
(Mucin method)

Strains	Potency ratio		
42A58	1		
42A58V without xanthine	$3{,}4 \cdot 10^{-7}$	$2{,}5 \cdot 10^{-6}$	$1{,}1 \cdot 10^{-5}$
42A58V with xanthine	$1{,}3 \cdot 10^{-1}$	$5{,}8 \cdot 10^{-1}$	$2{,}3 \cdot 10^{-0}$
42A58VR without xanthine	$6{,}7 \cdot 10^{-7}$	$3{,}2 \cdot 10^{-6}$	$1{,}3 \cdot 10^{-5}$
42A58VR with xanthine	$4{,}4 \cdot 10^{-5}$	$1{,}0 \cdot 10^{-3}$	$9{,}9 \cdot 10^{-3}$

The data in Table V reveal that the virulence of the resistant avirulent mutant could be greatly enhanced by xanthine. As related to the original strain, the virulence and mouse-killing potency of the resistant strain increased 1000-fold, though it did not reach the virulence of the original, susceptible strain. The difference may be ascribed to the different growth rates of the two variants.

Discussion

Bacterial virulence, *i. e.* the ability of a bacterium to induce disease in the host, is the resultant of a variety of cellular activities. Even a minimum change in bacterial metabolism may cause a shift in virulence. The Vi antigen is known to play a role of considerable importance in the virulence of S. typhi strains, and for long it was generally considered as being the principle factor of virulence. Earlier investigations by VÁCZI and MIHÁLYFI [9], as well as data in the literature indicate that, as compared to susceptible strains, the chloramphenicol-resistant S. typhi strains contain considerably less Vi antigen. Thus, a change has taken place in the surface antigen. Is it accordingly due to the loss in Vi antigen that the considerable loss in virulence takes place or is it a change in the metabolism of the resistant bacterium which is responsible for it? Our observations concerning the growth of, and rate of synthesis in, bacteria tend to support the latter possibility. These changes in metabolism can be characterized as follows.

While developing resistance to chloramphenicol, the metabolism of S. typhi strains is slowed down and their synthetizing abilities are decreased.

In addition, their fermentative activities also diminish. As a result of the diminution effecting the above two principle metabolic processes, the resistant strains will differ in growth rate from the susceptible ones. Growth rate is one of the factors of bacterial virulence. A general reduction in growth rate may thus result in a decrease of virulence. Unlike DE and BHUTTACHARYA, we have found that each of our test strains lost considerable virulence in the course of acquiring resistance to chloramphenicol. The fundamental issue is whether this loss of virulence results from a general slowing-down of assimilation or whether some other mechanism is also involved.

BATSON et al. [11] reported that on injecting the avirulent mutant 42A58V in combination with xanthine, its virulence could be raised to a degree comparable to that of the virulent strain. In our experiments, xanthine enhanced approximately 1000-fold the virulence of the chloramphenicol resistant avirulent mutant. This seems to indicate that a decrease of general cellular metabolism rate and the slower rate of multiplication secondary to it are primarily responsible for the loss of virulence.

Another proof supporting this view is that xanthine will restore the virulence of resistant strains only in a measure comparable to the quantitative difference in growth rate between the susceptible and resistant cells. As related to the virulent Panama strain, the potency ratio of strain 42A58V is of the order of $2{,}5 \cdot 10^{-6}$. At the same time, the potency ratio of the strain designated 42A58R (which has a much slower metabolism, a longer resting phase and a flat logarithmic phase) is $3{,}2 \cdot 10^{-6}$ without xanthine. When given in combination with xanthine, the potency ratio increases to 10^{-6}. This means that the resistant avirulent strain is not so virulent as the susceptible avirulent one given in combination with xanthine, but the increase (by 3 orders of magnitude) of the potency ratio points at a common mode of action.

Summary

1. Chloramphenicol-resistant *S. typhi* strains ferment the various carbohydrates in a similar way as, but at a slower rate than, susceptible strains.

2. Resistant S. typhi strains do not grow in bismuthsulfite agar.

3. The amino acid demand of resistant S. typhi strains is not different from that of susceptible strains.

4. Resistant S. typhi strains utilise organic and inorganic nitrogen at a slower rate than susceptible strains and in rate of growth lag far behind the latter.

5. As compared to that of susceptible strains, the virulence of resistant strains is considerably reduced.

6. Like in the original strain, the loss of virulence of the resistant variant of the xanthine-dependent mutant 42A58V could also be counterbalanced with xanthine.

7. The above statements indicate that the high loss of virulence suffered by chloramphenicol-resistant S. typhi strains has to be ascribed first of all to a general decrease in the cellular metabolism rate.

LITERATURE

1. McKee, C. H. and Houck, C. H.: J. Bact. **47**, 187 (1944).
2. Blair, J. E., Carr, H. and Buchmann, I.: J. Immunol. **52**, 281 (1946).
3. Rake, G. et al.: J. Immunol. **48**, 271 (1944).
4. Petroff, B. P. and Lucas, F. V.: Ann. Surg. **123**, 808 (1946).
5. Robinson, H. J.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **48**, 119 (1946).
6. Schwartz, L. H. and Lazarus, I. A.: J. Bact. **53**, 128 (1947).
7. Carrère, L., Roux, J. et al.: Rev. d'Immunol. **15**, 353 (1951).
8. De, S. P. and Bhuttacharya, S.: J. Ind. Med. Ass. **22**, 144 (1953).
9. Váczi, L. and Mihályfi, I.: Acta Microbiol. Hung. (In the press.)
10. Gale, et al.: Bull. Hyg. **22**, 528 (1947).
11. Batson, H. C., Landy, H. and Abraham, A.: Public Health Rep. (U. S.) **64**, 671 (1949).
12. Formal, B. S., Baron, L. S. and Spilman, W.: J. Bact. **68**, 117 (1954).

ERGEBNISSE UND METHODEN DER IN VITRO UNTERSUCHUNG VON ANTITUBERKULOTIKA

Von

L. EIDUS, O. CLAUDER und K. VÁGI-KOLBÁN

I. Innere Klinik und Klinik für Lungenkrankheiten der Medizinischen Universität, Budapest

(Eingegangen am 2. März 1956)

Aus der Diskussion über PAS und ihre Derivate ging hervor, dass die mikrobiologische Untersuchung der Wirkung antituberkulöser Mittel je nach benutztem Nährboden, Stamm und Grösse des Inokulums, Zeitpunkt und Art der Ablesung sehr verschiedene Resultate ergibt. Es kamen auch 100—200fache Differenzen vor [2, 13, 22, 23, 27, 37]. Die einzelnen Mittel zeigten Abweichungen nicht nur im absoluten Wert, sondern auch im Verhältnis zueinander.

Die auf diesem Gebiet herrschenden Unstimmigkeiten treten sehr deutlich aus der Literaturzusammenstellung von LEMBKE und KRÜGER-THIEMER [37] hervor. Die Untersuchung der von den Autoren erwähnten 898 Substanzen wurde von nahezu 200 Forschern auf etwa 25 Nährbodenvarianten mit verschiedenen Stämmen und den verschiedensten Einmessungs- und Ablesungsmethoden vorgenommen.

Nachfolgend wollen wir unsere bei der Auswertung der Antituberkulotika angewandte Methode und die damit zusammenhängenden Beobachtungen mitteilen.

Ein wichtiger Gesichtspunkt bei der Untersuchung der Antituberkulotika ist die Benutzung eines entsprechenden Nährbodens. Im Hinblick darauf, dass sich die Koch-Bakterien (KB) sehr langsam vermehren, schien ein Nährboden am geeignetsten, der auch bei Anwendung kleiner Inokula rasches Wachstum gewährleistet. Dieser Anforderung entspricht in erster Linie der DUBOSSche Nährboden, der jedoch den Nachteil aufweist, dass die detergente Substanz „Tween 80" die Wirkung einzelner Antituberkulotika hemmt und die anderer steigert [3, 20, 29, 49, 62]. Ein ähnlicher Einwand wurde auch schon im Zusammenhang mit Streptomycin-Resistenzuntersuchungen geäussert (FISCHER [19]; WILLISTON und YOUMANS [60]). Wie auch aus der zusammenfassenden Arbeit von LEMBKE und KRÜGER—THIEMER [37] hervorgeht, bevorzugen daher zahlreiche Autoren die Anwendung von flüssigen Nährböden (Typus Kirchner) (SOLTYS [48], WELSCH [59]), YOUMANS und Mitarbeiter führten die Untersuchung von 3500 Substanzen ebenfalls auf dem modifizierten BECK—PROSKAUERschen synthetischen und durch Serum ergänzten Nährboden durch.

Bezüglich der synthetischen Nährböden müssen wir uns dem Einwand von IVÁNOVICS [26] anschliessen, wonach die Wirkung der untersuchten Substanzen auf die Oberflächenspannung des Nährbodens die Oberflächenkulturen — unabhängig von ihrer bakteriostatischen Wirkung — hochgradig zu beeinflussen vermag. Der Gebrauch synthetischer Nährböden ist zweifellos auch umständlich und ausser der Materialverschwendung sind auch die Resultate weniger zuverlässig. Auch ist die Relation der serumhaltigen Nährböden zu den in vivo-Verhältnissen günstiger als die der synthetischen [37].

Auf Grund dieser Überlegungen nahmen wir unsere Untersuchungen auf dem modifizierten SULAschen [48a] Nährboden vor. Die Modifikation bestand

darin, dass wir die 10 Vol%ige Aszitesflüssigkeit durch lyophilisiertes Rinderplasma substituierten [12, 6, 16, 34], welches der Nährboden in 4%iger Menge enthielt. Die gravimetrisch zugemessene Proteinquelle von konstanter Zusammensetzung ermöglichte konstante Versuchsbedingungen. Ausserdem verminderten wir den Malachitgrüngehalt des Nährbodens, indem wir je Liter 1 ml 0,1%ige wässrige Lösung benutzten. Malachitgrün verzögert nämlich das Angehen der Kulturen, worauf auch VIETINGHOFF-SCHEEL [58] hingewiesen hat. Die zur Bereitung des Nährbodens verwendeten Chemikalien waren analytischer Qualität. Die eventuellen Verunreiningungen der Chemikalien sowie die

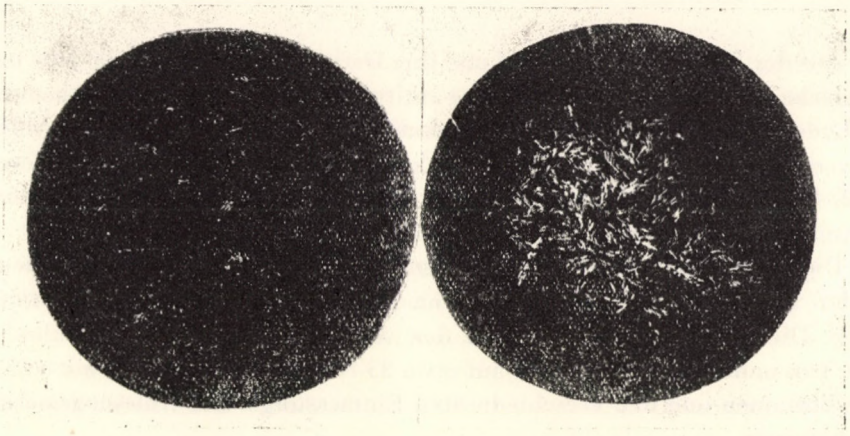


Abb. 1. Das mikroskopische Bild der zur Infektion angewandte KB-Suspension

Hemmungswirkung der untersuchten Substanzen können sich summieren und Anlass zu Irrtümmern geben [43].

Für die Versuche benutzten wir dicke, randlose, 16×160 mm grosse Reagensgläser. Die neuen Eprouvetten wurden 3—4 Tage in Wasser oder 2% Salzsäure enthaltendes Wasser gelegt, dann ausgekocht und erst hiernach in Gebrauch genommen. Die Röhrchen wurden mit Papierwatte zugestöpselt und in Trockenluft bei 160° C 2 Stunden lang entkeimt. Wir stimmen mit TISON [55] darin überein, dass die Anwendung von Papierwatte [10a] keinen Nachteil bedeutet.

Zum genauen Abfüllen des Nährbodens konstruierten wir einen Apparat [34].

Dieser sterile Abfüllapparat bildet ein geschlossenes System. Das Wesentliche der Vorrichtung besteht darin, dass der Nährboden aus dem aufgehängten Kugelkolben in den rechten Schenkel eines U-förmigen Rohres und dann durch den in der Mitte befindlichen V-förmigen Hahn in den als Bürette gestalteten kalibrierten linken Schenkel fliesst. Beim Umdrehen des V-förmigen Hahns fliesst der Nährboden aus der Bürette in das Ausflussrohr unter der Glocke bzw. in die dorthin gestellten Eprouvetten. Wenn die allgemeinen Vorschriften für den Abfüllraum eingehalten wurden, enthielten unsere Nährböden keine Verunreinigungen. Die Sicherheit der Arbeit lässt sich noch durch Anwendung eines Quarzlampe erhöhen.

Die Suspensionen zur Infektion bereiteten wir im allgemeinen aus Oberflächenkulturen, wobei wir nur die charakteristische R-Variante in Anspruch nahmen. Bei der Herstellung der Suspensionen wurden die KB-Knäuel einige Male auf sterilem Filterpapier gewendet, auf der analytischen Waage gewogen und mit neuen unverletzten Glaskügelchen zerstossen. Die so hergestellte Suspension war verhältnismässig homogen und leicht opaleszierend.

Die Suspension wurde auch mikroskopisch nachgeprüft. Zu diesem Zweck klebten wir mit Eiweiss einen 1 cm^2 Fläche umschliessenden Glaszylinder mit geschliffenem Ende auf den Objektträger, der mehrmals durch die Flamme gezogen wurde. Nach der Fixierung haftete der Glaszylinder sehr fest am Objektträger. Hiernach strichen wir auf den Objektträger innerhalb des Glaskreises eine dünne Eiweissschicht ; dann gaben wir einen konstant grossen Tropfen der KB-Suspension hinzu und liessen das Präparat an der Luft trocknen. Nach Entfernung der Glaszylinderscheibe wurde die fixierte Suspension nach ZIEHL—NEELSEN — ohne Gegenfärbung — gefärbt. Das mikroskopische Bild kann neben einzelnen Bakterien auch einige locker zusammenhängende Bakterienkonglomerate aufweisen (Abb. 1).

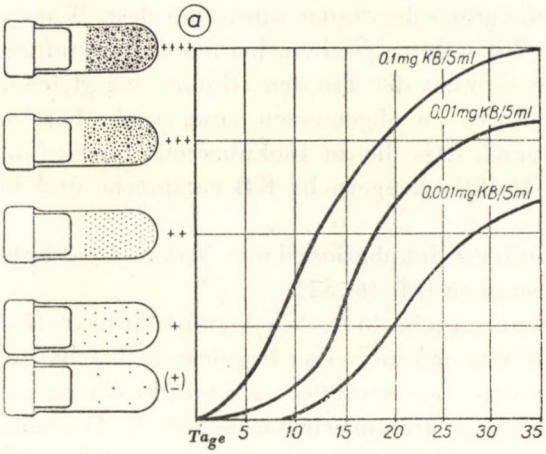
Die Beimpfung des Nährbodens erfolgte mit einer Spritze, an der eine lange dünne Nadel befestigt ist. Die Tropfengrösse der Nadel wurde mit dest. Wasser auf der Torsionswaage kontrolliert. Wir wählten Nadeln, bei deren Anwendung 1 ml 30—33 Tropfen entsprach. Das Gewicht der Tropfen stimmte bei gleicher Spritzenhaltung und gleichem Verfahren im allgemeinen annähernd überein. Die Suspension wurde derart verdünnt, dass die zu inokulierende Menge auf 5 ml Nährboden gerechnet 0,1 mg Halbtrockengewicht KB entspreche und in 3 Tropfen enthalten sei.

Die Grösse des Inokulums und die Inkubationsdauer stehen innerhalb gewisser Grenzen in Korrelation zueinander [24, 46, 52].

Die bei der Ablesung der Ergebnisse beobachtete Wachstumintensität wird im allgemeinen mit Kreuzen bezeichnet, und zwar das beginnende Wachstum mit einem Kreuz (+), das mittelmässige mit zwei (++), starkes Wachstum mit drei und vier Kreuzen. Die meisten Autoren überlassen jedoch die Deutung der Abweichungen zwischen den einzelnen Abstufungen dem Leser. Über die Zusammenhänge zwischen der Grösse des Inokulums sowie Dauer und Ausmass des Wachstums orientieren nachfolgende schematische Zeichnung und Photographie (Abb. 2). Die Abbildung wurde auf Grund von 4 Parallelversuchen zusammengestellt.

Die zu verschiedenen Zeitpunkten beobachtete Wachstumsintensität lässt sich von der Abbildung ablesen. Bei unseren Versuchen rechneten wir die ±-Werte zur Hemmung. Mit Rücksicht darauf, dass die einzelnen Substanzen während der langen Inkubationsdauer an Wirkungswert verlieren können, anderseits bei INH und seinen Derivaten die Inkubationszeit die Hemmungswerte stark beeinflusst [14, 15, 33], nahmen wir bei unseren Versuchen bei einem

Inokulum von 0,1 mg die Ablesung parallel nach 2 und 3 Wochen vor. Die Ergebnisse der 14tägigen Ablesung waren sehr gut bewertbar. Die Ablesung nach 2 und 3 Wochen ergab im allgemeinen keine abweichenden Resultate ; wo die Abweichung auffallend war, wird in der Tabelle gesondert darauf verwiesen. Durch die dreiwöchige Ablesung lässt sich vermeiden, dass ein eventueller später



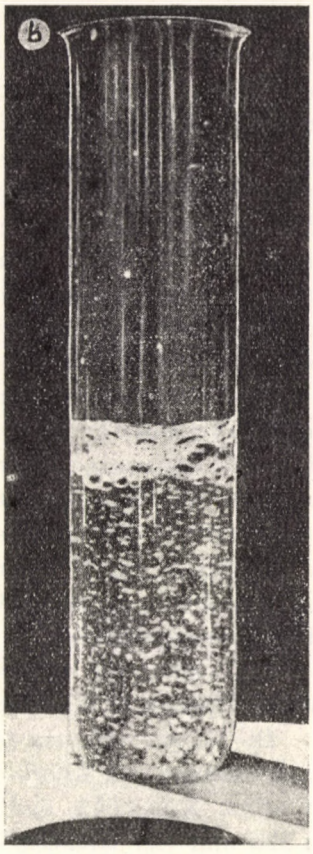


Abb. 2. Zusammenhang zwischen der Grösse des Inoculums und dem Wachstum der Koch-Bazillen. b) Das ++++ Wachstum

Wachstumsbeginn — den wir z. B. bei Aureomycin beobachteten — als Hemmung angesehen wird.

Die zu testierende Substanz wurde in Alkohol gelöst sterilisiert. Die weiteren Verdünnungen nahmen wir aus der alkoholischen Stammlösung mit sterilem dest. Wasser vor. Dieses auf Empfehlung von IVÁNOVICS [28] durchgeführte Verfahren hat sich bei unseren Versuchen bewährt und die Arbeit vereinfacht. Die in Alkohol unlöslichen Substanzen wurden in $^1/_{20}$ n natronlauge- oder salzsäurehaltigem Alkohol gelöst. Gelegentlich wurde für die unlöslichen Substanzen

Glyzerin benutzt. Granegillin [10] wurde uns von der Herstellerin bereits in gelöstem Zustand zur Verfügung gestellt. Das Untersuchungsmaterial wurde etwa 60—72 Stunden nach der Infektion dem Nährboden zugemessen.

Besprechung

Die untersuchten Substanzen lassen sich in mehrere Gruppen einreihen: Antibiotika, Isinikotinsäurehydrazid- sowie Zyanessigsäurehydrazid-Derivate, andere Hydrazine, PAS, Oxychinolin, Biguanidin- und Triazin-Derivate, Thiokarbamid und andere Verbindungen.

Unter den Antibiotika (Tabelle I) verdient Aureomycin Beachtung, das sich auf dem DUBOSSchen Nährboden in einer Menge von 5 bis 10 gamma/ml als wirkungshemmend erwies. Auf dem SULASchen Medium hemmte es in den ersten 10 Versuchstagen bis zu 5 gamma die KB-Vermehrung ausgeprägt, hiernach hörte seine tuberkulostatische Wirkung plötzlich auf, und selbst bei 50 gamma/ml sahen wir noch Wachstum. Bei Wiederholung der Versuchsserie stellten wir erneut den verzögerten Beginn der Vermehrung fest. Auch nach STEENKEN und WOLINSKY [47] hängt die Hemmungswirkung des Aureomycins vom benutzten Nährboden und von der Inkubationsdauer ab. Im Tierversuch und bei der klinischen Anwendung hat es sich jedoch als wirkungslos erwiesen [39, 47, 50].

Die hemmende Wirkung von Chloramphenicol ist bekannt. In der Literatur wird als tuberkulostatischer Titer 6,25—25 gamma/ml angegeben [1, 30]. Nach unseren Untersuchungsergebnissen hemmte razemisches Chloramphenicol in der Konzentration 10 gamma/ml das Wachstum des Stammes $H_{37}RV$. Im Tierversuch war es subkutan gegeben wirkungslos; in 0,5%iger Menge zum Futter gemischt heilte es bis zu einem gewissen Grade die experimentelle Tuberkulose der Mäuse. Das gleiche beobachteten auch YOUMANS und Mitarbeiter [63].

Zur ausgedehnten Untersuchung der Isonikotinsäurehydrazid-Derivate (Tabelle III) veranlasste uns der Umstand, dass einzelne Derivate annähernd die gleiche tuberkulostatische Wirkung wie INH besitzen, während sich jedoch ihre akute Toxizität wesentlich günstiger gestaltet [6]. Auf diese Tatsache wurde auch von STSCHUKINA [44] und DOMAGK sowie von den ungarischen Autoren TOLDY und Mitarbeiter [54] hingewiesen. Einige Hydrazon-Derivate gelangten auch in Handel: Ftivasid (Sowjetunion), Mycobactil (Frankreich). Im Laufe unserer Untersuchungen fanden wir mehrere wirksame Derivate:

1552. 1-Isonikotinyl-2(aethyl)-aethyliden-hydrazin.
1453. 1-Isonikotinyl-2(anisyliden)-hydrazin.
1454. 1-Isonikotinyl-2(α-aethyl-oxybenzyliden)-hydrazin.
1534. 1-Isonikotinyl-2(α-carboxymethyl-cyklopentanyliden)-hydrazin.
1457. 1-Isonikotinyl-2-cyklohexanyliden-hydrazin.
1456. 1-Isonikotinyl-2-furfuryliden-hydrazin.

Tierversuche werden erst klären müssen, ob sich diese in vitro-Resultate in der Humantherapie verwerten lassen. Zur Untersuchung der Hydrazon-Derivate hatten uns aber auch andere Gesichtspunkte veranlasst. Bei INH-Ausscheidungsuntersuchungen war nämlich festgestellt worden, dass die tuberkulostatische Wirkung des Harns lediglich 7—15% der per os eingenommenen INH-Menge entspricht.

Von der Beobachtung WOLLENBERGS [61] ausgehend, wonach bei Zuckerkranken INH im Harn an Zucker gebunden erscheint — wodurch seine Hemmungsfähigkeit wesentlich herabgesetzt wird —, suchten wir der auf biologischem Wege vor sich gehenden unerwünschten Hydrazonbildung durch entsprechende Bindung des Hydrazin-Radikals vorzugreifen.

Zyanessigsäure und ihre Derivate waren schwach wirksam. Die bei den in vitro-Versuchen gewonnenen Hemmungswerte waren niedriger als der in der Therapie beobachtete mittlere Zyanessigsäure-Blutspiegel (Tabelle IV). Ausserdem ist Zyanessigsäurehydrazid auf INH-resistente Stämme — wie wir bereits mitteilten — ohne Wirkung [7]. Unsere Laboratoriumsuntersuchungen bieten daher keine Erklärung für die günstigen klinischen Resultate [22a, 35, 40, 42, 45]. Auf Grund von in vitro- und in vivo-Versuchen gelangten SZABÓ und Mitarbeiter zu den gleichen Feststellungen wie wir [52].

Mit der tuberkulostatischen Wirkung der PAS-Derivate haben wir uns bereits in mehreren Mitteilungen befasst [8, 11, 13, 14, 15, 32, 38] (Tabelle II). Diese wirkten — was auch STAUB [51] hervorhebt — fast ausnahmslos weniger günstig als die Mutterverbindung [13, 23, 25, 53]. Laut FREIERE [21] wirkte der Salol entsprechende PAS-Phenylester [8] in vitro und in vivo besser als PAS selbst. Wir sahen bei Anwendung von PAS-Propylester im Tierversuch günstigere Heilungsresultate als von PAS [11]. PAS-Hydrazid erwies sich in vitro als wirksam [14, 31, 32], wirkte aber im Tierversuch nicht besser als PAS [38].

ERLENMEYER und Mitarbeiter [17] hatten nachgewiesen, dass 8-Oxy- und 8-Aminochinolin in vitro über beträchtliche tuberkulostatische Wirkung verfügen. BORN und Mitarbeitern [4, 5] kommt das Verdienst zu, die tuberkulostatische Wirkung der 8-Oxychinolin-Derivate eingehend untersucht zu haben. Im Anschluss an ihre Arbeiten fanden einige Autoren die 8-Oxychinolin-Derivate auch in vivo wirksam [56].

Bei unseren in vitro-Untersuchungen zeigten das von BORN empfohlene Dibrom sowie 5-Methyl-8-oxychinolin tatsächlich eine auffallende, dem Streptomycin gleichwertige oder diese noch übertreffende tuberkulostatische Wirkung.

Die infolgedessen in Gang gesetzten Tierversuche brachten jedoch — wie dies bei tuberkulostatischen Substanzen so häufig vorkommt — eine Enttäuschung. Auch NÓGRÁDY und Mitarbeiter [41] fanden 8-Oxychinolin in vivo unwirksam. In weiteren Versuchen waren wir daher bestrebt, 8-Oxychinolin nach entsprechender Lösung als grobes Desinfiziens und Spülungsmittel zu erproben.

Von den untersuchten Biguanid- und Thiokarbamid-Derivaten waren nur p-Chlorphenyl-biguanid bzw. Thiokarbamid einigermassen wirksam (Tabelle V). Von den anderen Verbindungen zeigte ausschliesslich Vuzinbihydrochloricum (1544) Hemmungswirkung.

Zusammenfassung

Die antituberkulostatische Wirkung der grösstenteils von uns selbst synthetisierter Verbindungen wurde in Reagensglasversuchen ermittelt. In diesem Zusammenhang erfolgt die eingehende Mitteilung der angewandten Versuchsmethoden. Es wird betont, dass bei der Untersuchung von Antituberkulotika auf flüssigen Nährböden zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse nur bei Verwendung entsprechend zusammengesetzter Medien, Chemikalien von pro anal.-Qualität und Konstanz der Proteinquelle gewonnen werden können. Für die Versuche wurde ein virulent erhaltener $H_{37}RV$-Stamm benutzt, der aus einer 14tägigen Oberflächenkultur gewonnen wurde. Die Infektion des Nährbodens erfolgte unter Verwendung einer Spritze mit kalibrierter Tropfenzahl aus einer verhältnismässig homogenen Suspension. Die Nährböden wurden je 5 ml mit 0,1 mg Koch-Bakterien (Halbtrockengewicht) infiziert und die Ergebnisse am 14. Tage abgelesen. Die Entkeimung des Untersuchungsmaterials erfolgte in Alkohol; die alkoholische Stammlösung wurde mit dest. Wasser weiter verdünnt. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabellen zusammengefasst.

LITERATUR

1. Baron, A. L.: Handbook of Antibiotics. Reinhold, New York, 1950.
2. Benedict, Eibel: Mnschr. Chem., **81**, 27 (1950).
3. Bloch, H., Erlenmeyer, H., Suter, E.: Experientia **3**, 199 (1947).
4. Born, J., Koczka, I., Maron: Orv. Hetil., **91**, 878 (1950).
5. Born, J., Szabó, I.: Orv. Hetil., **93**, 400 (1952).
6. Clauder, O., Eidus, L., Szabó, L., Róka, J., Vági, K.: Orv. Hetil. **94**, 1410 (1953).
7. Clauder, O., Eidus, L., Szücs, S., V. Kolbán, K.: Tbc. Kérdései, **8**, 45 (1955).
8. Clauder, O., Toldy, L., Fabricius, L.: Magy. Kém. Lap., **55**, 596 (1949).
9. Тшерткова, Е. И.: Пробл. Туберк. **62**, (1950).
10. Csillag, A.: Kísérl. Orvostud. **5**, 32 (1953).
10a. Drea, W. F.: S. Bact. **44**, 149 (1942).
11. Eidus, L., Solymoss, B., Szabó, I.: Kísérl. Orvostud. **3**, 369 (1951).
12. Eidus, L., Clauder, O., Bagdy, D., Róka, J.: Kísérl. Orvostud., **7**, 150 (1955).
13. Eidus, L., Forgách, V., Szabó, I.: Kísérl. Orvostud., **4**, 91 (1952).
14. Eidus, L., Lányi, M.: Vortrag auf der wissenschaftlichen Sitzung der Lungenklinik am 12. VI. 1952.
15. Eidus, L., Lányi, M.: Ztschr. Tbk. **102**, 1963 (1953).
16. Eidus, L., Szabó, I.: Tbc. Kérdései **7**, 41 (1954).
17. Erlenmeyer, H.: Helv. Chim. Acta **31**, 1975 (1948); **28**, 1406 (1945) zit. Wojahn.
18. Erlenmeyer, H., Noll, H., Sorkin, E.: Helv. Chim. Acta **32**, 605 (1949).
19. Fischer, M. V.: Amer. Rev. Tuberc. **57**, 58 (1948).
20. Forrest, H. S., Hart, T. D., Walker, J.: Nature **160**, 94 (1947).
21. Freiere, S. A.: C. R. Acad. Sci. **231**, 728 (1950).
22. Goodacre, C. L., Mitchell, B. W., Saymour, D. E.: Quart. J. Pharm. Pharmacol. **21**, 301 (1948).
22a. Hartl, W.: Schweiz. Ztschr. Tbk. **11**, 65 (1954).
23. Hirth, R., Hurni, H.: Helv. Chim. Acta **32**, 378 (1949).
24. Holmgren, N. B., Youmans, G. P.: Amer. Rev. Tuberc. **66**, 416 (1952).
25. Hurni, Hirth, R., Ragaz, L.: Schweiz. Ztschr. allg. Path. Bact. **14**, 17 (1951).
26. Ivánovics, Gy.: Orv. Hetil. **90**, 366 (1949).
27. Ivánovics, Gy.: Orv. Hetil. **90**, 289 (1949).
28. Ivánovics, Gy.: Persönliche Mitteilung.
29. Kirby, W. M., Dubos, R. J.: Proc. Soc. Exper. Biol. **66**, 120 (1947).
30. Klosa, J.: Antibiotica. V. Technik, Berlin (1952).
31. Koczka, I.: Orv. Hetil. **93**, 1273 (1952).
32. Kováts, F., Eidus, L., Lányi, M.: Tbc. Kérdései **5**, 43 (1952).

33. KOVÁTS, F., EIDUS, É., LÁNYI, M.: Orv. Hetil. **94**, 225 (1953).
34. KOVÁTS, F., EIDUS, L., LÁNYI, M.: Rev. Tuberc. **19**, 59 (1955).
35. KÖZÉPESSY: Gyógyszereink, **19** (1954).
36. LEHMANN, J.: Nordisk. Med. **33**, 140 (1947).
37. LEMBKE, A., KRÜGER-THIEMER, E.: Zbl. Bact. Ergheft **7**, 149. Fischer, Jena (1952).
38. LÁNYI, M., SOLYMOS, B., SZÜCS, S., EIDUS, L.: Kísérl. Orvostud. **5**, 282 (1953).
39. LONG, P. H.: J. Amer. Pharm. **121**, 64 (1949).
40. MÁNDY, L.: Vortrag auf dem Kongress für Lungenheilkunde, Budapest (1954).
41. NOGRÁDY, T., VARGHA, L., IVÁNOVICS, G. u. KOCZKA, I.: Acta Chim. Hung. **6**, 287 (1955).
42. SCHEU, H. Ö.: Schweiz. Ztschr. Tbk. **11**, 77 (1954).
43. SCHMIEDEL, A.: Ztsch. Tbk. Ergheft. **101**, 58 (1952).
44. STSCHUKINA u. Mitarb.: Доклады Акад. наук СССР **981** (1952).
45. SIVRIÈRE, E.: Presse Méd. **62**, 720 (1954).
46. SMITH, D. G.: Proc. Soc. Exper. Biol. **64**, 36 (1947).
47. STEENKEN, W. JR., WOLINSKY, E.: Amer. Rev. Tuberc. **59**, 221 (1949).
48. SOLTYS, M. A.: Tubercle bacillus and laboratory methods in tuberculosis. Livingstone, London (1952).
48a. SULA, L.: Publ. Health. Rep. **63**, 867 (1948); Pneumonol. Danub. **12** (1949).
49. SUTER, E.: Schweiz. Ztschr. Tbk. Fortschritte der TBC. Forschung. 3 (1930).
50. STEIBACH, M. M., DONOVICK, A. u. BUCHBERG, A. S.: Amer. Rev. Tuberc. **59**, 624 (1949).
51. STAUB, H.: Schweiz. Med. Wschr. **83**, 531 (1953).
52. SZABÓ, I., SEBŐK, L., CZANIK, P., LASZKÓ, E.: Orv. Hetil., **96**, (1955).
53. TATERKA, W., DEMOLIS, A., URSPRUNG, R.: Experientia, **7**, 28 (1951).
54. TOLDY, L., NOGRÁDY, T., VARGHA, J., IVÁNOVICS, G., KOCZKA, I.: Acta Chim., **4**, 303 (1954).
55. TISON, F.: Revue Tuberc. **17**, 943 (1953).
56. TISON, F.: Ann. Inst. Pasteur, **82**, 241 (1952); **83**, 275 (1952).
57. VARGHA, I., TOLDY, L., LENDVAI, S., KOCZKA, I., IVÁNOVICS, G.: Acta Chim. **4**, 346 (1954).
58. VIETINGHOFF-SCHEEL, O.: Beitr. Klin. Tbk. **108**, 490 (1953).
59. WELSCH, M.: Pharmacodynamie Biochimique. Masson, Paris.
60. WILLISTEN, E. H. u. YOUMANS, G. P.: Amer. Rev. Tuberc. **59**, 336 (1949).
61. WOLLENBERG, O.: Klin. Wschr. **30**, 906 (1952).
61a. WOJAHN, H.: Arzneimittforsch., **2**, 163 (1952).
62. YOUMANS, A. S., YOUMANS, G. P.: J. Bact. **56**, 245 (1948).
63. YOUMANS, G. P., YOUMANS, A. S., OSBORNE, R. S.: Proc. Soc. Exper. Biol. **67**, 426 (1947).
64. YOUMANS, G. P., DOUB, L., YOUMANS, A. S.: The Bacteriostatic Activity of 3500 Organic Compounds for Mycobacterium tuberculosis Var. Horn. Nat. Research Council. Washington D. C., (1953).

Tabelle I

Nr.	Name	Formel	Mol-gewicht	Schmelz-punkt	Bakterien Titerwerke nach 2 Wochen	γ/ml nach 3 Wochen	Toxicität
1577	Streptomycin	$C_{21}H_{40}O_{12}N_7$	582.59		1	1	
1578	Chloramphenicol (Racem)	$C_{11}H_{12}O_5N_2Cl_2$	323.14	225—30°	10	10	
1579	Aureomycin	$C_{22}H_{23}O_9N_2Cl$	494.88	210°	50 nicht gehemmt		
1581	Granegillin	$C_{12}H_{20}O_2N_2$	224.30	101—102°	70	70	

Tabelle II

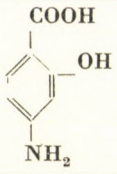
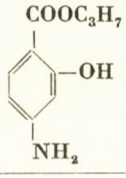
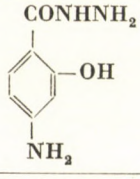
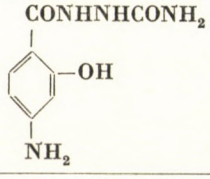
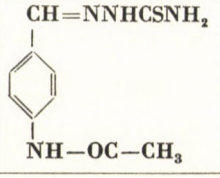
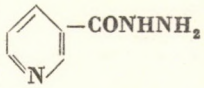
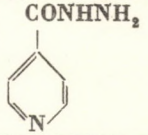
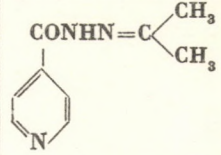
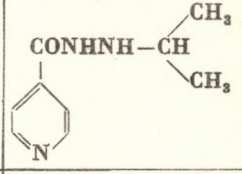
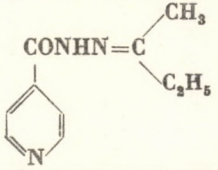
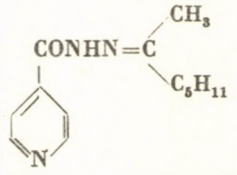
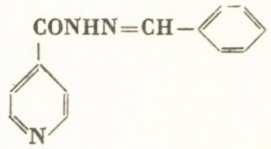
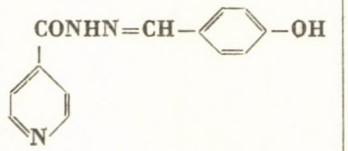
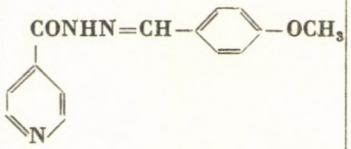
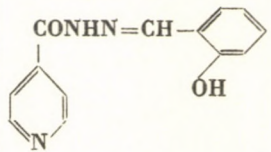
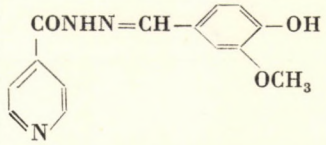
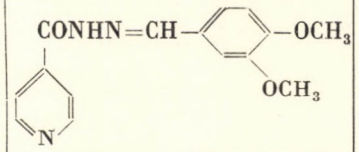
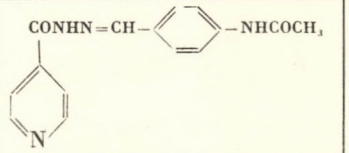
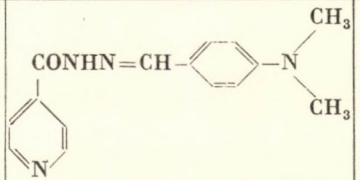
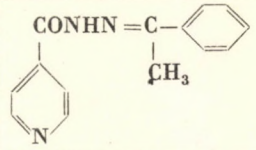
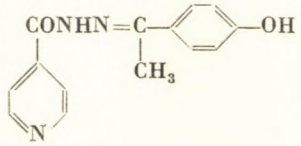
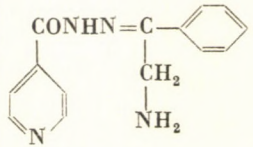
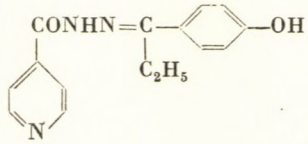
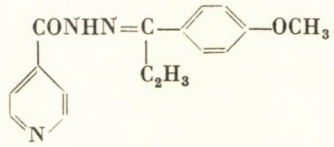
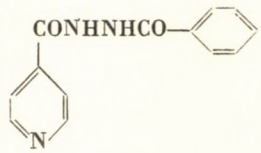
Nr.	Name	Formel	Mol-gewicht	Schmelzpunkt	Bakterien-Titerwerte nach 2 Wochen	γ/ml nach 3 Wochen
1570	PAS		169,13	220° (b)	0,2—0,5	0,2—0,8
1403	PAS-propylester		211,21	103—104°	0,5	0,5
1402	PAS-hydrazid		167,17	200—202°	0,2	0,5
1487	PAS-semicarbazid		210,19	218—20°	5	5
1580	Thiomicid (p-acetylaminobenzaldehyd-thiosemicarbazon)		236,29	224—26°	5	5

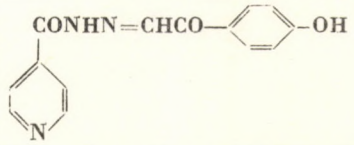
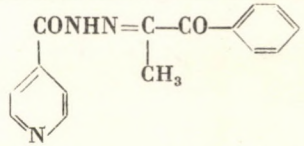
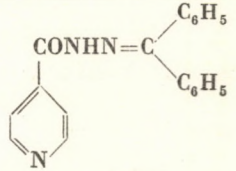
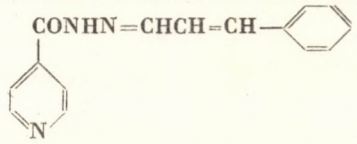
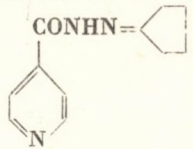
Tabelle III

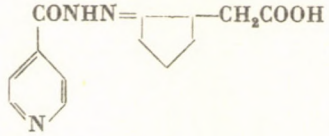
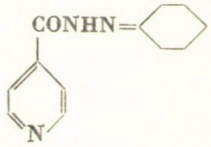
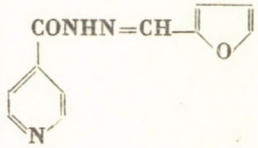
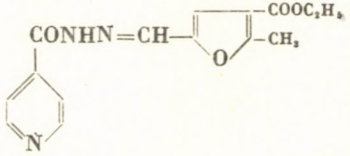
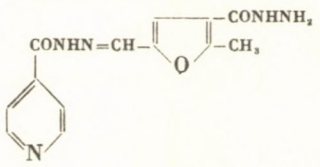
Nr.	Name	Formel	Molgewicht	Schmelzpunkt	Bakterien-Titerwerte nach 2 Wochen	γ/ml nach 3 Wochen	Toxicität für Mäuse in LD_{50} Einheiten pro kg Körpergewicht intraperitoneale Verabreichung
1410	Nikotinsäurehydrazid		137,13	158—59°	50		
1411	Isonicotinsäurehydrazid		137,13	169—70°	0,05	0,05—0,1	
1460	1-Isonicotinyl-2-isopropyliden-hydrazin		177,20	156—57°	0,05	0,05	> 720 mg Ablesung nach 48 St.
1459	1-Isonicotinyl-2-isopropyl-hydrazin		179,22	112—13°	0,5	0,5	
1552	1-Isonicotinyl-2-(äthyl)-äthyli-denhydrazin		191,23	78—80°	0,075	0,1	

1466	1-Isonicotinyl-2-(amyl)-äthyliden-hydrazin		233,31	81—84°	0,1	0,2	
1446	1-Isonicotinyl-2-benzyliden-hydrazin		207,26	196—200°	0,5	0,5	350 mg Ablesung nach 48 St.
1448	1-Isonicotinyl-2-(p-oxybenzyliden)-hydrazin		241,24	294—95°	5	5	750 mg Ablesung nach 48 St.
1453	1-Isonicotinyl-2-anisyliden-hydrazin		255,27	138—40°	0,05	0,1	
1462	1-Isonicotinyl-2-salicylal-hydrazin		241,24	241—43°	0,2	0,2—0,5	425 mg Ablesung nach 48 St.

Nr.	Name	Formel	Molgewicht	Schmelzpunkt	Bakterien-Titerwerte nach 2 Wochen	γ/ml nach 3 Wochen	Toxicität für Mäuse in LD_{50} Einheiten pro kg Körpergewicht, intraperitoneale Verabreichung
1452	1-Isonicotinyl-2-(3′-methoxy-4′-oxybenzyliden)-hydrazin		271,27	220—22°	0,1	0,2	240 mg Ablesung nach 48 St.
1447	1-Isonicotinyl-2-(3′, 4′-methoxy-benzyliden)-hydrazin		285,94	190—91°	0,5	0,5	
1458	1-Isonicotinyl-2-(p-acetamino-benzyliden)-hydrazin		282,94	283—85°	2	2	
1444	1-Isonicotinyl-2-dimethylamino-benzyliden-hydrazin		268,31	204—206°	0,5	0,5	
1443	1-Isonicotinyl-2(α-methyl-benzyliden)-hydrazin		239,26	171—73°	0,5	0,5	

1449	1-Isonicotinyl-2-(α-methyl-p-oxybenzyliden)-hydrazin		255,29	280—82°	0,2	0,2	
1455	1-Isonicotinyl-2-(α-aminomethyl-benzyliden)-hydrazin		254,28	151—54°	5	5	
1454	1-Isonicotinyl-2-(α-äthyl-oxy-benzyliden)-hydrazin		269,29	242—44°	0,05	0,05—0,1	Über 1500 mg Ablesung nach 48 St. (Eine Suspension injiziert)
1445	1-Isonicotinyl-2-(α-äthyl-anisyliden)-hydrazin		283,23	183—85°	0,5	1	
1470	1-Isonicotinyl-2-benzoyl-hydrazin		241,24	226—28°	20	20	

Nr.	Name	Formel	Mol-gewicht	Schmelz-punkt	Bakterien-Titerwerte nach 2 Wochen	γ/ml nach 3 Wochen	Toxicität für Mäuse in LD_{50} Einheiten pro kg Körpergewicht, intraperitoneale Verabreichung
1450	1-Isonicotinyl-2-(p-oxybenzoyl-methyliden)-hydrazin		268,24	264—65°	0,2	0,2	720 mg Ablesung nach 48 St.
1468	1-Isonicotinyl-2-(benzoyl-äthyli-den)-hydrazin		267,28	188—90°	0,2	0,2	
1464	1-Isonicotinyl-2-(α-phenyl-benzyliden)-hydrazin		301,33	124—25°	0,2	0,5	
1463	1-Isonicotinyl-2-zinnamyliden-hydrazin		251,28	199—200°	0,2	0,2	140 mg Ablesung nach 48 St.
1511	1-Isonicotinyl-2-cyclopentanyli-den-hydrazin		203,24	201—203°	0,5	0,5	

1534	1-Isonicotinyl-2-(α-carboxy-methyl-cyclopentanyliden)-hydrazin		289,33	237—39°	0,05–0,075	0,075	3120 mg Ablesung nach 72 St. (Eine Lösung von pH 8—9 injiziert)
1457	1-Isonicotinyl-2-cyclohexanyliden-hydrazin		217,26	168—69°	0,05	0,05	
1456	1-Isonicotinyl-2-furfuryliden-hydrazin		251,21	240—42°	0,05	0,05	
1524	1-Isonicotinyl-2-(4′-carbäthoxy-5′-methylfurfuryliden)-hydrazin		301,29	189—90°	0,2	0,2	1500 mg Ablesung nach 72 St.
1523	1-Isonicotinyl-2-(4′-hydrazinoformyl-5′-methyl-furfuryliden)-hydrazin		287,27	105—110°	0,2	0,2	

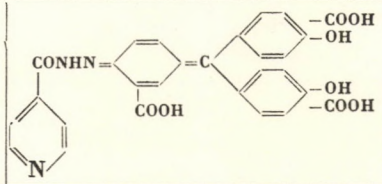
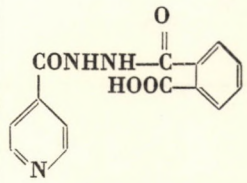
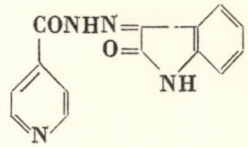
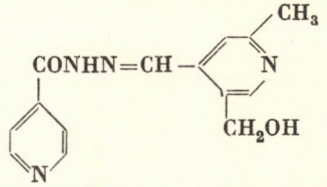
Nr.	Name	Formel	Molgewicht	Schmelzpunkt	Bakterien-Titerwerte nach 2 Wochen	γ/ml nach 3 Wochen	Toxicität für Mäuse in LD_{50} Einheiten pro kg Körpergewicht, Intraperitoneale Verabreichung
1549	1-Isonicotinyl-2-[4″, 4″-dioxy-fuchson-tricarbonsäure(3′, 3″, 3‴)]-hydrazin		445,38	218—20°	0,2	1	
1483	1-Isonicotinyl-2-phthaloyl-hydrazin		267,24	224—26°	0,2	0,2	
1465	1-Isonicotinyl-2-isatinal-hydrazin		266,25	287—89°	50	50	
1469	1-Isonicotinyl-2-pyridoxal-hydrazin		270,28	242—44°	5	5	

Tabelle IV

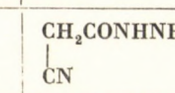
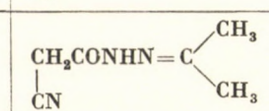
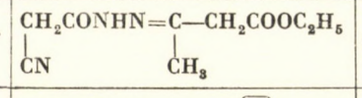
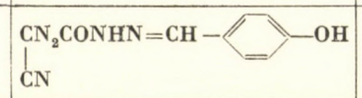
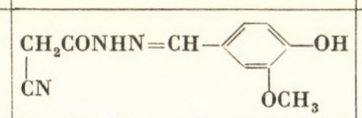
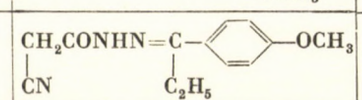
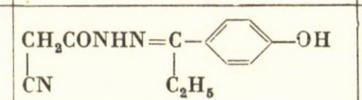
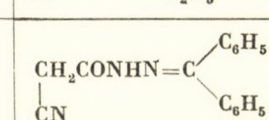
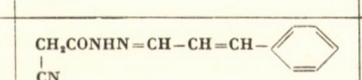
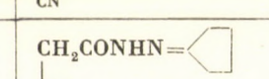
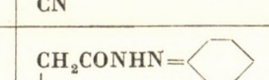
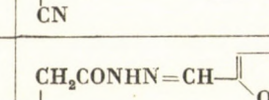
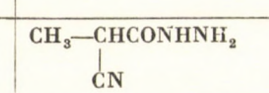
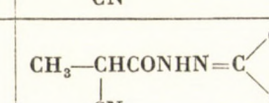
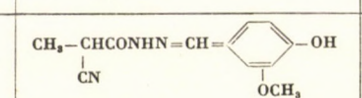
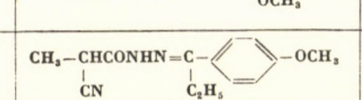
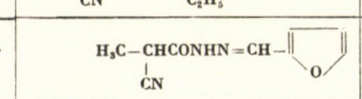
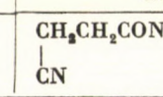
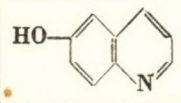
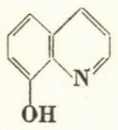
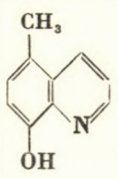
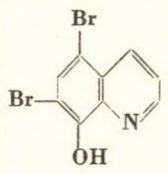
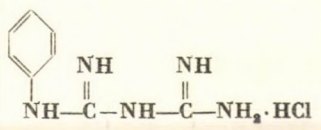
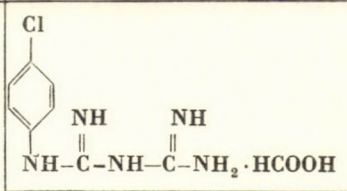
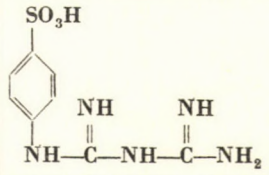
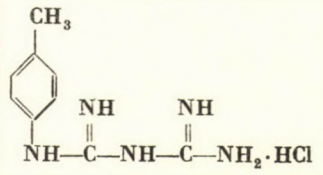
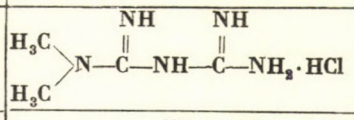
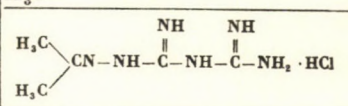
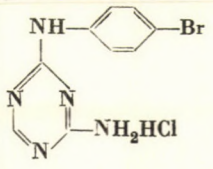
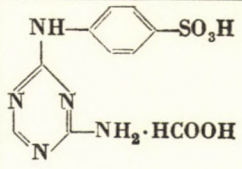
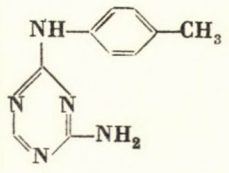
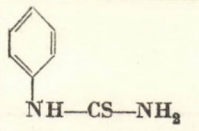
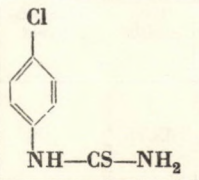
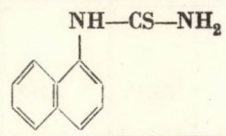
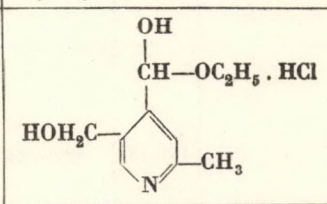
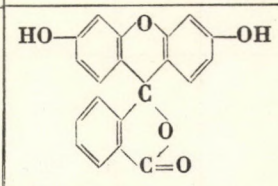
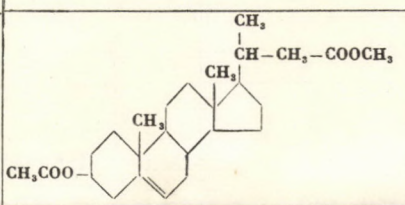
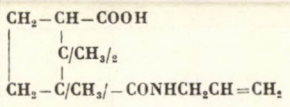
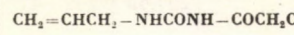
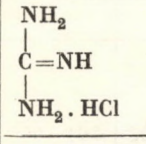
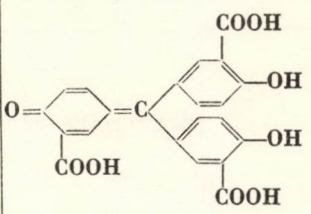
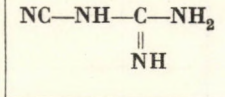
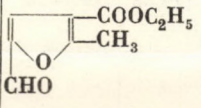
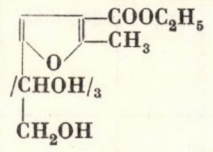
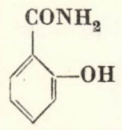
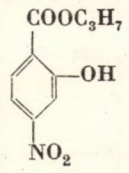
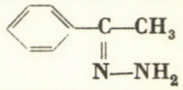
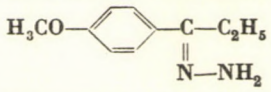
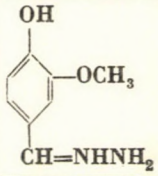
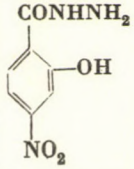
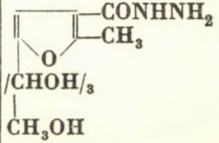
Nr.	Name	Formel	Mol-gewicht	Schmelz-punkt	Bakterien-Titerwerte nach 2 Wochen	γ/ml nach 3 Wochen	Toxicität. LD_{50} pro kg Maus. Intraperitoneale Verabreichug
1488	Cyanessigsäure-hydrazid		99,09	114°	20	20	
1495	1-Cyanacetyl-2-isopropyliden-hydrazin		139,16	147—49°	50	50	
1506	1-Cyanacetyl-2- [(α-äthylacetyl)-äthyliden]-hydrazin		211,22	93—95°	50 nicht gehemmt		
1490	1-Cyanacetyl-2(p-oxybenzyli-den)-hydrazin		203,20	212—13°	30	50	>750 mg Ablesung nach 72 St.
1497	1-Cyanacetyl-2-(3′-methoxy-4′-oxybenzyliden)-hydrazin		233,22	200—201°	50 nicht gehemmt		
1499	1-Cyanacetyl-2-(α-äthyl-anisyliden)-hydrazin		245,27	161—63°	50 nicht gehemmt		
1553	1-Cyanacetyl-2-(α-äthyl-p-oxybenzyliden)-hydrazin		231,25	184—85°	100	100	
1496	1-Cyanacetyl-2-(α-phenyl-benzyliden)-hydrazin		263,29	104—106°	10	20	
1498	1-Cyanacetyl-2-zinnamyliden-hydrazin		231,23	174—75°	10	30	210 mg Ablesung nach 72 St.
1507	1-Cyanacetyl-2-cyclopentanyli-den-hydrazin		165,19	156—58°	20	50	550 mg Ablesung nach 72 St.
1491	1-Cyanacetyl-2-cyclohexanyli-den-hydrazin		179,22	123—24°	50	50	680 mg Ablesung nach 72 St.
1492	1-Cyanacetyl-2-furfuryliden-hydrazin		177,16	204—205°	50	50	680 mg Ablesung nach 72 St.
1510	α-Cyanpropionsäurehydrazid		113,12	175°	50		
1494	1-(α-Cyanpropionyl)-2-iso-propyliden-hydrazin		153,18	234—36°	50 nicht gehemmt		
1508	1-(α-Cyanpropionyl)-2-(3′-methyoxy-4′-oxybenzyliden)-hydrazin		247,25	262—63°	50 nicht gehemmt		
1509	1-(α-Cyanpropionyl)-2-(α-äthyl-anisyliden)-hydrazin		259,30	199—201°	50 nicht gehemmt		
1493	1-(α-Cyanpropionyl)-2-furfuryli-den-hydrazin		191,19	212—13°	50 nicht gehemmt		
1512	β-Cyanpropionsäurehydrazid		113,12	163—65°	50 nicht gehemmt		

Tabelle V

Nr.	Name	Formel	Mol-gewicht	Schmelz-punkt	Bakterien-Titerwerte nach 2 Wochen	γ/ml nach 3 Wochen	
1571	6-Oxychinolin		145,15	193°	1	1	
1572	8-Oxychinolin		145,15	76°	1	1	
1573	5-Methyl-8-oxychinolin		159,18	122—24°	0,5	0,5	
1574	5,7-Dibrom-8-oxychinolin		302,97	196°	0,8	0,8	
1478	Phenylbiguanid HCl		231,67	258—60°	50	50	
1415	p-Chlorphenylbiguanid. HCOOH		257,68	245—47°	20	20	
1477	p-Sulfophenylbiguanid		257,27	294—95°	50, nicht gehemmt		
1476	p-Toluylbiguanid. HCl		227,70	130—32°	50, nicht gehemmt		
1541	1,1-Dimethylbiguanid. HCl		165.63	218—20°	100, nicht gehemmt		
1542	Isopropylbiguanid. HCl		179,66	197—98°	100, nicht gehemmt		
1479	2-Amino-4-p-bromanilino-1,3,5-triazin. HCl		302,57	242—43°	50, nicht gehemmt		
1416	2-Amino-4-p-sulfanilino-1,3,5-triazin. HCOOH		267,27	257—58°	20	20	
1480	2-Amino-4-p-toluidino-1,3,5-triazin		201,23	224—26°	50, nicht gehemmt		

1547	Phenylthioharnstoff		152,22	153—54°	100, nicht gehemmt		
1546	p-Chlorphenylthioharnstoff		186,67	167—68°	5	5	
1481	α-Naphtylthioharnstoff		203,28	193—94°	10	20	
1400	Pyridoxal-äthylacetal. HCl		233,69	103—105°	50 (±)	50 (±)	
1404	Fluorescein		330,30	312—15° (b)	50, nicht gehemmt		
1405	Δ^5,3-Acetoxy-cholensäure-methylester		415,57	163—65°	50, nicht gehemmt		
1418	Camphorsäureallylamid		239,31	142—45°	50, nicht gehemmt		
1419	Allyl-succinyl-harnstoff		200,19	139—41°	50, nicht gehemmt		
1540	Guanidin. HCl		95,52	96—98°	100, nicht gehemmt		
1544	Vuzin-bihydrochloricum	$C_{27}H_{40}O_2N_2 \cdot 2HCl \cdot 2H_2O$	533,29	161—63°	10	10	
1550	Aurintricarbonsäure		322,11	128—30°	100, nicht gehemmt		
1520	Dicyandiamid		84,08	205°	100, nicht gehemmt		
1535	2-Methyl-5-formyl-furan-3-carbonsäureäthylester		182,17	57—58°	50	50 (+)	
1537	2-Methyl-5-tetraoxybutyl-furan-3-carbonsäureäthylester		274,26	146—47°	50, nicht gehemmt		
1406	Salicylsäureamid		137,13	137—38°	100, nicht gehemmt		
1426	p-Nitrosalicylsäurepropylester		225,20	30—32°	100, nicht gehemmt		
1575	Vitamin B_2	$C_{17}H_{20}O_6N_4$	376,36	274—82° (b)	50, nicht gehemmt		
1576	Vitamin B_{12}	$C_{63}H_{96}O_{14}N_{14}PCo$	1357,38		50, nicht gehemmt		

Nr.	Name	Formel	Mol-gewicht	Schmelz-punkt	Bakterien-Titerwerte nach 2 Wochen	γ/ml nach 3 Wochen	
1471	Hydrazinhydrat	$NH_2—NH_2 . H_2O$	50,06	Fp. <—40°	100, nicht gehemmt		
1530	Laevulinsäure-hydrazon	$CH_3—C(=N—NH_2)—(CH_2)_2—COOH$	130,15	76—79°	50, nicht gehemmt		
1467	Phenylhydrazin, HCl		144,60	240—41°	100, nicht gehemmt		
1526	Acetophenon-hydrazon		134,18	118—20°	50, nicht gehemmt		
1527	p-Methoxypropiophenon-hydrazon		178,23	125—27°	50, nicht gehemmt		
1482	Vanillin-hydrazon		166,18	110—12°	50, nicht gehemmt		
1425	p-Nitrosalicylsäure-hydrazid		197,15	178—79°	100, nicht gehemmt		
1525	2-Methyl-5-tetraoxybutyl-furan-3-carbonsäure-hydrazid		260,24	193—96°	50, nicht gehemmt		

BACTERIAL BLIGHT OF THE UMBELS OF CARROT IN HUNGARY

By

J. LEHOCZKY and Z. KLEMENT

College of Horticulture and Viticulture, Budapest, Research Institute for Plant Protection, Budapest

(Received May 3, 1956)

In the summer of 1955, in June and July, the seed fields of carrot *(Daucus carota L. var. sativa DC)* were affected by a disease up to then not known to occur in Hungary. The affected area was in Békés county. The umbels grew tilted to one side and single umbellets died off, showing a brown colouration at the time the umbel was in full bloom. The pedicles of the coloured umbellets turned yellow, translucent, with succin-coloured translucent droplets (exudate) appearing on their surface. All these symptoms suggested bacterial infection.

The severest sequelae were recorded in the fields used for producing seeds, because the massive loss of umbels resulted in a considerable loss in yield. The infection of the foliage led to a general weakening of the roots, which was manifested in a reduction of yield.

On the basis of the symptoms, of artificial infection carried out in glasshouse, and of the physiological reactions of the microorganism isolated from infected plants, the pathogen could be identified as *Xanthomonas carotae* (Kendrick) Dowson.

The pathogen has so far been known to occur only in certain states of the USA, in Canada and Australia [2]. Its occurrence has not been reported from Europe. According to the evidence hitherto obtained, in this country the disease has spread extensively in seed fields.

Symptoms

a) Leaf, petiole and stem : On the leaves scattered, translucent spots of necrosis, small, round, sometimes oblong or irregular in shape and brown in colour, appear. The infection shows a tendency to affect first the tips of segments (Fig. 1). This feature has been pointed out by J. B. KENDRICK [4] who suggested that at those sites the prolonged accumulation of moisture creates favourable conditions for infection. The infection starting there often spreads to the whole segment, though it occurs that the nervure in the axis of the segment prevents the spread of the process to the other side and this will mostly result in a sickle-shaped curling of the segment toward the infected side.

The brown necrosed spots are often surrounded by a yellow halo. This may be absent when the pathologic process develops under optimum conditions ; on the other hand, it may be rather extensive under glasshouse conditions (at 18 to 20 °C). This is in agreement with the observation made by J. B. KENDRICK [4].



Fig. 1. Infected segments of leaf, showing the characteristic yellow halo

The symptoms developing on the leaves are in many a case closely similar to those produced by the *Alternaria porri* (Ell.) Neerg. f. sp. dauci (Kühn) Neerg.

On the petiole and peduncle the disease is characterised by the appearance of thin and long brown stripes. On the latter, light yellow translucent drops of



Fig. 2. Total destruction of umbel



Fig. 3. Characteristic appearance of infected umbels. On the left the outlines of a normal umbel are visible

exudate are visible, which often run down the stem and dry there to form hard structures.

b) Umbel. The disease produces the most conspicuous symptoms on the umbel. The symptoms accompanying infection and the sequelae of infection vary according to the stage of development of the umbel at the time it is affected, and according to the measure of infection.

When infected in the initial phase of development, the umbel becomes completely destroyed (Fig. 2). Infection of the base of the umbels near to full



Fig. 4. Destruction of single umbellets

bloom often results in a destruction of the collaring overleaves and in an interference with the arrangement of umbellets in one plane (Fig. 3). The destruction of single umbellets within umbels in full bloom is common (Fig. 4). In such cases the pedicle of the browned umbellet turns yellowish-green in colour and becomes translucent and glass-like. In these areas, too, ample exudate droplets, clear and light yellow in colour, often occur. The droplets running down the pedicles of single umbellets collect at the base of the umbel, run down a short distance on the main stem and harden there. If infection occurs after blooming, the pathologic process may interfere with the development of the mericarpium, which may thus become valueless, easily friable by hand.

The infection is often restricted to one third or one half of the umbel, resulting in a curling of the umbel toward the affected side.

c) Root. P. A. ARK and M. W. GARDNER [1] reported that the disease may involve also the root, and in case of early infection the site of the latter may be marked by the presence of intractions or by spots of oblong-oval shape, brown in colour, visible on the surface of the root. On the spots greyish bacterial exudate appears.

Our attempts at finding such an infected root on July 28, 1955, in a more intensively affected plants in the neighbourhood of Gyula, Békés county, ended in failure.

Isolation and identification of the pathogenic agent

The pathogen was isolated from affected umbels and leaves collected on July 28, 1955, on potato-dextrose and broth-agar plates. The small, corn-yellow,

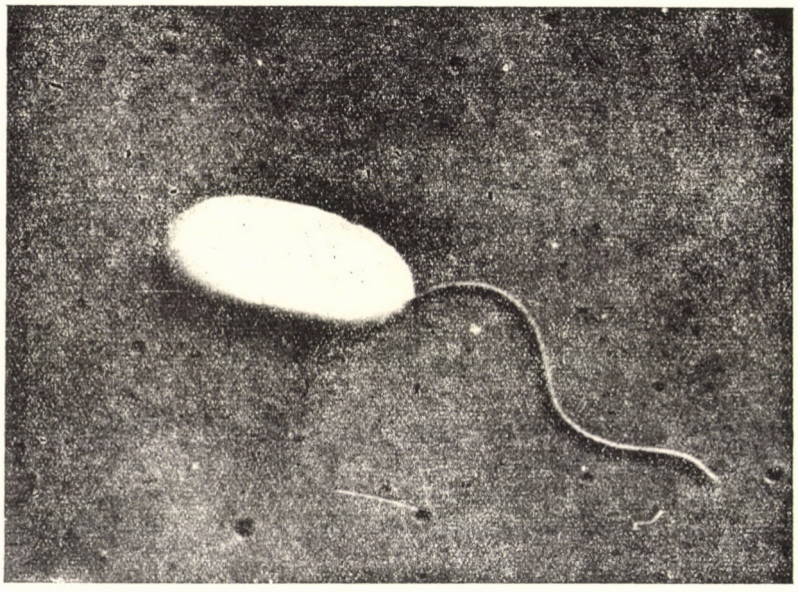


Fig. 5. Electronmicroscopic appearance of *Xanthomonas carotae* (Kendrick) Dowson. Magnification, $\times 22.000$. (Microphotograph taken at the Electronmicroscope Laboratory, Hungarian Academy of Sciences)

regularly circular, slightly protruding, shiny, smooth colonies became visible on the third day of growth in broth-agar.

The broth became slightly clouded and the bacteria aggregated to form a yellow precipitate. Similar changes occurred in liquefied gelatin, too.

As determined by microscopic study, the bacilli measured on average $1.59 \times 0.68\mu$ in size and occurred one by one or in pairs, with one or two flagellae at the end (Fig. 5). They were Gram negative.

At 20 °C the organisms liquefied gelatin at a relatively slow rate, in a cup-shaped form at 9 days.

The milk with litmus became peptonized in 5 days, without coagulation. No acid production could be observed.

In the synthetic nitrate liquid medium nitrite was not demonstrable even after 5 days.

Indole and H_2S production did not occur.

In the broth-agar plate containing soluble starch the starch was not hydrolysed in 5 days.

The breakdown of different carbohydrates was studied in a synthetic and in a peptone-water basal medium, in the presence of the ANDRADE indicator. In the peptone-water basal medium a slight acid production was observed with galactose. Unlike it was reported by KENDRICK, no acid production took place in saccharose. In the synthetic basal medium acid production was usually slight and slow, observable after 4 days from glucose, galactose, arabinose, lactose, raffinose, saccharose, mannose, mannitol and glycerol. No acid was produced from maltose, dextrin, dulcite or asparagine during the one month of observation.

Except for the gelatin medium, all incubations were carried out at 28 °C.

In its morphological, physiological and biochemical characters, as well as in the symptoms produced, the pathogen was completely identical with *Xanthomonas (Pseudomonas) carotae* (Kendrick) Dowson, described by KENDRICK.

Artificial infection experiments

In January, 1956, seedlings of three-leaved age were artificially infected, by spraying the leaves with organisms from a 3-days old culture suspended in sterile water. Plants of the same species and age were sprayed with sterile water, as controls. After incubation for 48 hours, the experimental plants were transferred to the glasshouse. At 14 days the infected plants clearly showed the symptoms of the disease, notably the yellowish-brown spots at the tips of segments, with the yellow halo around them.

During incubation the temperature in the glasshouse varied from 13 to 21 °C, with an average of 15° to 19 °C. Relative humidity varied from 60 to 90 per cent.

Infection with pathogen recovered from infected leaves again yielded positive results.

Summary

The bacterium *Xanthomonas carotae* (Kendrick) Dowson was isolated for the first time in Europe. It has spread rather widely in Hungary. It produces most damage by destroying the umbels, though the leaves, too, are severely affected by it. So far we have been unable to detect roots showing the changes described by ARK and GARDNER.

The pathogenic agent is identical with *Xanthomonas (Pseudomonas) carotae* (Kendrick) Dowson in its morphological, physiological and biochemical characters, as well as in the symptoms produced by it.

Successful artificial infections have been carried out under glasshouse conditions with bacteria isolated from affected plants.

LITERATURE

1. ARK, P. A., GARDNER, M. W.: Phytopath., **34**, 416 (1944).
2. DOWSON, W. J.: Zbl. Bakt. **100**, 177 (1939).
3. ELLIOTT, CH.: Manual of bacterial plant pathogens. Chronica Botanica Co. Waltham, 2nd ed., 1951.
4. KENDRICK, J. B.: J. Agr. Res. **49**, 493 (1934).

DIE LEPTOSPIREN-INFEKTION DER FELDNAGETIERE IN EINEM GEBIET VON WESTUNGARN

Von

M. Füzi, Z. Alföldy, J. Kiszel und I. Raditz

Mikrobiologisches Institut der Medizinischen Universität, Budapest

(Eingegangen am 21. Mai 1956)

In der Umgebung der in Nordwestungarn gelegenen Ortschaft Kapuvár war im Sommer 1951 eine Leptospirose-Epidemie aufgetreten [1]. Es erkrankten in den umliegenden Dörfern wohnende junge landwirtschaftliche Arbeiter, die in der der Erkrankung vorangegangenen Zeitperiode vor allem in dem als Hanság bezeichneten früheren Sumpfgebiet gearbeitet hatten. Eine Vermehrung der Krankheitsfälle trat zur Zeit des Mähens und der Heuernte ein. Bei den ätiologischen Untersuchungen konnte aus dem Blut eines Kranken ein *L. grippotyphosa*-Stamm gezüchtet werden, und auch die durch serologische Methode bestätigten Fälle erwiesen sich sämtlich als Grippo-typhosa-Infektionen. Das Bild der Epidemie und der Typ des Krankheitserregers deuteten darauf hin, dass die Infektionsquelle in erster Linie unter den im Hanság lebenden Feldnagetieren gesucht werden müsse. Um diese Annahme bestätigen zu können, nahmen wir im Sommer des folgenden Jahres (1952) in der Umgebung der Ortschaft Kapuvár Nagetieruntersuchungen vor, und zwar vor allem im Hanság. Über diese wollen wir hier berichten.

Die geographischen und klimatischen Verhältnisse des Untersuchungsgebiets

Die Hanság genannte Gegend liegt im Nordwesten des Landes und war früher Sumpfgebiet. Die Versumpfung war dadurch entstanden, dass die in dem tiefer als das Niveau der Umgebung gelegenen Becken vorhandenen kleineren Flüsse und Bäche nicht zu dem nördlich befindlichen hoch gelegenen Flussbett der Donau gelangen konnten, so dass sie sich auf dem Gebiet des Beckens in zahlreiche Zweige teilten und in kleineren Seen endeten. Insbesondere die im Frühjahr von den Alpen kommenden gewaltigen Wassermengen, aber auch grössere Regenfälle liessen die an sich kleinen Flüsse und Bäche beträchtlich anschwellen, wodurch riesige Überschwemmungsgebiete entstanden. Häufig stand die ganze Gegend vom Fertő bis zur Donau unter Wasser. Das Sumpfgebiet wurde seit Mitte des vorigen Jahrhunderts durch Flussregulierungs- und Entwässerungsarbeiten allmählich saniert. und heute befinden sich auf diesem

Gebiet bereits Wiesen und Äcker bzw. im mittleren Teil ein kleines Waldgebiet (Éger-Wald). Das Gebiet ist aber auch heute noch sehr wasserreich. Die kleinen Flüsse und Bäche sind durch zahlreiche Kanäle verbunden, der Grundwasserstand ist hoch, und nach grossen Regenfällen steht häufig ein Teil der tiefer gelegenen Wiesen und Felder vorübergehend unter Wasser. Die Gegend ist überall flach, stellenweise erheben sich 2—3 m hohe diluviale Kieskegel aus dem Becken ; diese waren die ehemaligen sog. Moorinseln (Hosszúdomb, Dőridomb usw.). Der Boden ist an vielen Stellen torfartig, die Oberflächenschicht besteht im allgemeinen aus mit Löss gemischtem Flugsand, der meist sauer reagiert. — Die

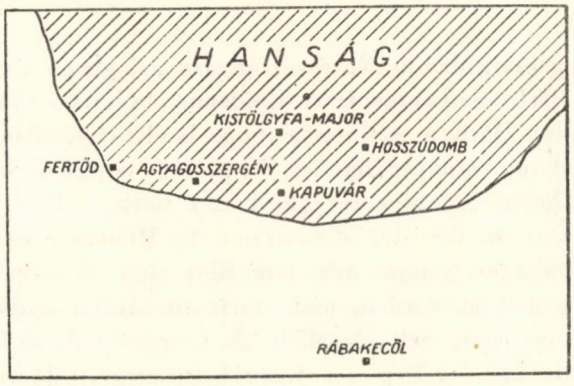


Abb. 1. Das Gebiet der Nagetieruntersuchungen

klimatischen Verhältnisse sind durch die Dominanz des ozeanischen Klimas gekennzeichnet. Die Gegend zählt zu den niederschlagreichsten Gebieten des Landes. Die Anzahl der Regentage beträgt pro Jahr durchschnittlich 115, die durchschnittliche Niederschlagmenge 610 mm. Die meisten Niederschläge entfallen auf die Sommermonate, vor allem Juni und Juli. Die jährliche Durchschnittstemperatur beträgt 11,1° C (Maximum 35° C, Minimum minus 15° C). Infolge der häufigen Sommerregen und des hohen Grundwasserstandes kommt Trockenheit im Hanság selbst in sehr warmen Sommern nicht vor.

Zu Vergleichszwecken nahmen wir auch südlich vom Hanság Untersuchungen vor. Dieses Gebiet ist ebenfalls flach und hat landwirtschaftlichen Charakter, auch die klimatischen Verhältnisse sind ähnlich, doch ist es bei weitem nicht so wasserreich wie das tiefer gelegene Becken des Hanság.

Abb. 1 veranschaulicht das Untersuchungsgebiet. Die Untersuchungsörter der Nagetiere wurden so gewählt, dass wir vom ganzen Hanság ein Bild gewinnen konnten. Erst erfolgte die Einsammlung in den Feldern der Gemeinde Agyagosszergény, sodann in der Nähe der von dieser nordöstlich gelegenen Meierei Kistölgyfa. Hiernach kam die am östlichen Rand des Hanság gelegene Hosszúdomb-Gegend an die Reihe und sodann die im westlichen Teil

befindliche Gemeinde Fertőd. Gleichzeitig mit diesen Untersuchungen geschah auch die Einsammlung in den Feldern der als Kontrollgebiet gewählten Gemeinde Rábakecöl, die sich bereits ausserhalb des Hanságer Beckens befindet. Bei der Einsammlung der Feldnagetiere suchten wir wahllos die verschiedensten Nagetiere einzufangen, um ein Untersuchungsmaterial zu gewinnen, das ein den natürlichen Verhältnissen annähernd entsprechendes Bild bietet. Die erste Phase der Materialaufarbeitung erfolgte in dem zum Untersuchungsgebiet nahe gelegenen Krankenhaus zu Kapuvár, damit die Durchsicht der zahlreichen Tiere in möglichst kurzer Zeit vor sich gehen könne und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei den einzelnen Gruppen durch die möglicherweise vorhandenen saisonbedingten Variationen der Verseuchung nicht beeinflusst wird. Zur Durchführung der Untersuchungen wählten wir die Sommerzeit, in der das sog. »Feldfieber« vorzukommen pflegt.

Untersuchungsmethode

Bei der Untersuchung der Tiere suchten wir die Leptospirenentleerung nachzuweisen, die lokalen Leptospirentypen zu isolieren und zu bestimmen, weshalb wir folgendermassen vorgingen: Die lebend gefangenen Feldnagetiere liessen wir in Äthernarkose entbluten und sezierten sie dann steril. Aus der Niere wurde in Korthof-Nährboden überimpft und sofern die Harnblase Harn enthielt, dieser im Dunkelfeldmikroskop auf Leptospiren untersucht. Einige Tiere verendeten während der Einlieferung; auch diese wurden untersucht, wobei wir darauf achteten, dass die Aufarbeitung innerhalb weniger Stunden nach dem Eingehen erfolge. Die beimpften Nährböden wurden 2 Monate lang bei 30 °C im Thermostaten gehalten und wöchentlich mikroskopisch nachgeprüft. Die Typenbestimmung der gezüchteten Stämme wurde unter Anwendung der Agglutinationslysistechnik mit Kaninchen Immunsera durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen benutzten wir folgende Standard-Leptospirentypen bzw. die entsprechenden Immunsera: *L. grippo-typhosa*, *L. sejrő*, *L. pomona* (P_3), *L. ictero-haemorrhagiae*, *L. canicola*. In einigen Fällen war die Typusbestimmung nicht durchführbar, weil sich einzelne frisch isolierte Stämme sehr schwach vermehrten und rasch zugrunde gingen.

Untersuchungsergebnisse

Vom 16. VII.—16. VIII. 1952 wurden insgesamt 467 Feldnagetiere untersucht. Das Material bestand grösstenteils aus Feldmäusen *(Microtus arvalis)* doch befanden sich darunter auch einige Waldmäuse *(Apodemus sylvaticus)* und Hamster *(Cricetus cricetus)*. Anzahl und Arten der an den bezeichneten Stellen eingesammelten Tiere sind auf Tabelle I wiedergegeben. Am ersten Untersuchungsort, in Agyagosszergény, notierten wir lediglich die *Art* der untersuchten Tiere, später beachteten wir aber auch ihr Alter (Entwicklungszustand) und Geschlecht, um die Resultate der verschiedenen Gebiete miteinander vergleichen zu können. Aus Literaturangaben geht nämlich hervor, dass die Leptospirenentleerung bei den Nagetieren im höheren Alter häufiger vorkommt, so dass die Altersverteilung der untersuchten Tiergruppen die Resultate beeinflussen kann [2, 3, 4, 5, 6]. Deshalb teilten wir die Tiere in 3 Grössengruppen

Tabelle I

Anzahl und Art der an den einzelnen Untersuchungsörtern eingesammelten Nagetiere

Untersuchungsort	Zeitpunkt der Einsammlung	Anzahl der			
		Feldmäuse	Waldmäuse	Hamster	Insgesamt
Agyagosszergény	16. VII.				
	22. VII.	98	—	—	98
Meierei Kistölgyfa	30. VII.				
	16. VIII.	104	2	1	107
Hosszúdomb	6. VIII.				
	11. VIII.	145	2	6	153
Rábakecöl	6. VIII.				
	10. VIII.	71	—	—	71
Fertőd	12. VIII.	34	4	—	38
Insgesamt		452	8	7	467

ein : kleine, mittelgrosse und grosse. Bei den Feld- und Waldmäusen erfolgte die Gruppierung folgendermassen : Zur ersten Gruppe rechneten wir die Tiere mit Gewicht bis zu 6 g, in die zweite Gruppe die 6—15 g schweren, in die dritte Gruppe die über 15 g schweren Tiere. Bei den Hamstern legten wir folgende Gewichtsgruppen fest : kleine bis zu 100 g, mittelgrosse zwischen 100—200 g, grosse über 200 g. Hinsichtlich der Differenzen zwischen den Geschlechtern fanden wir keine Angaben, um aber auch etwaige, sich daraus ergebende Abweichungen auszuschliessen, berücksichtigten wir bei den weiteren Untersuchungen auch das Geschlecht. Im folgenden teilen wir die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsörter ausführlich mit.

Agyagosszergény. Zum Schauplatz der ersten orientierenden Untersuchung hatten wir deshalb diese Gemeinde gewählt, weil im vorangegangenen Sommer die meisten menschlichen Erkrankungen in dieser Gegend vorgekommen waren. Die hier eingesammelten 98 Feldnagetiere waren sämtlich Feldmäuse. Die Leptospirenzüchtung war in 10 Fällen von Erfolg begleitet, die mikroskopische Untersuchung des Harns jedoch bei allen Tieren negativ. Bei 8 der 10 gezüchteten Stämme gelang auch die Typusbestimmung ; es handelte sich durchwegs um Grippo-typhosa-Stämme.

Meierei Kistölgyfa. Wir sammelten insgesamt 107 Nagetiere, und zwar 104 Feldmäuse, 2 Waldmäuse und 1 Hamster. Die Züchtungsmethode ergab in 12 Fällen positives Resultat. Bei 1 Tier war die mikroskopische Harnuntersuchung positiv, sonst stets negativ. Von 10 Stämmen vermochten wir den Typ zu bestimmen, der sich in allen Fällen als Grippo-typhosa erwies. Diese Gruppe wurde auch bereits nach den Entwicklungszustand und Geschlecht der Tiere aufgearbeitet

(Tabelle II). Wie ersichtlich, kamen die positiven Fälle unter den grossen und mittelgrossen Tieren vor, ferner waren mehr Männchen Leptospirenträger. Trotz der wenigen Waldmäuse konnten aus einem Tier Leptospiren gezüchtet werden, die sich bei der Typusbestimmung ebenfalls als Grippo-typhosa erwiesen.

Tabelle II

Leptospirenverseuchung der Feldnagetiere in der Gegend der Meierei Kistölgyfa

Nagetierart	Männchen			Weibchen			Insgesamt
	klein	mittelgross	gross	klein	mittelgross	gross	
Feldmäuse	0/5	2/21	5/25	0/3	0/15	4/35	11/104
Waldmäuse	0/1	—	—	—	1/1	—	1/2
Hamster	0/1	—	—	—	—	—	0/1

Hosszúdomb. In diesem Gebiet wurden 153 Nagetiere untersucht: 145 Feldmäuse, 2 Waldmäuse und 6 Hamster. Aus den Feldmäusen isolierten wir 4 Stämme (sämtlich Grippo-typhosa); bei einem der Tiere war auch der Harn positiv. Auch aus einem Hamster vermochten wir *L. grippo-typhosa* zu züchten und bei diesem Tier auch im Harn nachzuweisen. Die Ergebnisse nach Geschlecht und Grösse sind auf Tabelle III zusammengefasst. Die kleinen Tiere, die hier den grössten Teil des Materials ausmachten, ergaben sämtlich negativen Befund, und auch hier waren positive Ergebnisse unter den Männchen häufiger.

Tabelle III

Leptospirenverseuchung der Feldnagetiere in der Umgebung von Hosszúdomb

Nagetierart	Männchen			Weibchen			Insgesamt
	klein	mittelgross	gross	klein	mittelgross	gross	
Feldmäuse	0/30	0/19	3/26	0/21	1/24	0/25	4/145
Waldmäuse	0/1	—	—	—	—	0/1	0/2
Hamster	1/3	—	—	0/3	—	—	0/6

Rábakecöl. In dem ausserhalb des Hanság gelegenen Kontrollgebiet wurden 71 Feldnagetiere — sämtlich Feldmäuse — eingesammelt. Die Züchtung fiel in 2 Fällen positiv aus, die mikroskopische Harnuntersuchung stets negativ. Einer der gezüchteten Stämme wurde als *L. grippo-typhosa* festgestellt, während der andere (mit L. Rk-16 bezeichnete) eine hiervon abweichende Antigenstruktur aufwies. Später verglichen wir den Stamm L. Rk-16 mit sämtlichen uns zur Verfügung stehenden Standardstämmen. Bei den Kreuzagglutinationsuntersuchungen zeigte er lediglich mit *L. sejrő* wesentlichere Verwandtschaft. Dieser Stamm gehört also aller Wahrscheinlichkeit nach zu der von PETERSEN [7] auf-

gestellten Hebdomadis-Gruppe, doch bedarf es noch weiterer Untersuchungen, um festzustellen, ob es sich um einen der einschlägigen bekannten Typen oder um einen neuen handelt. Aus der Aufteilung des Materials nach Grösse und Alter der Tiere geht hervor, dass die Leptospirenträger auch hier unter den entwickelten Tieren anzutreffen sind, wenn auch in dieser Gruppe beide positive Tiere Weibchen waren (Tabelle IV).

Tabelle IV

Leptospirenverseuchung der Feldnagetiere in der Umgebung von Rábakecöl

Nagetierart	Männchen			Weibchen			Insgesamt
	klein	mittelgross	gross	klein	mittelgross	gross	
Feldmäuse	0/15	0/17	0/7	0/4	0/18	2/10	2/71

Fertőd. Im westlichen Hansággebiet wurden 38 Nagetiere untersucht: 34 Feldmäuse und 4 Waldmäuse. Der Harn der Tiere war in allen Fällen negativ, die aus der Niere vorgenommene Züchtung ergab jedoch in 5 Fällen ein positives Resultat. Sämtliche 5 Leptospirenträger waren Feldmäuse und — wie aus Tabelle V ersichtlich — alle grosse Tiere. Sämtliche gezüchtete Stämme waren *L. grippo-typhosa.*

Tabelle V

Leptospirenverseuchung der Feldnagetiere in der Umgebung von Fertőd

Nagetierart	Männchen			Weibchen			Insgesamt
	klein	mittelgross	gross	klein	mittelgross	gross	
Feldmäuse	0/3	0/7	3/8	0/4	0/3	2/9	5/34
Waldmäuse	0/1	0/2	—	—	0/1	—	0/4

Besprechung

Wie die Untersuchungsergebnisse zeigen, war die Leptospirenverseuchung unter den Feldnagetieren des Hanság im Sommer 1952 überall nachweisbar, aber auch in der südlich gelegenen, als Kontrollgebiet gewählten Gegend anzutreffen.

Unter den Feldnagetieren der Gegend kommt die grösste Bedeutung den Feldmäusen zu, die auf allen Gebieten am meisten verbreitet sind. Auch die überwiegende Mehrheit unseres Materials, nämlich 452 der eingesammelten 467 Nagetiere, waren Feldmäuse. Bevor wir die Verseuchungsverhältnisse auswerten, wollen wir untersuchen, inwieweit die Untersuchungsbefunde bei den einzelnen Gruppen durch Alter und Geschlecht der Tiere beeinflusst werden.

Die Bedeutung des Alters geht aus den Tabellen II, III, IV und V deutlich hervor. Wie aus diesen ersichtlich, erwiesen sich die jungen Feldmäuse an allen Untersuchungsstellen übereinstimmend als negativ, unter den mittelmässig entwickelten Tieren kamen Leptospirenträger bereits vor, während die meisten leptospirenentleerenden Tiere unter den älteren, entwickelteren Exemplaren zu finden waren. Die altersmässige Zusammensetzung der Untersuchungsgruppe vermag also das Endergebnis beträchtlich zu beeinflussen, weil im Falle des Übergewichts älterer Tiere ein höherer Verseuchungsgrad, bei der Aufarbeitung vieler junger Tiere jedoch weniger positive Fälle zu erwarten sind. Es genügt also nicht die Mitteilung des globalen Verseuchungswertes, vielmehr ist zu seiner Bewertung und insbesondere zu Vergleichszwecken unbedingt auch die Angabe der Altersverteilung innerhalb der Gruppen erforderlich. In bezug auf den Leptospirenbefall der Geschlechter ist keine Gesetzmässigkeit zu beobachten. An zwei Örtern waren Männchen und Weibchen annähernd gleich häufig mit Leptospiren besiedelt, anderswo wurden einmal von Männchen, ein andermal von Weibchen häufiger Leptospiren entleert. Zur Bewertung der Verseuchungsangaben ist also die Trennung der Geschlechter nicht erforderlich.

Tabelle VI

Häufigkeit der Leptospirenentleerung unter Feldmäusen

Untersuchungsort	Anzahl der leptospirenentleerenden Feldmäuse			Insgesamt	%
	klein	mittelgross	gross		
Agyagosszergény	—	—	—	10/98	10,2
Meierei Kistölgyfa	0/8	2/36	9/60	11/104	10,5
Hosszúdomb	0/51	1/43	3/51	4/145	2,7
Rábakecöl	0/19	0/35	2/17	2/71	2,8
Fertőd	0/7	0/10	5/17	5/34	14,7

Hiernach wollen wir die Verseuchung der Microtus-Population der verschiedenen Gebiete untersuchen. Die Häufigkeit des Vorkommens der Leptospirenträger ist auf Tabelle VI veranschaulicht. Auf Grund vorstehender Ausführungen sind in der Tabelle nicht nur die Gesamtzahlen der Leptospirenträger der einzelnen Gruppen angegeben, sondern zur Ergänzung auch die Zusammensetzung nach dem Entwicklungszustand und die darauf beruhenden Ergebnisse, mit Ausnahme der ersten Untersuchungsstelle (Agyagosszergény), wo eine derartige Trennung noch nicht erfolgte. Was die Anzahl der Leptospirenentleerer unter den einzelnen Gruppen betrifft, war der höchste Wert am westlichen Rand des Hanság (Fertőd) zu beobachten ; von Westen nach Osten zu waren unter den Feldmäusen immer weniger Leptospirenträger anzutreffen. Im Kontrollgebiet herrschten ungefähr die gleichen Verhältnisse wie am östlichen Rand des Hanság.

Dieses Charakteristikum ändert sich auch dann nicht, wenn wir die Verteilung nach dem Entwicklungszustand berücksichtigen, da in der Zusammensetzung der einzelnen Gruppen keine extremen Abweichungen vorliegen. Doch sind die beobachteten Unterschiede bei dieser Betrachtungsweise weniger gross, d. h. diese kommen teilweise infolge der abweichenden Zusammensetzung des Entwicklungsgrades der lokalen Nagetierpopulationen zustande. Die entwicklungsbedingte Aufteilung der Feldmäuse ist nämlich in der in der Gegend von Hosszúdomb gesammelten Gruppe am gleichmässigsten, während in den hohe Verseuchung aufweisenden Gruppen aus Fertőd und Kistölgyfa die grossen Tiere dominieren und kleine Tiere, insbesondere im letztgenannten Ort, in erheblich geringerer Zahl untersucht wurden. Wäre die Anzahl der kleinen Tiere in diesen beiden eben erwähnten Ortschaften mit der Zahl der grossen Tiere identisch und der negative Befund bei den kleinen Feldmäusen unverändert, würde der in Fertőd festgestellte 14,7%ige Wert auf 11,0% sinken, der der Gruppe aus Kistölgyfa aber von 10,5% auf 7,0%. Natürlich ist es nicht sicher, ob nicht die Anzahl der Leptospirenentleerer etwas zunimmt, wenn mehr junge Tiere zur Untersuchung gelangen, doch ist auch unter Berücksichtigung dieser Möglichkeit erkennbar, dass die zwischen den verschiedenen Örtern beobachtete Abweichung auch in diesem Fall geringer wäre. Die Leptospirenentleerung war also im westlichen Teil deshalb häufiger, weil sich einerseits unter den grossen und mittelgrossen Tieren mehr Leptospirenträger befanden und anderseits an den Fangörtern mehr entwickelte Tiere vorkamen. — Überblickt man die Verseuchungswerte der verschieden entwickelten Tiere, muss man annehmen, dass als Ausgangspunkte der Epizootien unter den Feldmäusen und gleichzeitig als Aufrechterhalter der Infektion in erster Linie die älteren Tiere in Frage kommen. Von diesen wird mit zunehmendem Alter mit ständig grösserer Wahrscheinlichkeit auch die jüngere Generation infiziert. (Naturgemäss bedeutet dies nicht, dass sich die Feldmäuse ausschliesslich gegenseitig infizieren, da die Infektion auch von anderen Tierarten ausgehen kann.) Diese Annahme findet eine Stütze auch in den Beobachtungen, dass zur Zeit der Epizootien nicht nur unter den grossen und mittelgrossen, sondern auch unter den kleinen Tieren zahlreiche Infizierte vorkommen, während in epidemiefreien Zeiten lediglich bei einem geringen Prozentsatz der älteren Feldmäuse Leptospirenentleerung nachgewiesen werden kann. Es ist auch heute noch ungeklärt, auf Grund welcher Faktoren die gelegentliche umfangreiche Ausbreitung der Verseuchung zustandekommt. Einzelne Literaturangaben betonen die Bedeutung des Feuchtigkeitsgehalts und günstigen pH-Wertes des Bodens, andere als die Ausbreitung der Infektion begünstigende Faktoren die Bedeutung der klimatischen Verhältnisse (Niederschlagreichtum, hohe Mitteltemperatur) [5, 6, 8, 9, 10]. Sicherlich spielen diese Umstände in der Entwicklung der Leptospirosenherde unter den Nagetieren eine Rolle, wahrscheinlich in der Weise, dass die Infektionskette in einer für die Ausbreitung der Infektion günstigen Umgebung schwerer unterbrochen wird und daher 1—2 Lepto-

spirenträger in der Population stets vorhanden sind. Hierauf deutet auch die Beobachtung, dass sich die endemischen Gegenden der Nagetier-Leptospirose überall auf derartige Gebiete lokalisieren. Die periodischen Schwankungen des Infektionsgrades und insbesondere die Entwicklung der Epizootien lassen sich jedoch allein auf dieser Grundlage nicht erklären. Auch in unserem Untersuchungsgebiet finden wir keine Umwelt- oder Klimafaktoren, welche die lokalen Abweichungen in der Verseuchung begründen könnten. Wahrscheinlich dürfte der Umstand, in erster Linie auf lokale Veränderungen in den heute noch wenig bekannten Lebensumständen und in der Lebensweise der Tiere zurückzuführen sein, welche durch die erwähnte günstige Umgebung lediglich gefördert werden.

Wir isolierten aus Feldmäusen 32 Stämme und konnten die Typbestimmung in 27 Fällen vornehmen. Die Stämme erwiesen sich als recht einheitlich, da sich mit Ausnahme eines (L. Rk-16) sämtliche als Grippo-typhosa erwiesen. Die Antigenstruktur von L. Rk-16 zeigte lediglich mit *L. sejrő* wesentliche Verwandtschaft, so dass der Stamm wahrscheinlich zur sog. »Hebdomadis-Gruppe« gehört. Unter den Feldmäusen war also der Grippo-typhosa-Typus allgemein verbreitet, was den europäischen Erfahrungen entspricht und auf Grund des lokalen Vorkommens der menschlichen Grippo-typhosa-Infektionen vorauszusetzen war. Neu ist jedoch das Vorkommen des Stammes L. Rk-16, ins besondere in den Feldmäusen. Von den Typen der »Hebdomadis-Gruppe« wurden nämlich bisher in Europa nur *L. sejrő* und *L. saxkoebing* nachgewiesen und als charakteristische Wirtstiere unter den Nagetieren *Mus musculus spicilegus*, *Apodemus sylvaticus* und *Apodemus flavicollis* erwähnt ; dagegen wurden sie in Microtus noch nirgends festgestellt [11, 12]. In Japan jedoch, wo das erste Mitglied der Gruppe — L. hebdomadis — beschrieben wurde, bildet den Nagetierwirt dieses Typus eine dortige Feldmausart, *Microtus montebelloi* [13]. Obwohl wir den Stamm L. Rk-16 in unserem Material aus einer Feldmaus isolierten, erwecken die Untersuchungsergebnisse nicht den Eindruck, als ob das Hauptwirtstier dieses Stammes die Feldmaus wäre. Hiergegen spricht die Tatsache, dass der Stamm unter sämtlichen Untersuchungsstellen nur in einem Gebiet gezüchtet werden konnte, und auch hier nur bei einer einzigen Gelegenheit, im Gegensatz zur diffusen Verbreitung der *L. grippo-typhosa*. Wahrscheinlich dürfte sich die Feldmaus mit diesem Stamm nur zufällig infiziert haben, wenn auch die Frage ungeklärt ist, unter welchen Umständen dies geschah. Jedenfalls ist als interessant zu bezeichnen, dass dieser Typus unter den Nagetieren der Gegend keine Verbreitung gefunden hat, obwohl nach der Infektion Leptospirenentleerung erfolgte. Es bedarf daher weiterer Untersuchungen, um zu klären, ob L. Rk-16 mit irgendeinem Typus der Hebdomadis-Gruppe identisch ist oder ob es sich um einen neuen Typus dieser Gruppe handelt. Gleichzeitig wäre auch die Ökologie des Stammes klarzustellen. Die Frage ist auch von praktischer Bedeutung, denn obwohl hier der erste Fall vorliegt, dass ein derartiger Leptospirastamm in

Ungarn isoliert werden konnte und die Züchtung aus einem Feldnagetier erfolgte, beobachteten wir bei der Identifizierung menschlicher Leptospirosen in anderen Gegenden des Landes schon vorher Erkrankungen, wo die serologische Untersuchung das Vorkommen eines zur Hebdomadisgruppe gehörenden Leptospiratypus ergab [14].

Im Verhältnis zur Häufigkeit des Vorkommens der Feldmäuse ist die Bedeutung der anderen Nagetierarten als gering zu bezeichnen, und auch die Anzahl der aufgearbeiteten Tiere genügt nicht, um auf Grund des vorliegenden Untersuchungsmaterials allgemeine Schlussfolgerungen in Bezug auf ihre Verseuchungsverhältnisse zu ziehen. Doch scheinen uns einige Beobachtungen erwähnenswert. In einem Fall isolierten wir Leptospiren aus einer Waldmaus, und zwar einen Grippo-typhosa-Stamm. Die Apodemus-Arten sind in Europa vor allem als Wirtstiere der *L. sejrő* und *L. saxkoebing* bekannt, doch hatte bereits RIMPAU [5] darauf hingewiesen, dass in dem in der Nähe der mit *L. grippotyphosa* infizierten Feldmäuse lebenden *Apodemus sylvaticus* Grippo-typhosa-Antikörper nachgewiesen werden können. Es scheint demnach, dass sich Apodemus in derartiger Umgebung auch mit diesem Typus infizieren können, ja wie aus unseren gegenwärtigen Wahrnehmungen hervorgeht, können sie auch als Verbreiter des Stammes auftreten, da die Infektion in ihnen nicht endet, sondern Leptospirenentleerung auftritt. — Auch die Aufarbeitung der Hamster war in einem Fall erfolgreich, da wir einen Grippo-typhosa-Stamm zu isolieren vermochten. Die Leptospirenverseuchung des wild lebenden Hamsters *(Cricetus cricetus)* wurde zuerst von POPP [6] beobachtet, doch erwähnte er nicht den Typus des Stammes. Nachdem in dem seinerseits untersuchten Gebiet eine menschliche Grippo-typhosa-Epidemie aufgetreten war und auch in den Feldmäusen dieser Typus angetroffen wurde, dürfte wahrscheinlich auch in den Hamstern dieser anwesend gewesen sein. Es ist keineswegs als überraschend zu bezeichnen, dass sich die Hamster unter natürlichen Verhältnissen in erster Linie mit dem Grippo-typhosa-Typus infizieren, da sie auf den Äckern mit den Feldmäusen zusammen hausen und nach einzelnen Beobachtungen auch an der Vernichtung der Feldmäuse teilnehmen. Da auf die Infektion auch hier Entleerung folgt, muss man in der Infektionskette des Grippo-typhosa-Typs auch mit der Verbreitung durch die Hamster rechnen.

Das Leptospirose-Situationsbild des untersuchten Gebietes lässt sich dahingehend zusammenfassen, dass bei den Feldnagetieren der Gegend umfangreiche Verseuchung mit *L. grippo-typhosa* vorliegt und dies offenbar nicht nur für das Hanság, sondern auch für seine Umgebung charakteristisch ist. Die wichtigsten Wirtstiere der *L. grippo-typhosa* sind die überall in grosser Zahl anwesenden Feldmäuse, doch nehmen an der Aufrechterhaltung der Infektionskette auch Apodemus und Hamster teil. Neben den *L. grippo-typhosa* kommt jedoch auch ein dem Sejrő ähnlicher Leptospirentyp — L. Rk-16 — vor, den die Feldmäuse scheinbar nur gelegentlich beherbergen, während sein Hauptreservoir

andere Tiere bilden. Im Hanság und in den umliegenden Gebieten muss daher überall mit der Infektionsmöglichkeit gerechnet werden, da die leptospirenentleerenden Nagetiere für die auf den Feldern arbeitenden Menschen oder sich dort aufhaltenden empfänglichen Tiere eine Gefahr bedeuten. Je nach dem lokalen Zahlenverhältnis, der Verseuchung und der Altersverteilung der Nagetierarten ist jedoch der Expositionsgrad jeweils verschieden. Auf die im Untersuchungsjahr bestehenden Expositionsverhältnisse vermögen wir Schlüsse zu ziehen, wenn wir den Leptospirenbefall der an den einzelnen Untersuchungsstellen eingesammelten

Tabelle VII

Häufigkeit der Leptospirenentleerung unter den Feldnagetieren der einzelnen Gebiete

Untersuchungsort	Anzahl der Nagetiere	Anzahl der Leptospiren-entleerer	%
Agyagosszergény	98	10	10,2
Meierei Kistölgyfa	107	12	11,2
Hosszúdomb	153	5	3,2
Rábakecöl	71	2	2,8
Fertőd	38	5	13.1

Nagetiergruppen in Betracht ziehen (Tabelle VII). Wie daraus ersichtlich, bestand die Möglichkeit zur Infektion von den Feldnagetieren vor allem im westlichen und mittleren Teil des Hanság. Die im Jahre 1952 beobachteten menschlichen Grippo-typhosa-Infektionen stammten, obwohl sie nur sporadisch vorkamen, fast ausschliesslich von diesem Gebiet. Interessanterweise waren auch die zahlreichen menschlichen Erkrankungen im Sommer des vorangegangenen Jahres gleichfalls in der Mehrzahl in dieser Gegend aufgetreten. Da sich die Feldarbeiten ausführende Bevölkerung auf das ganze Gebiet des Hanság ziemlich gleichmässig verteilt, lässt sich die Lokalisierung der Fälle nur damit erklären, dass menschliche Erkrankungen in erster Linie an jenen Stellen häufiger auftreten, wo auch die Tiere mit Leptospiren am stärksten befallen sind. Infolgedessen ist anzunehmen, dass die Verseuchung der Nagetiere im Sommer 1951 in diesem Gebiet noch grösser war. Das Hanság und seine Umgebung zählt also aller Wahrscheinlichkeit nach zu den endemischen Grippo-typhosa-Gebieten, wo im westlichen und mittleren Teil 1951 eine grössere Epizootie entlangzog, sich aber die Verseuchungsverhältnisse im Untersuchungsjahr (1952) bereits auf die für ruhende endemische Gegenden charakteristischen Werte von einigen % zurückzuentwickeln begannen.

Zusammenfassung

Im Sommer 1951 wurde in der in Nordwestungarn gelegenen Gegend des Hanság eine Häufung menschlicher Grippo-typhosa-Infektionen beobachtet, weshalb im Sommer des folgenden Jahres zur Klärung der Infektionsquellen unter den Feldnagetieren ausgedehnte Untersuchungen vorgenommen wurden. An 5 verschiedenen Punkten der Gegend wurden die Nagetiere wahllos eingesammelt und zur Feststellung der Häufigkeit des Vorkommens von Leptospirenträgern aus den Nieren Züchtungen durchgeführt und der Harn mit dem Dunkelfeldmikro-

skop untersucht. Insgesamt wurden 467 Feldnagetiere untersucht und zwar 452 Feldmäuse *(Microtus arvalis)*, 8 Waldmäuse (Apodemus sylvaticus) und 7 Hamster *(Cricetus cricetus)*.

Die Verseuchung mit *L. grippo-typhosa* war in der Gegend überall nachweisbar. Grippotyphosa-Träger kamen vor allem unter den Feldmäusen, aber auch unter den Waldmäusen und Hamstern vor. Neben *L. grippo-typhosa* konnte jedoch auch ein in die Hebdomadis-Gruppe einzureihender Leptospira-Stamm (L. Rk—16) isoliert werden, der über eine ähnliche Antigenstruktur verfügt wie *L. sejrő*. Der Stamm L. Rk—16 wurde aus der Niere einer Feldmaus isoliert, jedoch nur in einem Fall, woraus gefolgert werden kann, dass das Hauptwirtstier dieses Typus in der Gegend unter anderen Tieren gesucht werden muss.

Die Häufigkeit des Leptospirenbefalls der Feldmäuse variierte an den einzelnen Stellen zwischen 2,7% und 14,7%. Die höchsten Werte wurden im westlichen und zentralen Teil des Hanság festgestellt. Leptospirenentleerung war in erster Linie unter den voll entwickelten älteren Tieren zu beobachten und kam bei mittelgrossen Tieren in erheblich geringerem Umfang, bei jungen Tieren jedoch überhaupt nicht vor.

Im Hinblick auf die ausgedehnte Verseuchung der Nagetiere mit *L. grippo-typhosa* und das wiederholte Auftreten menschlicher Erkrankungen ist die Gegend als grippo-typhosa-endemisches Gebiet zu betrachten.

LITERATUR

1. Veres, J., Alföldy, Z. u. Füzi, M.: Orv. Hetil. **32**, 921 (1952).
2. Uhlenhuth, P.: Hdb. der pathologischen Mikroorganismen III. Aufl. 7. (1930).
3. Elton, C., Ford, E. u. Baker, J.: Proc. Zool. Soc. London, 657 (1931).
4. Schüffner, W. u. Bohlander, H.: Zbl. Bakt. I. Orig. **149**, 359 (1943).
5. Rimpau, W.: Zbl. Bakt. I. Orig. **150**, 136 (1943).
6. Popp, L.: Ztschr. Hyg. **131**, 575 (1950).
7. Borg-Petersen, C.: Acta path. microbiol. Scand. **21**, 165 (1944).
8. Mino, P.: Klin. Wschr. 337 (1942).
9. Kathe, I.: Zbl. Bakt. I. Orig. **152**, 479 (1947/48).
10. Rimpau, W.: Klin. Wschr. 342 (1942).
11. Gsell, O.: Leptospirosen, Huber, Bern, 1952.
12. Rimpau, W.: Die Leptospirose, Urban u. Schwarzenberg, München 1950.
13. Ido, Y., Ito, H. u. Wani, H.: J. exp. Med. **29**, 199 (1919).
14. Fehér, J., Füzi, M., Alföldy, Z., Kiszel, J.: Orv. Hetil. **24**, 665 (1954).

UNTERSUCHUNG DER LEPTOSPIREN-INFEKTION VON NAGETIEREN IN EINER GEMEINDE VON SÜDOSTUNGARN

Von

J. KISZEL, Z. ALFÖLDY und M. FÜZI

Mikrobiologisches Institut der Medizinischen Universität, Budapest

(Eingegangen am 21. Mai 1956)

Im Sommer 1952 trat unter Dreschern in der in Südostungarn gelegenen Gemeinde Újkígyós explosiv eine Leptospirose-Epidemie auf [1]. Im Hinblick darauf, dass wir von der Epidemie und der möglicherweise leptospirabedingten Ätiologie erst erfuhren, als die Durchführung des Züchtungsverfahrens kaum mehr Aussicht auf Erfolg bot, erfolgte die ätiologische Untersuchung mit serologischen Methoden. Bei den serologischen Proben ergaben die Blutsera der Kranken mit zwei Leptospirentypen (*L. sejrő*, *L. pomona* P_3 Prag) positive Reaktion mit beträchtlichem Titer, so dass der Typ des Krankheitserregers nicht mit Sicherheit festgestellt werden konnte. Zur Klärung der Ätiologie erschien als gangbarster Weg, den für die Epidemie verantwortlichen Leptospirenstamm bei den an Ort und Stelle anzutreffenden Nagetieren und grösseren Haustieren zu suchen. Auch deshalb schien es zweckmässig, die Untersuchungen in dieser Richtung durchzuführen, weil wir auf diese Weise nicht nur über den Typ des Krankheitserregers, sondern auch über die wahrscheinliche Quelle der Infektion Angaben gewinnen konnten. Zuerst suchten wir uns über die Leptospira-Infektion der Nagetiere zu orientieren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wollen wir im folgenden mitteilen.

Die Untersuchung der Nagetiere erfolgte in zwei Abschnitten, im Sommer 1952 und 1953. Insgesamt untersuchten wir 402 Tiere, die teils aus dem Gebiet der Gemeinde Újkígyós, teils von den Wiesen und Getreidefeldern der Umgebung stammten. Die Gemeinde Újkígyós liegt im südöstlichen Teil der ungarischen Tiefebene im Komitat Békés, in etwa 15 km Entfernung von Békéscsaba. Es ist eine charackteristische Siedlung der Tiefebene, deren Gebiet und Umgebung vollkommen flach und von Getreidefeldern und Weiden umgeben ist. Waldgebiete sind in der Umgebung nicht vorhanden. In der Nähe befindet sich weder ein Fluss noch ein Teich. Die Gegend ist ebenso wie die anderen Teile der Tiefebene arm an Niederschlag.

Wir waren bemüht, von sämtlichen vorkommenden Nagetierarten möglichst viele Exemplare zu sammeln, um uns auch über die Infektion der verschiedenen Nagetiergattungen zu unterrichten. Die Aufteilung der im Laufe der beiden Jahre untersuchten Nagetiere nach Arten geht aus Tabelle I hervor.

Tabelle I

Die Arten der in Ujkígyós gesammelten Nagetiere

Name	Anzahl der Tiere		
	1952	1953	Insgesamt
Feldmäuse *(Microtus arvalis)*	55	188	243
Ährenmäuse *(Mus spicilegus)*	54	1	55
Waldmäuse *(Apodemus sylvaticus)*	7	30	37
Ziesel *(Citellus citellus)*	15	50	65
Spitzmaus *(Crocidura leucodon)*	—	1	1
Ratte *(Rattus rattus)*	—	1	1
Insgesamt	131	271	402

Untersuchungsmethoden und Ergebnisse

Die Untersuchung der Nagetiere geschah an Ort und Stelle nach folgender Methode. Die lebend gesammelten Tiere wurden in Äthernarkose getötet und seziert. Aus den beiden Nieren überimpften wir in Korthof-Nährboden, während das Blut der Tiere für die Agglutinationsuntersuchung in sterile Röhren gefüllt wurde. Im ersten Jahr impften wir auch von der Leber in Korthof-Nährboden und untersuchten den Harn bei der Sektion im Dunkelfeld. Die beimpften Nährböden wurden im Thermostaten bei 30 °C 2 Monate lang aufbewahrt und alle 5 Tage mikroskopisch nachgeprüft.

Im ersten Untersuchungsabschnitt, vom 23. VIII. bis 15. IX. 1952, wurden 131 Nagetiere gesammelt. In der Umgebung der auf dem Gebiet der Gemeinde vorhandenen Wohnhäuser kam die Ährenmaus *(Mus spicilegus)* am häufigsten vor, während auf den Äckern der Umgebung hauptsächlich Feldmäuse *(Microtus arvalis)* und in geringerer Zahl Waldmäuse *(Apodemus Sylvaticus)* gesammelt werden konnten. Die Ziesel *(Citellus citellus)* fingen wir auf den Weiden neben dem Dorf. Das Zahlenverhältnis der zur Untersuchung gekommenen Nagetierarten gibt naturgemäss nicht ganz das tatsächliche Verhältnis ihres Vorkommens wieder, da sich einzelne leichter, andere schwerer fangen liessen. Es sei bemerkt, dass in diesem Sommer sehr wenige Mäuse vorkamen, weshalb die Einsammlung ziemlich langsam vor sich ging. Die Tiere waren grösstenteils entwickelte, grosse Exemplare, und in sämtlichen Gruppen waren die Weibchen in der Mehrzahl, ausgenommen die Feldmäuse, wo die Anzahl der Männchen grösser war. Sämtliche Tiere kamen lebend zur Aufarbeitung.

In den Organen und im Harn der 131 Tiere konnten mit den oben beschriebenen Verfahren Leptospiren in keinem einzigen Fall nachgewiesen werden. Ebenso ergab die serologische Untersuchung des Blutserums von 103 Nagetieren mit den *L. grippo-typhosa-*, *L. pomona-* (P_3 Prag) und *L. sejrő*-Stämmen ein negatives Resultat. Das negative Ergebnis des ersten Jahres führten wir vor allem darauf zurück, dass nur verhältnismässig wenige Tiere der verschiedenen Nagetierarten zur Aufarbeitung gelangten, weshalb wir die Untersuchung der Tiere im Sommer des folgenden Jahres fortsetzten. Vom 13. Juli bis 20. Juli 1953 wurden 271 Nagetiere gesammelt. In diesem Sommer vermochten wir mehr Tiere zu fangen, was sich teils mit dem vermehrten Vorkommen der Nagetiere, teils aber mit dem Umstand erklären lässt, dass die Einsammlung zur Erntezeit erfolgte, wo die Tiere leichter einzufangen sind. Wie aus Tabelle I ersichtlich, kamen unter den im Laufe des zweiten Jahres gesammelten Nagetieren 6 ver-

schiedene Arten vor, und zwar war die Anzahl der Feldmäuse am grössten, wesentlich geringer die Zahl der Ziesel und Waldmäuse, während wir nur je 1 Ährenmaus, Spitzmaus und Ratte zu fangen vermochten. Die Einsammlung erfolgte in diesem Jahr in erster Linie an der Peripherie der Ortschaft, weshalb von der in der Umgebung der Wohnhäuser heimischen Erdmaus lediglich ein einziges Exemplar untersucht wurde. Feld- und Waldmäuse wurden auf zwei verschiedenen Gebieten gesammelt. Die Waldmäuse stammten von den etwa 3 km südlich der Gemeinde gelegenen Äckern, wo ebenso wie im vorangegangenen Jahr nur wenige Feldmäuse anzutreffen waren. Feldmäuse hingegen fanden sich in grösserer Zahl auf den etwa 6 km nördlich von der Gemeinde liegenden Getreidefeldern. Die Ziesel fingen wir auf denselben Weiden wie im vorigen Jahr. Die Tatsache, dass wir nur je eine Spitzmaus und Ratte fangen konnten, dürfte darauf zurückzuführen sein, dass diese in der Gegend nur in verhältnismässig geringer Zahl vorkommen. In diesem Jahr waren kleine und mittelgrosse Tiere in der Mehrzahl, Männchen und Weibchen kamen ungefähr gleichmässig häufig vor. Unter den Mäuseweibchen waren viele trächtig. Die meisten Tiere kamen lebend zur Aufarbeitung, einige Feldmäuse und die Ratte jedoch erst 4 Stunden nach dem Verenden, was aber sowohl laut Literaturangaben als auch nach unseren früheren Beobachtungen den Erfolg der Züchtung aus der Niere nicht beeinflusst.

Die Untersuchung der zahlreichen Nagetiere war in diesem Jahr bereits von Erfolg begleitet, da wir aus der Niere von 2 Tieren Leptospiren zu isolieren vermochten. Die beiden Stämme wurden nach der Isolierungsstelle — Újkígyós — und nach der Nr. der Tiere mit L. Uk-2 und L. Uk-4 bezeichnet. Beide Stämme wurden aus Waldmäusen *(Apodemus sylvaticus)* gezüchtet, der eine aus einem grossen Männchen, der andere aus einem grossen graviden Weibchen. Beide Nieren der Tiere enthielten Leptospiren, da jede der parallel vorgenommenen Abimpfungen positives Resultat ergab.

Zwecks Untersuchung der Meerschweinchenpathogenität der beiden gezüchteten Stämme impften wir junge Tiere aus virulenten 5tägigen Kulturen intraperitoneal. Sämtliche geimpften Meerschweinchen blieben am Leben; ausser mehrtägigem Fieber beobachteten wir bei ihnen keine pathologischen Symptome.

Im weiteren nahmen wir orientierende Untersuchungen zur Feststellung der Antigenstruktur der beiden Stämme vor. Zu diesem Zweck führten wir mit in Kaninchen erzeugten Immunsera die gekreuzte Agglutinationslysisprobe unter folgenden Leptospirenstämmen durch: L. Uk—2, L. Uk—4, *L. grippo-typhosa*, *L. sejrő*, *L. pomona* (P_3 Prag), *L. pomona* TRk, *L. canicola*, *L. ictero-haemorrhagiae*, *L. australis A*, *L. australis B*. *L. bataviae*, *L. ballum*, *L. mitis* (Johnson). Im Laufe der Proben reagierten *L. Uk—2* und *L. Uk—4* unter unseren Standardsera lediglich im Sejrő-Serum in beträchtlicherem Ausmass, und umgekehrt gab in den mit den beiden neuen Stämmen erzeugten Immunsera von unseren Standardstämmen lediglich *L. sejrő* eine stärker positive Reaktion. *L. Uk—2* und *L. Uk—4* ergaben bei den serologischen Proben übereinstimmende Kreutztiter, weshalb angenommen werden kann, dass die beiden neuen Stämme miteinander identisch sind. Die Antigenstruktur der beiden neuen Stämme wich also von der aller unserer Standardstämme ab und zeigte nur mit L. sejrő nähere Verwandtschaft.

Das Blutserum von 158 der 271 Nagetiere untersuchten wir auch mit der Agglutinationslysisprobe unter Verwendung der Stämme *L. grippotyphosa*, *L. pomona* (P_3 Prag), *L. Uk—2* und *L. Uk—4*. Mit *L. grippotyphosa* und *L. pomona* P_3 erwiesen sich sämtliche Blutsera als negativ, während die Sera von 3 Waldmäusen mit den Stämmen *L. Uk—2* und *L. Uk—4* positives Resultat ergaben. 2 dieser 3 Blutsera stammten von den Tieren, aus deren Niere die beiden Stämme gezüchtet wurden, während das dritte Blutserum von einem mittelgrossen Waldmausmännchen herrührte, aus dem Leptospiren nicht gezüchtet werden konnten.

Besprechung

Die Ergebnisse der im Laufe der beiden Jahre durchgeführten Untersuchungen lassen sich folgendermassen zusammenfassen. In der Umgebung von Újkígyós kommt Leptospiren-Infektion unter den Nagetieren vor, doch war diese zur Zeit der Untersuchungen nicht bedeutend. Von den auf dem Gebiet und an der Peripherie der Gemeinde vorzufindenden 6 Nagetierarten war nur eine, die Waldmaus *(Apodemus sylvaticus)* infiziert. Bei 3 von 402 untersuchten Nagetieren konnte Leptospira-Infektion nachgewiesen werden. Es ist beachtenswert, dass unter den in grosser Zahl gesammelten Feldmäusen *L. grippo-typhosa*-Infektion weder durch Züchtung noch mit serologischen Methoden nachgewiesen werden konnte, obwohl dieser Typ unter den Feldmäusen in Transdanubien sehr verbreitet ist. Ferner ist interessant, dass auch unter den Ährenmäusen kein Leptospirenträger vorkam ; dabei sind Ährenmäuse in Dänemark die Hauptwirtstiere der *L. sejrő*. Alle übrigen Nagetiere, darunter auch die in beträchtlicher Anzahl eingefangenen Ziesel, erwiesen sich als negativ. Die allgemeine Verseuchung der Nagetiere ist sehr gering, nur 0,7% ; nehmen wir jedoch nur die Waldmäuse, beträgt der Wert 8,1%. Da die Einsammlung der Waldmäuse im zweiten Jahr woanders erfolgte als im vorangegangenen, gewinnen wir ein charakteristischeres Resultat, wenn wir den Verseuchungsgrad lediglich auf diese letztere Population beziehen. So können wir feststellen, dass die Verseuchung der im Sommer 1953 von einer Stelle gesammelten Waldmäuse 10% ausmachte. Mit Rücksicht auf die verhältnismässig geringe Zahl der aufgearbeiteten Waldmäuse ist aber auch dieser Wert nur von orientierendem Charakter.

Auf Grund ihrer Antigenstruktur gehören unsere isolierten Stämme zur Hebdomadis-Gruppe. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um festzustellen, ob die von uns isolierten Stämme mit irgendeinem anderen Glied der Hebdomadis-Gruppe identisch oder als neuer Serotyp zu betrachten sind. Von den Mitgliedern der Gruppe kommen in Europa *L. sejrő* und *L. saxkoebing* vor, während die anderen verwandten Typen *(L. hebdomalis, L. medanensis, L. wolffi)* in Japan bzw. Indonesien gefunden wurden [2]. Über die Isolierung der europäischen Typen und ihr Vorkommen unter den Nagetieren

stehen folgende wichtigeren Angaben zur Verfügung. *L. sejrő* wurde 1937 von PETERSEN und CHRISTENSEN [3] aus menschlicher Erkrankung isoliert. Später konnten die genannten Autoren diesen Leptospirentyp auf einem Bauernhof, wo auch menschliche Sejrő-Infektion vorkam, auch aus *Mus spicilegus* isolieren. 1942 isolierte PETERSEN [4] aus der Niere von *Apodemus flavicollis* einen mit *L. sejrő* serologisch nahe verwandten neuen Leptospirentyp, den er *L. saxkoebing* benannte. Zwischen 1939 und 1949 züchtete PETERSEN [5] unter 164 Ährenmäusen aus der Niere von 16 *L. sejrő* und aus der Niere eines Tieres *L. saxkoebing*. Gleichzeitig vermochte er diese Typen bei Feldmäusen niemals anzutreffen, sondern beobachtete bei diesen lediglich Infektion mit *L. grippo-typhosa*. In Norditalien hatte MINO [6] 1941—42 550 Nagetiere untersucht, die er in Vercelli und den umgebenden Reisfeldern sammelte. Von den aus Waldmäusen gezüchteten Stämmen diagnostizierte er 8 als *L. sejrő*. Von diesen Stämmen wies jedoch PETERSEN nach, dass sie nicht als Sejrő-Stämme zu betrachten, sondern mit *L. saxkoebing* identisch sind. Später gelang es BABUDIERI [7], *L. sejrő* auch in Italien zu finden, wo er diesen Typ aus der Niere von Apodemus sylvaticus in der Umgebung von Rom züchtete. RIMPAU [8] untersuchte 1942 hauptsächlich in verschiedenen Gebieten Bayerns 362 Nagetiere, und zwar grösstenteils Feldmäuse sowie insgesamt 32 Wald- und Rötelmäuse. Unter Feld- und Rötelmäusen fand er nur *L. grippo-typhosa*-Infektion, während die Sera von 3 Waldmäusen mit *L. sejrő* positive Agglutinationslysisreaktion gaben Gleichzeitig sah er Leptospiren auch in den aus der Niere dieser Tiere entnommenen Proben. Stämme vermochte er aber nicht zu züchten, so dass nicht entschieden werden konnte, ob die Tiere *L. sejrő* oder andere, mit diesem verwandte Leptospirentypen aufwiesen.

Zur Hebdomadis-Gruppe zählende Typen wurden bisher, wie aus den angeführten Literaturangaben ersichtlich, unter Nagetieren in Microtus-Gattungen in Europa bis 1952 nirgends angetroffen, sondern kennzeichnenderweise nur in den Mäusearten *Mus spicilegus*, *Apodemus sylvaticus* und *Apodemus flavicollis*, während sie in Japan im Microtus *(Microtus montebelloi)* häufig vorkommen. In Ungarn züchteten wir 1952 zum erstenmal einen zur Hebdomadis-Gruppe gehörenden Stamm *(L. Rk-16)* aus der Niere einer Feldmaus im nordwestlichen Gebiet des Landes [9]. Am Standort der gegenwärtigen Untersuchungen war jedoch die L. Uk-Infektion nur bei Waldmäusen anzutreffen. Es scheint demnach, dass in Ungarn die zur Hebdomadis-Gruppe gehörenden Stämme je nach den örtlichen Verhältnissen sowohl bei den Microtus- wie bei den Apodemus-Gattungen vorkommen können.

In Kenntnis des Resultates der Nagetieruntersuchungen ergibt sich die Frage, ob für die 1952 in Újkígyós aufgetretene Epidemie der aus den Nagetieren gezüchtete Stamm verantwortlich gemacht werden kann. Zur Klärung der Frage nahmen wir die Agglutinationslysisprobe mit den aufbewahrten Blutsera der Kranken und mit folgenden Leptospirenstämmen vor: *L. Uk-2*, *L. Uk-4*, *L. sejrő*,

L. pomona (P_3 Prag). Im Hinblick darauf, dass die neuerliche Untersuchung der Sera nach ungefähr 2—2½jährigem Stehen erfolgte, ergaben die Titer im Vergleich zu den früheren in allen Fällen niedrigere Werte. Besonders ausgeprägt war die Senkung der mit *L. pomona* P_3 gewonnenen Titer, der in vielen Fällen sogar ganz verschwand. *L. Uk-2* und *L. Uk-4* ergaben bei sämtlichen Proben das gleiche Resultat und reagierten mit erheblich höherem Titer als die gleichzeitig untersuchten *L. sejrő* und *L. pomona* P_3. Die Ergebnisse der serologischen Proben mit den Blutsera einiger Kranken sind auf Tabelle II angeführt, wobei die Resultate der 1952 und gegenwärtig durchgeführten Untersuchungen nebeneinander gestellt sind. Das Ergebnis der serologischen Proben deutet darauf hin, dass es sich bei dem Krankheitserreger der 1952 beobachteten Epidemie um einen mit den aus den Nagetieren isolierten Stämmen übereinstimmenden Leptospirentyp handelte.

Tabelle II

Ergebnisse der mit den Blutsera von 5 anlässlich der Leptospirose-Epidemie in Ujkígyós im Sommer 1952 erkrankten Personen durchgeführten serologischen Proben

Nr.	Bezeichnung des Blutserums der Kranken	Zeitpunkt der Blutentnahme, vom Beginn der Erkrankung gerechnet	Blutserumtiter					
			1952		1954			
			L. sejrő	L. pomona (P_3 Prag)	L. sejrő	L. pomona (P_3 Prag)	L. Uk-2	L. Uk-4
1	V. P.	27 Tage	1600	200	200	neg.	800	800
2	B. P.	27 «	400	400	100	«	200	200
3	V. L.	32 «	800	100	200	«	400	400
4	B. M.	27 «	20	400	20	«	800	800
5	B. L.	27 «	800	400	200	«	800	800

Schliesslich beschäftigten wir uns mit der Frage, welche Schlüsse wir in bezug auf die Infektionsquelle der erwähnten Epidemie aus den Ergebnissen der Nagetieruntersuchungen ziehen können. Es besteht kein Zweifel, dass der die Epidemie hervorrufende Leptospirenstamm unter den Nagetieren angetroffen werden kann, indessen war die Verseuchung geringen Ausmasses und beschränkte sich auf eine Mäuseart, die im allgemeinen in der Nähe der Wohnhäuser nicht vorkommt, sondern eher nur in den das Dorf umgebenden Äckern haust. Unter den in der Umgebung der Wohnhäuser heimischeren Erdmäusen vermochten wir keine Leptospirenträger zu finden. Die Drescharbeiten wurden jedoch im wahrscheinlichen Zeitpunkt der Infektion auf den Höfen der Wohnhäuser ausgeführt. Deshalb ist anzunehmen, dass als Infektionsquelle möglicherweise andere auf dem Hof der Wohnhäuser anwesende Tiere in Frage kommen. In der uns zur Verfügung stehenden Literatur fanden wir keinerlei Angaben über eine diesen Typ menschlicher Infektion verbreitende Rolle der Haustiere. Lediglich LÜBBERS [10] erwähnt menschliche Saxkoebing-Infektionen auf einem

Bauernhof, wo auch die Hunde mit diesem Typ infiziert waren. Am Schauplatz der unserseits beobachteten Epidemie sieht man fast überall Hunde auf den Höfen, ferner ist auch die Schweine-, Rinder- und Pferdehaltung sehr verbreitet. Zur Klärung der Entstehungsursache der Epidemie erscheint daher die Untersuchung aller angeführten Tierarten erforderlich.

Zusammenfassung

Zur Klärung der näheren Umstände einer 1952 aufgetretenen menschlichen Leptospirose-Epidemie wurden in der in Südostungarn befindlichen Gemeinde Újkígyós (Komitat Békés) im Sommer 1952 und 1953 Nagetieruntersuchungen vorgenommen. Im Laufe der beiden Jahre wurden insgesamt 402 Nagetiere untersucht, und zwar 243 Feldmäuse *(Microtus arvalis)*, 55 Ährenmäuse *(Mus spicilegus)*, 37 Waldmäuse *(Apodemus sylvaticus)*, 65 Ziesel *(Citellus citellus)*, 1 Spitzmaus *(Crocidura leucodon)*, 1 Ratte *(Rattus rattus)*. Leptospirenverseuchung konnte nur unter Waldmäusen nachgewiesen werden. Aus der Niere von 2 Waldmäusen wurden mit *L. sejrő* in naher Antigenverwandtschaft stehende Leptospirenstämme isoliert *(L. Uk-2* und *L. Uk-4)*. Die beiden gezüchteten Stämme erwiesen sich bei der Kreuzagglutinationsprobe als identisch. Bei einer weiteren Waldmaus wurde serologisch eine Verseuchung mit ähnlichem Typ festgestellt.

Bei der Beobachtung der 1952 in der Gemeinde Újkígyós aufgetretenen Epidemie bestand nicht die Möglichkeit zur genauen Bestimmung des Krankheitserregertyps, da die Blutsera der Kranken mit zwei Leptospirentypen *(L. sejrő, L. pomona* [P_3 Prag]) Agglutinationslysisreaktion von beträchtlichem Titer gaben. Die Ergebnisse der mit den neuerdings isolierten Leptospirenstämmen und den aufbewahrten Blutsera der Kranken durchgeführten serologischen Proben deuten darauf hin, dass als Infektionsquelle aller Wahrscheinlichkeit nach der in den Nagetieren vorkommende Leptospirentyp verantwortlich ist.

Unter den in der Umgebung der Wohnhäuser anzutreffenden Nagetieren, dort also, wo die im Laufe der Epidemie Erkrankten im wahrscheinlichen Zeitpunkt der Infektion arbeiteten, konnten Leptospirenträger nicht festgestellt werden, weshalb die Untersuchung fortgesetzt und die Infektionsquelle unter den anderen dort vorhandenen Tieren gesucht wird.

LITERATUR

1. Fehér, I., Füzi, M., Alföldy, Z., Kiszel, J.: Orv. Hetil. **24**, 665 (1954).
2. Wolff, J. W.: The Laboratory Diagnosis of Leptospirosis. Thomas, Springfield.
3. Borg-Petersen, C. u. H. Ingemann Christensen: Ugeskr. Laeger **101**, 697 (1939).
4. Borg-Petersen, C.: Acta path. microbiol. Scand. **21**, 165 (1944).
5. Borg-Petersen, C.: Proc. Roy. Soc. Med. **42**, 714 (1949).
6. Mino, P.: Klin. Wschr. **21**, 337 (1942).
7. Babudieri, B.: R. C. Ist. Sup. San. **15**, 704 (1952).
8. Rimpau, W.: Zbl. Bakt. Orig. **150**, 136 (1943).
9. Erscheint demnächst.
10. Lübbers, P.: Ztschr. Hyg. **132**, 347 (1951).

IMMUNBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER AUS SÄUGERMUSKELN GEWONNENEN KRISTALLINEN PHOSPHOGLYZERINALDEHYD-DEHYDROGENASEN

Von

S. Bozsóky und P. Elődi

Staatliches Institut für Hygiene, Budapest, und Biochemisches Institut der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest

(Eingegangen am 30. Mai 1956)

In unseren vorhergehenden Arbeiten [1—3] wurde über die Herstellungsmethode der aus den Muskeln verschiedener Säuger isolierbaren Phosphoglyzerinaldehyd-Dehydrogenasen (PGAD) und über einige Eigenschaften dieser Fermente berichtet. Diese Angaben liessen den Schluss zu, dass zwischen den enzymatischen Eigenschaften, der Kofermentbindung und den N-endständigen Aminosäuren der aus den Muskeln von Kaninchen, Schwein, Rind, Katze und Hund isolierbaren Fermente kein wesentlicher Unterschied besteht. Demgegenüber weicht das aus dem Muskel des Flusskrebses gewonnene kristalline Ferment in einigen Eigenschaften signifikant von dem aus den Säugermuskeln gewinnbaren Ferment ab [4].

In der vorliegenden Arbeit sollen nun die immunbiologischen Eigenschaften der aus Säugermuskeln isolierbaren PGAD untersucht werden.

Material und Methoden

Die Isolierung der Fermente und *die Messung der Fermentaktivität* erfolgte mit den bereits geschilderten Methoden [1—3]. In den Versuchen wurden 3—4mal umkristallisierte Eiweisse benutzt, deren Homogenität mit Elektrophorese kontrolliert wurde (in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0—9,5).

Immunisierungsmethode. Das aus Schweine- oder Rindermuskeln isolierte, dreimal umkristallisierte Ferment wurde gegen mehrmals gewechselte physiologische Kochsalzlösung dialysiert, bis es ammoniumsulfatfrei war. Mit dem so erhaltenen Präparat wurden je 2 Kaninchen von 2500—3000 g Körpergewicht bei zunehmenden Dosen jeden dritten Tag i. v. immunisiert. Die Immunisierung erfolgte in drei Versuchsreihen, wobei während der 4—6 Wochen eines Immunisationszyklus die den einzelnen Tieren injizierte Gesamteiweissmenge in der ersten Reihe 200 mg, in der zweiten 600 mg und in der dritten 1900—2000 mg betrug. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere unter sterilen Verhältnissen durch Verbluten getötet. Die gewonnenen Seren wurden mit Seitzfilter sterilisiert, mit 0,01% Merthiolat konserviert und im Eisschrank aufbewahrt.

Serologische Methoden. Zu den serologischen Untersuchungen gelangte dreimal umkristallisiertes Schweinemuskelferment und viermal umkristallisiertes Rindermuskelferment zur Verwendung. Die Präparate wurden gegen mehrmals gewechselte Glykokollpufferlösung (pH 8,5) 48 Stunden dialysiert, bis sie ammoniumsulfatfrei waren, dann mit Hilfe von Seitzfilter sterilisiert, mit 0,01% Merthiolat konserviert und im Eisschrank gelagert. Die Stammlösungen wurden innerhalb 2—3 Tage benutzt und die weiteren Verdünnungen mit 0,01% Mertthiolat enthaltender physiologischem Kochsalzlösung vorgenommen.

a) *Präzipitation.* Zu je 0,5 ml der gegen Schweine- bzw. Rinder-PGAD produzierten Antiseren sowie zu je 0,5 ml der im Verhältnis 1 : 4 verdünnten Seren wurde, 2,5 mg, 250 γ, 25 γ und 2,5 γ homologes bzw. heterologes Enzympräparat hinzugefügt, und zwar gleichfalls in einem Volum von 0,5 ml. Als Kontrolle dienten normales Kaninchenserum, in Kaninchen gewonnenes Typhus-O-Immunserum (Agglutinintiter 1 : 3200) und auch physiologische Kochsalzlösung, mit denen die Reaktion in ähnlicher Weise eingestellt wurde. Die Präzipitationssysteme wurden teils 2 Stunden im Thermostat bei 37° C und danach bis zum nächsten Tag im Eisschrank, teils eine Woche bei 4° C gehalten.

b) *Hämagglutinationsmethode.* Zur Hämagglutination fand eine Modifikation der MIDDLEBROOK—DUBOSschen Methode [5] Anwendung. Es wurden mit physiologischer Kochsalzlösung dreimal gewaschene Hammelerythrozyten abzentrifugiert, wonach der Rückstand in einem zehnfachen Volum 1,0%iger bzw. 0,1%iger Papainlösung (Merck) suspendiert wurde. Nach 30 Minuten Stehen in einem Wasserbad von 37° C wurden die mit Papain behandelten Erythrozyten dreimal vorsichtig mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen (5 minutiges Zentrifugieren bei 1500 U/Min.) und dann eine 2,5%ige Suspension mit physiologischer Kochsalzlösung bereitet. Je ein Teil der mit 1,0%igem bzw. 0,1%igem Papain behandelten Erythrozytensuspensionen wurde mit einer gleichen Menge von *a)* 5,0 mg/ml, *b)* 0,5 mg/ml Schweine-PGAD-Lösung, *c)* 5,0 mg/ml, *d)* 0,5 mg/ml Rinder-PGAD-Lösung, *e)* 5,0 mg/ml, *f)* 0,5 mg/ml Typhus-O-Antigenlösung und *g)* physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei Zimmertemperatur wurden die mit den verschiedenen Präparaten sensibilisierten und die Kontroll- (nur mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten) Erythrozytensuspensionen zentrifugiert, dreimal vorsichtig mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen (Zentrifugieren während 5 Min. bei 1500 U/Min.) und dann aus den verschiedenen Erythrozyten mit physiologischer Kochsalzlösung 2,5%ige Suspensionen bereitet, von denen 0,025 ml zu den verschiedenen Serumverdünnungen hinzugefügt wurde.

Danach folgte die Bereitung von Verdünnungsreihen aus den untersuchten Seren (Schweine- bzw. Rinder-PGAD-Antiserum, Typhus-O-Immunserum, normales Kaninchenserum) von einer Konzentration von 1 : 100 angefangen in Volumina von 0,5 ml. Nach Einmessung der entsprechenden Erythrozytensuspensionen standen die Systeme eine Stunde lang bei Zimmertemperatur, dann bis zum nächsten Tag im Eisschrank, wonach die Ergebnisse mit Hilfe eines Agglutinoskops abgelesen wurden.

Anaphylaktische Untersuchungen. a) *Aktive Anaphylaxie.* Zu den Untersuchungen fanden Meerschweinchen von 280—350 g Körpergewicht Verwendung. Die Tiere erhielten intraperitoneal — in der in der Tabelle II angegebenen Menge — die Rinder-, Schweine- bzw. Kaninchen-PGAD, die zuvor 48 Stunden lang gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert wurde, bis Ammoniumsulfat in der letzten Salzlösung nicht mehr nachweisbar war. 14—16 Tage nach der Sensibilisierung wurden den Tieren intraperitoneal verschiedene Mengen des entsprechenden Fermentes verabreicht. Die Tiere waren während drei Stunden nach der Erfolgsinjektion einer sorgfältigen Beobachtung ausgesetzt, sodann wurde ihr Zustand noch 5 Tage hindurch kontrolliert.

b) *Passive Anaphylaxie.* Meerschweinchen von 280—320 g Körpergewicht erhielten i. v. 0,1—5,0 ml unverdünntes Schweine- bzw. Rinder-PGAD-Antiserum. Nach 48 Stunden wurde den Tieren 10—200 mg entsprechendes Enzympräparat in einem Volum von je 0,5 ml gleichfalls intravenös injiziert. Vor und 10—15 Minuten nach der Zweitinjektion wurde die Temperatur der Tiere rektal kontrolliert. Die Tiere standen 2 Stunden nach der Erfolgsinjektion unter Beobachtung, danach wurde ihr Zustand noch eine Woche lang täglich geprüft.

Elektrophoretische Untersuchung der Immunseren. Die Elektrophorese erfolgte in einem Apparat vom Typ Fokal B in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 8,8) in einer normalen, einteiligen analytischen Zelle, bei Anwendung einer Spannung von 150 V und einer Stromstärke von 16—18 mA bei +2—3° C.

Ergebnisse

In den zwei ersten Immunisierungsreihen wurde den einzelnen Tieren je 200 bzw. je 600 mg von den Fermenten verabreicht. Diese Eiweissmenge stimmt mit der im allgemeinen zur Immunisierung verwendeten Eiweissmenge überein bzw. übertrifft diese im zweiten Fall. Es gelang nicht, in den gewonnenen Antiseren Präzipitine nachzuweisen. Diese Seren wurden mit keiner anderen Methode

untersucht. Da angenommen wurde, dass das Ferment ein sehr schwaches Antigen darstellt, wurden in der dritten Versuchsreihe extrem grosse Eiweissmengen injiziert, und zwar rund 2000 mg je Tier. Im weiteren sollen die Angaben der in dieser dritten Immunisierungsreihe gewonnenen Seren erörtert werden.

Tabelle I

Hämagglutinationsuntersuchungen

	Bezeichung der Erythrozytensuspension	Hämagglutinationstiter mit	
		homologem Antiserum	normalem Kaninchenserum
	A) Untersuchungen mit Schweine-PGAD		
1.	1% Papain, 5,0 mg Enzym	1 : 200	1 : 400
2.	1% « 0,5 mg «	1 : 200	1 : 400
3.	0,1% « 5,0 mg «	1 : 400	1 : 400
4.	0,1% « 0,5 mg «	1 : 200	1 : 400
	B) Untersuchungen mit Rinder-PGAD		
5.	1% Papain, 5,0 mg Enzym	1 : 400	1 : 400
6.	1% « 0,5 mg «	1 : 400	1 : 200
7.	0,1% « 5,0 mg «	1 : 400	1 : 400
8.	0,1% « 0,5 mg «	1 : 200	1 : 400
	C) Untersuchungen mit Typhus-O-Antigen		
9.	1% Papain, 5,0 mg Antigen	1 : 25 600	1 : 400
10.	1% « 0,5 mg «	1 : 25 600	1 : 400
11.	0,1% « 5,0 mg «	1 : 51 200	1 : 800
12.	0,1% « 0,5 mg «	1 : 51 200	1 : 800
	D) Kontrolle		
13.	1% Papain, —	—	1 : 400
14.	0,1% « —	—	1 : 400

Präzipitation. Nach Inkubation der im methodischen Teil beschriebenen Präzipitationssysteme im Eisschrank konnte in keinem einzigen Röhrchen eine Präzipitatbildung beobachtet werden, selbst während einer ganzen Woche nicht. Im Falle von Inkubation bei Zimmertemperatur liess sich in einzelnen Röhrchen

schon nach einigen Stunden eine Trübung und danach, innerhalb 24 Stunden, die Bildung eines Niederschlages feststellen. Das Ausmass der Niederschlagbildung stand zu den angewandten Antigenmengen in einem geraden Verhältnis. In den eine gleiche Antigenmenge enthaltenden Röhrchen entstand ein gleich starker Niederschlag, unabhängig davon, ob die betreffenden Röhrchen homologes oder heterologes Immunserum, Normalserum oder physiologische Kochsalzlösung enthielten. Die entstandenen Niederschläge sind also nicht Produkte einer Antigen-Antikörperreaktion, sondern kamen infolge der grossen Wärmeempfindlichkeit des Enzyms zustande.

Nach den Ergebnissen der Präzipitationsuntersuchungen enthält das Serum der mit extremen Mengen von PGAD immunisierten Kaninchen keine Präzipitine gegenüber den homologen oder heterologen Enzympräparaten.

Hämagglutinationsuntersuchungen. Unsere Antiseren wurden auch noch mit der Hämagglutinationsmethode in der im methodischen Teil angegebenen Weise untersucht. Als Kontrolle wurde die Hämagglutination auch mit Typhus-O-Antigen und mit Typhus-Antiserum eingestellt. Das Ergebnis der diesbezüglichen Untersuchungen geht aus der Tabelle I hervor.

Aus den Angaben der Tabelle I ist ersichtlich, dass während bei der angewandten Methode im Typhus-O-Immunserum ein hoher Antikörpertiter nachgewiesen werden konnte, in den PGAD-Antiseren keine hämagglutinierenden Antikörper gefunden wurden.

Anaphylaktische Untersuchungen

a) *Aktive Anaphylaxie.* Angesichts der Beobachtung, dass in den serologischen Untersuchungen ein negatives Ergebnis erhalten wurde, gelangte zur Auslösung der aktiven Anaphylaxie als sensibilisierende Dosis eine verhältnismässig grosse Eiweissmenge (5—80 mg) zur Anwendung. Gleichfalls eine verhältnismässig grosse Eiweissmenge wurde für die auslösende Injektion benutzt (15—70 mg). Die i. p. Injektion von 100 mg oder noch mehr Enzym führte innerhalb 1—2 Stunden zum Tode des Tieres. Der Sektionsbefund der eingegangenen Tiere ergab keine Veränderung der inneren Organe.

Die Ergebnisse der aktiven anaphylaktischen Untersuchungen sind in Tabelle II zusammengefasst. Aus Tabelle II erhellt, dass sich bei einer 14—16 Tage nach der Erstinjektion intraperitoneal gegebenen Erfolgsinjektion des Enzyms an den Meerschweinchen keinerlei anaphylaktische Erscheinung ausbildete, sondern dass die Tiere symptomfrei blieben.

b) *Passive Anaphylaxie.* Es wurde versucht, an Meerschweinchen durch i. v. Injektion von in Kaninchen erzeugten PGAD-Antiseren und dann nach 48 Stunden der entsprechenden Enzyme eine passive Anaphylaxie auszulösen. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle III enthalten.

Tabelle II

Aktive anaphylaktische Untersuchungen

Nr. des Tieres	Sensibilisierende Injektion mg	Auslösende Injektion mg	Symptome
A) Untersuchungen mit Kaninchen-PGAD			
1.	10	50	ø
2.	32	60	ø
3.	50	15	ø
4.	60	25	ø
B) Untersuchungen mit Schweine-PGAD			
5.	5	30	ø
6.	10	30	ø
7.	40	70	ø
8.	80	25	ø
C) Untersuchungen mit Rinder PGAD			
9.	5	40	ø
10.	30	70	ø
11.	50	40	ø
12.	70	25	ø

Aus den Angaben der Tabelle III geht hervor, dass es selbst mit sehr grossen Dosen der Schweine- bzw. Rinder-PGAD-Antiseren nicht gelang, die Meerschweinchen in passiver Weise den entsprechenden Enzympräparaten gegenüber zu sensibilisieren. Die Versuchstiere blieben alle am Leben und zeigten mit zwei Ausnahmen keinerlei Spur eines überempfindlichen Zustandes. Die infolge der Enzymgabe auftretende Temperatursenkung konnte auch an jenen Tieren festgestellt werden, die keine Vorbehandlung mit Serum erhalten hatten.

Elektrophoretische Untersuchung der Immunseren. Aus den hier angeführten Angaben ist zu sehen, dass es nicht gelungen ist, im Serum der mit Schweine- und Rinder-PGAD immunisierten Kaninchen mit serologischen und immunbiologischen Methoden Antikörper nachzuweisen. Aus diesem Grunde wurde untersucht, ob in unseren PGAD-Antiseren überhaupt eine Gammaglobulinzunahme beobachtet werden kann. Als Kontrolle wurden auch die Eiweissfraktionen von normalem Kaninchenserum und von Typhus-O-Immunserum bestimmt. Aus den diesbezüglichen Angaben der Tabelle IV geht hervor, dass kein merkbarer Unterschied zwischen dem Gammaglobulingehalt des normalen

Tabelle III

Passive anaphylaktische Untersuchungen

Nr. des Tieres	Serumdosis mg	Enzymdosis mg	Rektaltemperatur vor Gabe des Enzyms	Rektaltemperatur nach Gabe des Enzyms	Symptome
A) Untersuchungen mit Schweine-PGAD					
1.	0,1	2,5	38,4	38,2	ø
2.	0,1	25	38,4	38,2	ø
3.	0,1	25	38,1	38,0	ø
4.	1,0	50	38,4	37,8	ø
5.	1,0	50	38,3	37,8	ø
6.	1,0	100	38,2	37,6	ø
7.	1,0	100	38,0	37,6	ø
8.	5,0	200	38,3	37,6	ø
9.	5,0	200	38,1	37,8	ø
10.	5,0	200	38,2	37,8	ø
11.	—	200	38,4	37,5	ø
12.	—	200	38,1	37,8	ø
B) Untersuchungen mit Rinder-PGAD					
13.	0,1	20	38,0	37,0	ø
14.	0,1	20	38,4	37,4	ø
15.	1,0	10	37,6	37,4	ø
16.	1,0	10	37,6	36,4	ø
17.	1,0	50	37,4	36,2	ø
18.	1,0	50	38,2	37,2	Nasenkratzen
19.	1,0	100	37,6	37,0	ø
20.	1,0	200	37,6	37,0	ø
21.	1,0	200	37,6	36,8	ø
22.	5,0	200	38,2	36,6	Nasenkratzen
23.	5,0	200	38,2	36,0	ø
24.	—	200	37,6	36,2	ø
25.	—	200	37,6	35,6	ø

Kaninchenserums und dem der PGAD-Antiseren beobachtet werden konnte. Der Gammaglobulingehalt des einen Agglutinintiter von 1 : 3200 aufweisenden Typhus-O-Antiserums betrug etwa das Doppelte des Gammaglobulingehaltes der normalen und PGAD-Antiseren.

Tabelle IV

Menge der Eiweissfraktionen von verschiedenen Kaninchenseren bei Bestimmung durch Elektrophorese

Serum	Menge der Fraktionen in %			
	Albumin	Globuline		
		$\alpha_1 - \alpha_2$	β	γ
Normales Kaninchenserum	42,9	18,4	22,4	16,3
	41,7	18,8	23,5	16,2
Schweine-PGAD-Antiserum	43,4	18,3	20,6	16,5
	44,5	22,4	18,3	14,6
Rinder-PGAD-Antiserum	39,8	22,5	24,2	14,2
Typhus-O-Antiserum	39,5	16,0	20,0	27,8

Diskussion

Das Ziel der hier beschriebenen Untersuchungen war, die serologische bzw. immunbiologische Beziehung klarzustellen, die zwischen den aus dem Muskel verschiedener Säuger isolierbaren Phosphoglyzerinaldehyd-Dehydrogenasen besteht. Es wurde versucht, mit Schweine- und Rinder-PGAD in Kaninchen ein Immunserum hervorzurufen, um mit dessen Hilfe die antigenstrukturellen Verhältnisse dieser zwei Arten von PGAD zu studieren. Unsere Untersuchungen ergaben jedoch, dass es selbst im Blutserum von Kaninchen, die mit sehr grossen Mengen (2000 mg) von dreimal umkristallisierten, homogenen PGAD aus Schweine- bzw. Rindermuskeln immunisiert wurden, nicht möglich ist, Präzipitine oder hämagglutinierende Immunstoffe nachzuweisen. Es ist anzunehmen, dass die Immunisierung mit diesen Enzymen möglicherweise zur Produktion von inkompletten Antikörpern geführt hat. Zur Klärung dieser Frage wurde versucht, mit diesen PGAD-Antiseren an Meerschweinchen eine passive Anaphylaxie auszulösen. Nach den Untersuchungen von KABAT und BENACERRAF [6] können nämlich die Meerschweinchen mit inkompletten Antikörpern ebensosehr sensibilisiert werden wie mit den eine sichtbare Reaktion gebenden, kompletten Antikörpern. Mit der Methode der passiven Anaphylaxie gelang es jedoch nicht, in unseren PGAD-Antiseren Antikörper nachzuweisen. Auch in der Gammaglobulinfraktion des Serums der mit PGAD immunisierten Kaninchen konnte keine Zunahme beobachtet werden. Schliesslich führten auch unsere aktiven anaphylaktischen Versuche an Meerschweinchen zu einem negativen Resultat.

Die hier mitgeteilten Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, dass die aus Schweine- bzw. Rindermuskeln hergestellte, kristalline PGAD weder für den Organismus des Kaninchens noch für den des Meerschweinchens einen Antigenreiz bedeutet. Diese Beobachtung ist überraschend, da das Molekulargewicht

der PGAD etwa 120 000 beträgt und auch ihr Tyrosin- und Tryptophangehalt beträchtlich ist [7]. Das Enzym verfügt also über jene Eigenschaften, die im allgemeinen als charakteristisch für die Eiweisse mit Antigenwirkung gehalten werden. Trotzdem löste aber i. v. Immunisierung mit PGAD laut unserer Versuche weder im Kaninchen noch im Meerschweinchen eine Antikörperproduktion aus. Weitere Untersuchungen werden entscheiden, ob die Schweine- und Rinder-PGAD auch unter anderen Versuchsverhältnissen (Anwendung von Adjuvantien, Immunisierung von Nichtsäugern) das Fehlen der Antigeneigenschaft zeigt.

Zusammenfassung

Im Serum von Kaninchen, die mit grossen Mengen von aus Muskeln verschiedener Säuger isolierter Phosphoglyzerinaldehyd-Dehydrogenase (PGAD) immunisiert wurden, gelang es nicht, durch Präzipitation, Hämagglutination und Versuchen zur Auslösung einer passiven Anaphylaxie Antikörper nachzuweisen. Auch die Gammaglobulinfraktion des Serums von Kaninchen, die mit PGAD immunisiert wurden, zeigte keine Zunahme. Des weiteren konnte mit dem Enzym an Meerschweinchen keine aktive Anaphylaxie hervorgerufen werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen weisen darauf hin, dass die aus den Muskeln von Schweinen und Rindern isolierte kristalline PGAD keinen Antigenreiz für den Organismus des Kaninchens und Meerschweinchens bedeutet.

LITERATUR

1. Сёреньи, Э. Т., Дворникова, П. Г.: Укр. бцохим. журн. **22**, 127 (1950).
2. Сёреньи, Э. Т., Элёди, П.: Укр. биохим. журн. **26**, 387 (1954).
3. Elődi, P., Szörényi, E. T.: Acta Physiol. Hung. **9**, 339 (1956).
4. Szörényi, E. T., Elődi, P., Dévényi, T.: Acta Physiol. Hung. **9**, 351 (1956).
5. Middlebrook, G., Dubos R. J.: J. Exp. Med. **88**, 521 (1948).
6. Kabat, E. A., Benacerraf, B.: J. Immunol. **62**, 97 (1949).
7. Velick, S. F., Udenfriend, S.: J. Biol. Chem. **203**, 575 (1953).

STUDIES ON THE INTERACTION BETWEEN COXSACKIE AND POLIOMYELITIS VIRUSES

I. SIMULTANEOUS INFECTION WITH B1 COXSACKIE AND LANSING POLIOMYELITIS VIRUSES IN MICE OF DIFFERENT AGES

By

I. DÖMÖK

State Institute of Hygiene, Budapest

(Received June 8, 1956)

The interaction between the Coxsackie (C) and the poliomyelitis viruses have been studied by a number of authors in animal experiments. These investigations were mostly confined to the demonstration whether the rate of the manifestation of poliomyelitis, or the severity of the disease, might be altered by mixed infection with C virus. The significance of such investigations lies in the possibility that their results might be of some practical value in relation to human pathology. The animals used in these experiments were monkeys [1, 2, 3] and mice [2, 3, 4, 5]. All the monkey experiments hitherto published have invariably given negative results, regardless whether the viruses were given simultaneously, or whether the C virus was given previously. Some authors [2] working on mice reported negative results, while others [3, 4, 5] succeeded in demonstrating an interference between the two viruses. According to the results so far available, it seems that there is a difference between the Groups A and B of the C viruses even in the interference phenomenon. The antagonism against the poliomyelitis virus was only observed when strains of the Group B were used; a precise analysis of the phenomenon, however, has not yet been forthcoming.

The present study was concerned with some interference experiments carried out with the Group B Type 1 strain of the C virus and the Lansing strain of poliomyelitis virus, in order to examine how far the results of simultaneous infection of mice would be influenced by the age of the animals, the route of infection and the quantitative relations between the viruses used. In addition, the resistance of the mice surviving the experiments was also studied by challenging them with the Lansing virus on the 36th day of the experiments.

Materials and Methods

Virus strains. The Group B Type 1 strain of C virus (in the following: B1 strain) was obtained by courtesy of Dr. G. DALLDORF (Albany, USA.). The collection No. of the strain was 49 683. In our experiments samples of the 39th and 40th passages were used. The mouse adapted strain of the Lansing poliomyelitis virus (in the following: Lansing strain) was kindly supplied by Dr. P. VON MAGNUS (Copenhagen). The latter strain had already undergone several passages in our laboratory at the time our experiments were commenced. In all but one of the experiments dealt with here, virus material from the same passage was used.

Mice. Albino mice from the polygamic breeding stock of our Institute were used. The age of the animals to be used in the experiments was determined according to the following considerations. Two groups of animals were wanted, one partially susceptible to the B1 strain, and another not showing any neurological response at all. For the latter purpose, according to the literary data, mice 21 days of age are suitable (in the following, older group of mice). In the partially susceptible group, the choice of age was guided by the consideration that the majority of the animals should survive the experimental disease. This was achieved by testing the susceptibility of mice from 1 to 12-day old to 10^3 and 10^5 LD50 units of the B1 strain. (The LD50 was determined in one-day-old mice.) As in the interference experiments, the inoculations were made intracerebrally with 0,02 ml dose. Two separately performed experiments showed that mice with an average weight corresponding to their age, were fully susceptible until the 6th day of life, *i. e.* all the infected animals died. The majority of the 7 to 8-day old animals also succumbed to the infection. From the 9th day on both doses of the virus caused only a low incidence of disease with certain variations, which, however, depended on the litter used. Accordingly, in our experiments 9-day old mice (in the following, younger group of mice) were used as partially susceptible animals. The variations in the susceptibility of the 9-day old litters seemed to depend rather on the litter than on the actual weight of the animals. The litter-mates were, therefore, divided evenly into each of the experimental groups. In one experiment, however, the grouping was made according to the weight of the animals.

Standard viral suspensions. 20 per cent suspensions were prepared from the torsos of newborn mice infected with B1 strain, as described in an earlier publication [6]. A number of mice 14 to 16 g of weight were inoculated intracerebrally with 0,03 ml of the Lansing virus in the form of a 10 per cent mouse-brain suspension. From the central nervous tissues of mice paralysed within 10 days following the infection, a 10 per cent suspension was prepared and refrigerated at —8° C overnight. After thawing, the material was centrifuged at 4000 r. p. m. for 20 minutes. The supernatant was pipetted off, and after addition of 1000 U. penicillin and 2 mg of streptomycin per ml, the material was distributed, sealed in vials and stored in solid CO_2.

Titration of the viral suspensions. The standard viral suspensions were always titrated before use. Moreover, the B1 strain was titrated monthly during the experiments. All the titrations were made in tenfold dilution series. As a diluent, physiological saline was used. Each dilution of the B1 strain was inoculated into one or two newborn litters, while for each dilution of the Lansing strain at least 10 mice weighing 14 to 16 g were used. In both cases, the infection was made intracerebrally in 0,02 ml volume. The infected animals were under observation for 10 days when the B1, and for 30 days when the Lansing strain, was used. On the basis of the specific deaths, the LD50 was estimated according to REED and MUENCH [7]. The titre of the B1 strain was 10^{-6} while that of the Lansing strain was about 10^{-4}. The dilutions of the Lansing strain were calculated by the weight of the central nervous tissue.

Experimental

Experiments on 9-day old mice. Three series of experiments were performed. In the first series the animals were grouped according to body weight, while in the other two series the separate litters were distributed as described in the chapter on the methods.

In the first and second series of the experiments, the mice were inoculated with 10^{-2}, 10^{-3}, and 10^{-4} final dilutions of the Lansing strain that was mixed to 10^3 and 10^5 LD50 units of the B1 strain, respectively. As a control of the Lansing infection, suspensions of normal suckling mice torsos were used instead of C virus, while normal mouse-brain suspension was added to the C virus controls instead of the Lansing virus. The infections were performed intracerebrally with a final volume of 0,02 ml.

In the third series of experiments, the C virus was given subcutaneously, and the Lansing strain intracerebrally. The animals were injected into the interscapular space, with 10^5 LD50 doses in 0,03 ml of the B1 strain, while the 10^{-2},

10^{-3} and 10^{-4} dilutions of the Lansing virus were given intracerebrally in 0,02 ml. Appropriate controls were used. As animals of the same age were not always available in adequate numbers to test all the dilutions of the Lansing virus at the same time, these experiments could only be carried out in fractions. (The first in three, the second and third in two fractions each.) The experimental and control groups were inoculated at the same time with the same samples of the virus.

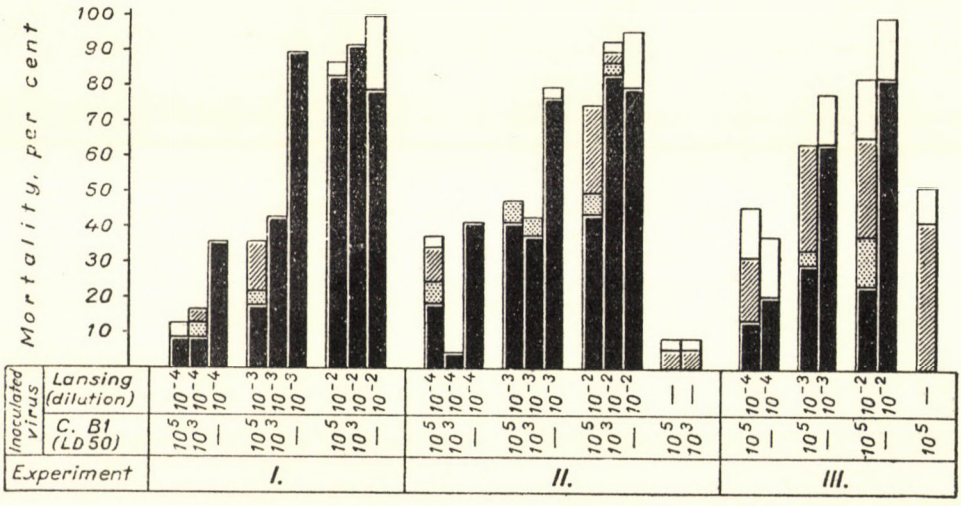


Fig. 1. Percentage of deaths in experiments on 9-day old mice.
■ poliomyelitic deaths, ▦ deaths following mixed symptoms caused by the poliomyelitis and the B1 virus, /// deaths caused by B1 virus, □ deaths caused by other factors

The mice were kept under observation for 30 to 35 days following the infection. They were examined individually every day, and the actual symptoms were recorded. There were no difficulties encountered in the differentiation of the symptoms caused by the C and the poliomyelitis viruses. In most of the poliomyelitis cases, typical paralysis of the extremities could be observed. Less frequently nuchal rigidity was the only symptom ; moreover, there occurred some deaths without any observable poliomyelitic symptoms. The fatalities were regarded as specific only if they coincided with the typical poliomyelitic deaths, and if no symptoms of any other disease could be observed.

The B1 strain did not cause any observable disease in most mice in the younger group. Some of the animals developed ataxia, assumed a typical position ; later they were incapable of standing up, with their extremities spastic though actively movable. The mice were trembling with occasional spastic attacks, but no paralysis was observable. Such animals lost considerable weight in the course of a few days and most of them died. Although some of the animals overcame a serious disease, they remained underdeveloped and exhibited a different behav-

Table I

Results of the interference experiments on mice 9 days of age

Experiment	Virus: C. B1 (LD50)	Virus: Lansing (dilution)	Number of mice	Dead with signs of: P	P+C	C	X	Poliomyelitic mortality, % ×	Recovered from infection: P	C	Average incubation (days): P till death	C till getting ill
I.	10^5	10^{-4}	23	2	—	—	1	9	—	1	22	4*
	10^3	10^{-4}	23	2	1	1	—	14	1	1	20,3	9
	—	10^{-4}	22	8	—	—	—	36	—	—	11,7	—
	10^5	10^{-3}	22	4	1	3	—	26	—	3	20,4	6
	10^3	10^{-3}	21	9	—	—	—	43	—	1	22,3	12*
	—	10^{-3}	21	19	—	—	—	90	—	—	9,9	—
	10^5	10^{-2}	23	19	—	—	1	86	—	1	13,3	4
	10^3	10^{-2}	24	22	—	—	—	92	—	—	11,4	—
	—	10^{-2}	24	19	—	—	5	100	—	—	7,6	—
	10^5	—	14	—	—	3	—	—	—	—	—	6
	10^3	—	8	—	—	4	—	—	—	1	—	6
II.	10^5	10^{-4}	31	6	2	3	1	30	—	3	20,9	5,5
	10^3	10^{-4}	22	1	—	—	—	5		1	16*	4*
	—	10^{-4}	31	13	—	—	—	42	—	—	16,6	—
	10^5	10^{-3}	31	13	2	—	—	48	—	1	18,5	5
	10^3	10^{-3}	21	7	2	—	—	43	—	2	13,4	4,8
	—	10^{-3}	31	24	—	—	1	80	—	—	12,9	—
	10^5	10^{-2}	32	14	2	8	—	67	—	1	13,6	6,6
	10^3	10^{-2}	32	27	1	1	1	93	—	—	14,1	7*
	—	10^{-2}	31	25	—	—	5	96	—	—	11,5	—
	10^5	—	33	—	—	2	1	—	—	5	—	9,5
	10^3	—	32	—	—	2	1	—	—	6	—	9,3
III.	10^5	10^{-4}	28	4	—	5	4	21	—	—	20	5,6
	—	10^{-4}	24	5	—	—	4	25	—	—	21,2	—
	10^5	10^{-3}	23	7	1	7	—	50	—	—	19,6	6,1
	—	10^{-3}	22	14	—	—	3	74	—	—	13,4	—
	10^5	10^{-2}	29	8	3	8	5	69	1	—	12,2	4,3
	—	10^{-2}	29	24	—	—	5	100	—	—	10,6	—
	10^5	—	31	—	—	13	3	—	—	—	—	4,5

Explanations P : poliomyelitis ; C : Coxsackie Bl ; X : non specific.

× Deaths caused by Coxsackie infection or by non-specific factors have been subtracted from the total number of animals.

* Single case.

iour to that of the normal ones ; they were excited, jumping and restless. A mild disease usually passed without any noticeable consequences.

No troubles due to intercurrent disease were encountered during the experiments. A few animals were lost by the trauma of inoculation. Most of the non-specific deaths were due to the cannibalism of the mothers. Fig. 1 shows the percentage of deaths in our younger group of mice, the deaths being grouped according to the symptoms of the disease. Table I contains the detailed data of these experiments.

In Fig. 1, the percentage of poliomyelitic deaths was referred to the total number of animals in the group, whereas in Fig. 2 and in the Tables, the non-poliomyelitic deaths were subtracted from the total number of animals and the rest was taken as 100 per cent. Such an evaluation can be regarded as reliable because all the non-poliomyelitic deaths occurred in the early phase of the experiment, and there is no reason to assume that any of the animals dead early would afterwards have succumbed to poliomyelitis.

In the first series of experiments 225, in the second 327, animals were used. In both series the Bl virus exhibited a marked sparing effect against the Lansing strain. This appeared both in the lowering of the poliomyelitic mortality, and in the lengthening of the incubation period. The results of the first two experimental series are, on the whole, unequivocal, but in the details some differences can be observed. In the first series 10^5 LD50 units of Bl virus exerted a more marked inhibition of the lethal effect of the Lansing strain than 10^3 LD50. In the second series, no correlation between the dose and the inhibitory effect of the Bl virus was observed. If the various titres of the Lansing virus obtained in the experimental and control groups are calculated according to REED and MUENCH — using the data of poliomyelitic mortality shown in Table I — the following numerical results are obtained. In the control group of the first series, $10^{-3.72}$; in presence of 10^5 LD50 Bl virus, $10^{-2.64}$; in the presence of 10^3 LD50 Bl virus,

Table II

Statistical analysis of the summarized data from Experiments I and II

	Infective agent	Dilution of the Lansing virus			Relative potency	Fiducial limits
		10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}		
Experiment I.	Lansing	8/22*	19/21	19/19	100	
	Lansing + Coxsackie	5/44	14/40	41/46	11,3	4,0—29,5
Experiment II.	Lansing	13/31	24/30	25/26	100	
	Lansing + Coxsackie	9/49	24/52	44/54	12,6	4,2—32,5

* Numerator, mice dead with signs of poliomyelitis.
Denominator, sum of the survivors and the animals dead of poliomyelitis.
The relative potency was calculated by probit analysis (13).

$10^{-2.92}$. The corresponding titres of the second series were $10^{-3.68}$, $10^{-2.97}$ and $10^{-2.84}$, respectively.

According to the statistical analysis, the difference between the effectiveness of 10^3 and 10^5 LD50 units of the Bl virus is not significant. On the other

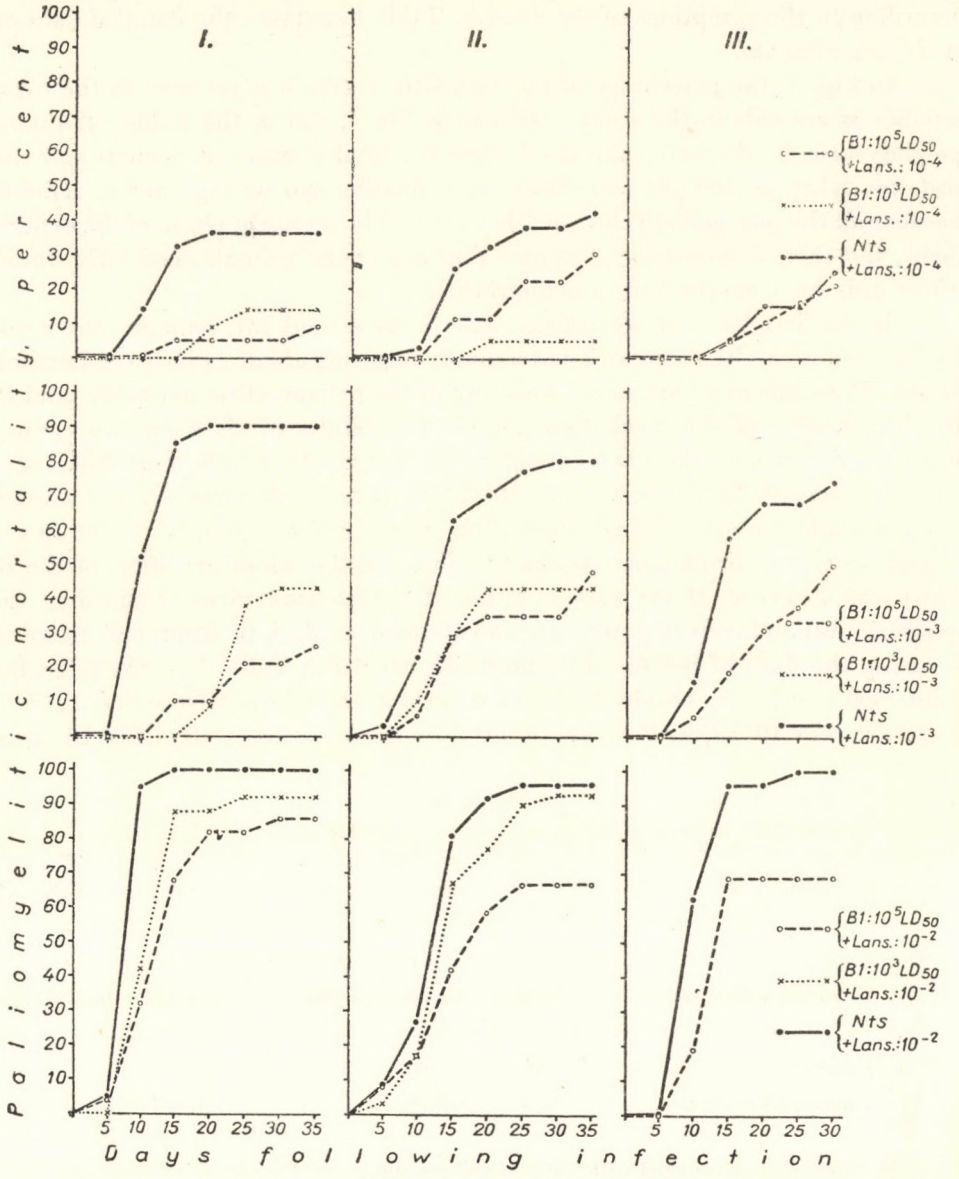


Fig. 2. Cumulative poliomyelitic mortality in experiments on 9-day old mice
I., II., III.: markings of the series of experiments. Nts.: normal torso suspension

hand, the differences are strongly significant when the rate of poliomyelitic deaths in the dual-infected groups is compared with those in the groups infected with the Lansing strain alone. Table II gives a summary of the data of the first and second experimental series, together with the calculated values of relative potency and fiducial limit.

The incubation period of poliomyelitis was longer in the simultaneously infected than in the control groups, and to a certain extent it seemed to be influenced by the administered dose of Bl virus. The modificating effect of the Bl strain on experimental poliomyelitis is illustrated in Fig. 2 which presents the percentages of the poliomyelitic deaths in terms of time.

In the control groups infected with poliomyelitis no animal survived that had previously exhibited any symptoms of the disease. In one instance a mouse from a dually infected group of the first series of experiments (see Table I) developed paralysis of its left hind limb on the 6th day of the experiment, but the paralysis did not progress and the animal recovered about the tenth day.

Our investigations have failed to give information about the reciprocity of the interference phenomenon under the present experimental conditions. In order to decide this problem, more animals ought to have been employed in the C virus control groups.

The third series of experiments shows that there was no difference in the interference phenomenon whether the Bl virus was given subcutaneously, or intracerebrally. The titres of the Lansing strain, calculated with the method of REED and MUENCH, were in the control group $10^{-3.19}$, and in the simultaneously infected group $10^{-2.94}$.

In one of the simultaneously infected groups (see Table I), one animal survived the manifest poliomyelitis. On the 14th day following the inoculation, the right hind limb of this mouse was paralysed but complete recovery ensued by the 30th day of the experiment.

Experiments on 21-day old mice. The methods used in these experiments were similar to those of the second experimental series on mice 9 days of age. The animals were kept under observation for 33 days following the infection. The detailed data are summarized in Table III.

The poliomyelitic mortality rate in the experimental and control groups exhibited some slight differences only when we used dilutions of the Lansing virus near to its final titre. A slight and not significant difference was observed between the incubation periods of the two groups. Titres of the Lansing virus proved to be similar in both the simultaneously infected ($10^{-3.64}$ and $10^{-3.59}$) and in the control groups ($10^{-3.65}$).

It appeared that the simultaneous infection of the older group of mice with the Lansing virus slightly increased their susceptibility to the C virus. Out of the 57 mice infected simultaneously with 10^5 LD50 units of the Bl strain and the Lansing virus, 6 developed a C virus encephalitis, while only 1 out of the 35

controls. Such a slight difference, however, does not permit to draw any definite conclusions.

Table III

Results of the interference experiments on 21-day old mice

Virus		Number of mice	Dead with signs of				Polio-myelitic morta-lity, %	Recover-ed from		Average incubation (days)	
C. Bl (LD50)	Lansing (dilution)		P	P+C	C	X		P	C	P till death	C till getting ill
								infection			
10^5	10^{-4}	32	10	—	—	—	31	—	4	15,8	5
10^3	10^{-4}	32	8	—	—	—	25	—	—	20	—
—	10^{-4}	32	12	—	—	1	39	—	—	17	—
10^5	—	22	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10^3	—	16	—	—	1	—	—	—	—	—	5*
10^5	10^{-3}	25	19	1	1	—	83	—	1	9,3	6,5
—	10^{-3}	24	21	—	—	—	88	—	—	14,5	—
10^3	10^{-3}	21	17	—	—	—	81	—	—	15,4	—
—	10^{-3}	21	17	—	—	—	81	—	—	12,8	—
10^5	—	13	—	—	1	—	—	—	—	—	5 *
10^3	—	15	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10^3	10^{-2}	24	21	—	—	—	88	—	—	7,5	—
—	10^{-2}	22	21	—	—	—	95	—	—	9,1	—
10^3	—	16	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Explanations *v.* Table I.

On the 33rd day of the experiment, blood was taken from the animals. Two days later, one of the animals that had been injected with 10^5 LD50 units of the Bl and a 10^{-4} dilution of the Lansing virus, became paralysed and died three days later. In the group infected with 10^3 LD50 units of the Bl and 10^{-4} dilution of the Lansing virus, paralytic symptoms were observed on the day of taking the blood samples in one, the next day in three, and on the third day in one animal. Three of the six paralysed animals survived, and they were still alive 30 days later. All the three survivors exhibited paralysis of the hind limbs. None became paralysed of the control animals infected with a 10^{-4} dilution of Lansing virus.

Resistance to the Lansing virus of the survivors in interference experiments. On the 36th day of the experiments, the survivors from the younger group both in the first and in the second series were challenged intracerebrally with the Lansing virus, as well as all the survivors of the older group of mice. The infection was performed with 0,02 ml of inoculum, always into the hemisphere not previously treated. At the same time normal mice of a similar body weight were also infected as controls. All the animals were kept under observation for 30 days. This method was employed in order to decide whether the immunising effect of the Lansing virus was influenced by a simultaneous infection with the C virus.

Table IV

Poliomyelitis mortality rate of the survivors of the younger experimental group after challenge with the Lansing virus

			In the interference experiments with B1 virus			
			inoculated (LD50)		Sum	not inoculated
			10^5	10^3		
In the interference experiments with Lansing virus	inoculated (dilution)	10^{-4} I.	2/20*	6/18	8/38	12/13
		10^{-4} II.	7/19	13/21	20/40	16/18
		10^{-3} I.	1/14	0/2	1/26	2/2
		10^{-3} II.	7/14	6/11	13/25	6/6
		10^{-2} I.	0/3	1/2	1/5	—
		10^{-2} II.	3/7	1/2	4/9	—
		Sum	20/77	27/66	*47/143*	*36/39*
	not inoculated	I.	4/10	0/4	4/14	23/30
		II.	7/29	14/29	21/58	23/30
		Sum	11/39	14/33	*25/72*	*46/60*

Explanations.
I.: Experiment I. Mice challenged with 10 LD50 of Lansing virus.
II.: Experiment II. Mice challenged with 20 LD50 of Lansing virus.
* Numerator : number of dead animals.
Denominator : number of inoculated animals.

Table V

Poliomyelitis mortality rate of the survivors of the older experimental group after challenge with the Lansing virus

			In the interference experiments with Lansing virus	
			inoculated	not inoculated
In the interference experiments with B1 virus	inoculated (LD50)	10^5	15/25	29/34
		10^3	15/25	41/46
		Sum	*30/50	70/80
	not inoculated		24/27	*49/60

Numerator : number of dead animals.
Denominator : number of inoculated animals.
*Values of statistical significance calculated from the dually infected and uninfected groups : $\chi^2 = 5{,}30$: $P < 2\%$.

The death rate due to the challenge in the younger group of mice is given in Table IV, while that in the older group, in Table V.

Survivors of the first series of the younger group were challenged with 10 LD50 units of the Lansing virus, while those of the second series with 20 LD50 doses. The results of both series were in good agreement, and so they could be evaluated together. Out of the 60 normal control mice, 46 (77 per cent) died, while of the 39 mice infected previously with the Lansing virus alone, 36 animals (92 per cent) died. This makes it probable that a single intracerebral infection with the Lansing virus does not cause any demonstrable immunity. On the other hand, among the challenged mice that had been subjected to a dual infection or a single one with B1 virus, the mortality rate was much lower. Out of the 143 mice infected simultaneously, only 47 (34 per cent) died and out of the 72 animals which had been given C virus alone, only 25 deaths (35 per cent) occurred. The enhanced resistance of the last mentioned two groups was indicated also by the incubation period which was 17 days on the average as opposed to the 12 days in the control group.

The results thus obtained have shown that a previous Lansing infection exerted a rather unfavourable influence on the course of a *homologous* challenge on the 36th day, while a previous C virus infection ensured marked protection against the *heterologous* Lansing virus, even after such a long time. The mortality rate was essentially the same in the dually infected groups and in the groups inoculated with the C virus alone. Consequently, the decrease of susceptibility in the groups subjected to dual infection must not be attributed to the Lansing component, but exclusively to the C virus infection.

No similar results were obtained in the analogous experiments carried out on older mice (see Table V).

A statistically significant decrease of the susceptibility ($P < 2$ per cent) was observed only in dual infections. The incubation period was closely similar in all the groups.

Discussion

According to our results, an interference phenomenon exists between the B1 and the Lansing viruses in 9-day old mice, even if infection has been performed simultaneously. The interference manifests itself both in the lowering of the poliomyelitic death rate, and in the lengthening of the incubation period. It has been observed regardless whether the B1 virus had been given intracerebrally or subcutaneously. In experiments carried out only with the intracerebral method no significant difference could be observed between the interfering capacity of 10^3 and of 10^5 LD50 units of the B1 virus. The effect was, however, influenced by the dose of the Lansing virus ; the interference was most marked when 10^{-3} dilution (10 LD50) of virus had been given.

In experiments performed by simultaneous intracerebral infection of 21 day old mice, we were unable to demonstrate any inhibitory effect of the C virus on the Lansing strain. In these experiments, only few animals became ill or died as a result of the intracerebral infection with the B1 virus. This observation contradicts those of HOWES [8, 9], who on the basis of mortality was able to titrate the same virus even in normal adult mice. To account for this discrepancy, the role of several factors must be considered, such as the different strain of mice, the method of infection, the history of the virus strain, etc. In our opinion, the last factor is the one most important. Its significance was first pointed out by DALLDORF and GIFFORD [10].

DALLDORF published data [4] showing how the age of the mice and the interval between the two infections affected the interference between Group B of the C virus and the Lansing virus. He found that both in the younger (5—8 days old) and the older (9—12-day old) mice, interference could be correctly estimated only when the interval between the C and Lansing virus infections was at least 4 days. In simultaneous infections, DALLDORF was able to demonstrate only a minimal, if any, inhibition. Table I in his publication shows among others that all the 8 nine-day old mice thus treated died with typical symptoms of poliomyelitis; the incubation period observed was also similar to that in the control group. The apparent discrepancy between his and our results must be due to a difference in methods and experimental conditions. Thus DALLDORF used B3 virus in part of his experiments, and in most of them he worked with a 10^{-1} dilution of the Lansing virus, a dilution that represented about 100 to 1000 LD50 units. With such lar e doses of the virus we, too, observed a lower degree of interference.

STANLEY [3], in experiments on adult mice, observed that simultaneous infection with the E 46 strain of Group B of C virus was able to prolong the incubation period of the disease caused by the MEF 1 strain of poliomyelitis virus. Similar effects were observed in some of our experiments on 21-day old mice, but contradictory cases also occurred.

SULKIN, WALLIS and MURPHY [5] demonstrated an interference between the C and poliomyelitis viruses also when using 28-day old mice. Their findings cannot be compared with ours since they used other types of Group B, and also because in their cases the interval between the two infections was 5 days. In some of their experiments they used the Group B Type 3 strain as an interfering agent, and found that it altered the type of poliomyelitic paralysis. Similar effects have not been observed in our experiments with the B1 virus.

It is well-known that with a number of viruses the interval between the inoculations is a most important factor in influencing the interference phenomenon. The fact that in our experiments interference developed even after a simultaneous infection, suggests that in the brain of suckling mice the growth cycle of the C virus is shorter than that of the poliomyelitis virus. This is sup-

ported by the observation that the manifest disease caused by the B1 strain in 9-day old mice is preceded by an average incubation of 6 days, while the average incubation of the Lansing virus is 8—9 days, even if comparatively large doses are given. Similar inferences as to the growth cycle of the C virus may be drawn from the data of LEVADITI and VAISMAN [11] who observed that in the brain of young mice the simultaneously inoculated poliomyelitis virus was overgrown after a few passages by the C virus.

We wish to call attention to our results on the resistance of those animals that had survived the interference experiments and were then challenged with poliomyelitis virus on the 36th day. As has been shown, the resistance differed markedly in the two age-groups investigated. Animals infected on the 9th day of life simultaneously with both viruses, or with the C virus alone, appeared to have a definite resistance when challenged with 10 to 20 LD50 units of the Lansing virus. These observations can by no means be explained by immune response since no antigenic relation has been proved to exist between C and poliomyelitis viruses, and also because in our experiments no signs of homologous immunity have been observed in those control mice which had been pretreated only with the Lansing virus. These animals proved to be even more susceptible to the homologous virus than the untreated controls. Further experiments on this subject are in progress. We have not found any references in literature concerning a prolonged resistance caused by an antigenically unrelated virus, except in a publication by RHODES and CHAPMAN [12], but their investigations were performed on LCM and MM viruses.

A different result was obtained when the survivors from the older group of mice (21-day old) had been challenged with the Lansing virus. A decrease in susceptibility was observed only in those animals that had undergone a dual infection, but none at all in those that had been treated either with the C, or with the Lansing virus. We are inclined to suggest that under these conditions the immune reaction against the Lansing strain must be somehow enhanced by the presence of the B1 virus.

Summary

1. The B1 strain of the Coxsackie virus, administered either intracerebrally or subcutaneously to mice 9 days of age, inhibited the pathogenic effect of the simultaneously inoculated poliomyelitis virus. As a result of the inhibition, the rate of morbidity and mortality decreased and the incubation period was lengthened. The effect was observed when either 10^3 or 10^5 LD50 units of the B1 virus were given, but there was no significant difference in effect between the two doses. As to the demonstrability of the interference phenomenon, a 10^{-3} dilution (about 10 LD50 units) of the Lansing virus proved to be optimal.

2. Moreover, the 9-day old mice infected with the Coxsackie B1 virus have shown an increased resistance to a challenge carried out with 10—20 LD50 units of the Lansing virus on the 36th day following the Coxsackie infection. This increased resistance was also observed in animals which had been subjected to a dual infection with the B1 strain and the Lansing virus, but it was absent if the animals had been treated only with the Lansing virus. The prolonged resistance cannot be explained by some immune mechanism since no antigenic relations are known to exist between the B1 and the Lansing viruses.

3. If 21-day old mice were used, no interference could be observed between the simultaneously injected B1 and Lansing viruses. Animals surviving a dual infection exhibited some resistance against a Lansing virus infection 36 days later, in contrast with those animals that had been infected either with the Lansing virus, or with the B1 virus.

Acknowledgements: The author is greatly indebted to Dr. Gy. Barsy for making the statistical calculations and to Dr. E. Farkas for his help and advice.

LITERATURE

1. Howitt, B. F. & Nichols, V. J.: J. Immunol., **68**, 599 (1952)
2. Melnick, J. L.: Bull. N. Y. Acad. Med., **26**, 342 (1950)
3. Stanley, N. F.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **81**, 430 (1952)
4. Dalldorf, G.: J. Exptl. Med., **94**, 65 (1951)
5. Sulkin, S. E., Wallis, C., Murphy, T. P., Jr.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **84**, 184 (1953)
6. Dömök I.: Acta Microbiol. Hung., **3**, 95 (1955)
7. Reed, L. J., Muench, H.: Am. J. Hyg., **27**, 493 (1938)
8. Howes, D. W.: Austr. J. Exptl. Biol. Med. Sci. **30**, 423 (1952)
9. Howes, D. W.: Austr. J. Exptl. Biol. Med. Sci. **32**, 253 (1954)
10. Dalldorf, G. & Gifford, R.: J. Exptl. Med. **96**, 491 (1952)
11. Levaditi, C. & Vaisman, A.: Ann. Inst. Pasteur, **80**, 678 (1951)
12. Rhodes, A. J. & Chapman, M.: Canad. J. Res. (E), **28**, 245 (1950)
13. Finney, D. J.: Statistical Method in Biological Assay. London, Charles Griffin & Co. Ltd. 1952.

VIRUS ISOLATION EXPERIMENTS IN RELATION TO THE POLIOMYELITIS EPIDEMIC OF 1954 IN HUNGARY

By

P. FÖLDES

Institute of Microbiology of the Medical University, Budapest

(Received June 8, 1956)

The recent development in the field of poliomyelitis research, the culti vation of the agent in tissue culture [1] has made it possible to start laboratory studies on the epidemiological relations of the disease in Hungary. The first isolations of poliomyelitis virus had been reported at the Meeting of the Hungarian Microbiological Association in May 1955 by PINTÉR, ÁBRAHÁM and RÁVNAY and by the present author. The first typing experiments and some serological studies concerning the incidence of the poliomyelitis infection in different age groups were published by PINTÉR et al. [2]. The present paper deals with the isolation and typing of nine strains of poliomyelitis virus isolated in Hungary during the 1954 epidemic.*

Materials and methods

Tissue cultures. The cultures were prepared from human embryonic tissues obtained at artificial interruption of pregnancy. The best results were achieved using embryos of about 3 months of age.

The material removed at operation was put directly in Petri-dishes and used on the same day, or after storage at 4 °C for not more than 24 hours. Pieces of skin-and-muscle were selected, transferred to a watch-glass and minced with Cowper scissors, the tissue pieces thus obtained were transferred by means of a Pasteur pipette into an Erlenmeyer flask and after being washed 3 or 4 times with saline, they were stored at 4 °C until used.

In further processing, the method suggested by ENDERS et al [1], was used throughout, using bovine amniotic fluid as nutrient.

Type specific sera. Standard type specific sera were obtained by the courtesy of H. PETTE (Hamburg).

Type 1 and 3 sera were prepared also by us. In order to prepare type 1 serum, a Rhesus monkey weighing 3 kg was inoculated intramuscularly with 10^5 TCID 50 units of living type 1 virus, in the form of a lipovaccine. The total volume injected was 3 ml. Fifteen days following the inoculation, the monkey developed tetraplegia. The animal was bled by cardiac puncture.

Type 3 serum was also prepared in a monkey with lipovaccine. The vaccine contained 10^4 TCID 50 units of living type 3 virus. Two injections were given intramuscularly in an interval of a fortnight. Two weeks after the second injection the animal was bled by cardiac puncture.

* The epidemic had broken out in May, 1954, in the north-western part of the country and spread in east-east-southern direction. Later a separate centre spreading in western direction was observed in the eastern part of the country. The epidemic reached its peak in July and August but it extended even to the first months of 1955. The number of cases observed was about three times that of the previous years.

The sera prepared by us were controlled by comparing their specificity to that of the standard type sera mentioned above.

As no type 2 serum had been prepared, we used the standard type 2 serum throughout.

Our type 1 serum diluted 1 : 20 neutralized 10^4 TCID50 (tissue culture ID50) units of the homologous virus. No neutralization was observed in 1 : 5 dilution against the other two types. The type 3 immune serum in 1 : 5 dilution neutralized 10^3 TCID50 units of the homologous strain, while the other two types were not neutralized.

The type strains were kindly supplied by Dr. SVEN GARD (Stockholm) to whom we are greatly indebted. The strains originally maintained on human embryonic lung tissue in Sweden were in our laboratory stored in solid CO_2 and later transferred to human embryonic skin-muscle tissue cultures.

Results

Isolation of the strains. The isolation was attempted partly from spinal cord samples removed from fatal cases of poliomyelitis and partly from faecal samples. The cord samples were stored in a mixture of saline and glycerol at 4 °C, until used. The faecal samples were also stored at 4 °C for not more than 2 days. For the isolation experiments the cord samples were made up to 20 per cent suspensions which were centrifuged first at 3000 r. p. m., then at 8000 r. p. m. The faecal samples prepared similarly were treated with ether to avoid their eventual toxicity. After evaporation of the ether residues, 0,1 ml of the material was used as inoculum.

The eventual toxicity of the faecal material was always taken in account. Of the 18 ether-treated faecal samples 5 proved to be toxic if the suspension was used undiluted. Therefore, the inoculation of faeces was routinely made in three different dilutions *(i. e.* undiluted, in 10^{-1} and in 10^{-2} dilutions). Table I presents the scheme of registration of an isolation experiment from faeces. The cellular destruction of toxic or viral origin could easily be differentiated. Nevertheless, the destruction can only be looked upon as one due to the virus, if it is reguarly observed in at least three consecutive passages and is also neutralized by type specific immune serum.

Table I

The isolation of a poliomyelitis virus strain (M. S.) from faeces

Days of recording	Dilution of the faeces susp.					
	undiluted		10^{-1}		10^{-2}	
1	T	T	0/5	0/5	0/5	0/5
2	T	T	5/5	3/5	1/5	0/5
3	T	T	5/5	5/5	5/5	2/5
4	T	T	5/5	5/5	5/5	5/5

Explanations : T = toxic effect. The fractions present the number of explants exhibiting a cytopathogenic effect, divided by the number of explants inoculated.

Out of the 13 necropsy samples 2, out of the 17 faecal samples 7, strains were isolated.

Typing of the strains. Our strains were tested in 10^{-3} dilution against each of the three type specific immune sera. Both the type 1 and 2 sera were used in 1 : 40 dilution, while the type 3 serum was diluted only 1 : 5. The serum-virus mixtures were kept at 37 °C for one hour and then inoculated into two tissue culture tubes each. Thus, six tubes were used for the typing of each strain. The results are summarized in Table II.

Table II

Typing of the strains

Strains	Sera		
	Type 1	Type 2	Type 3
Sz. K.	positive	—	—
T. L.	—	positive	—
Sz. A.	—	positive	—
K. M.	—	positive	—
T. F.	positive	—	—
F. I.	—	positive	—
P. J.	positive	—	—
K. P.	—	positive	—
M. S.	—	positive	—

Discussion

PINTÉR et al. have isolated four type 1, five type 2 and one type 3 strains in 1954. They called attention to the relatively high incidence of the type 2 strains, as compared to the literary data [4, 5, 6]. They did not draw conclusions regarding the role of the different types in the 1954 epidemic in Hungary because of the small number of the strains isolated. As four of the five type 2 strains were isolated from children admitted within a short time to the Paediatric Department in Szeged, the authors were inclined to suppose that the relative frequency of the type 2 virus might be a local accumulation.

Our strains isolated from patients admitted from different parts of the country to the László Hospital of Infectious Diseases in Budapest were also mostly of type 2. Thus, both our data and those of the above authors greatly support the view that in the 1954 epidemic in Hungary type 2 was prevailing.

As we have pointed out in the introduction, the method of ENDERS et al. has made it possible to conduct a worldwide study of the epidemiology of poliomyelitis. The first studies of that type were published by MELNICK et al. [7]. Summarizing the data of six North-American epidemics from 1949 until 1952, he succeeded in demonstrating that each epidemic had been caused by two, but

not infrequently by all the three, types simultaneously. Of the six epidemics referred to above, five were caused mostly by the type 1, and one mostly by the type 3 virus. Similar results were obtained by SABIN [8] who on the basis of the data of the American Typing Comittee stated that most of the poliomyelitis epidemics are caused by the type 1 and a few by the type 3 virus.

Poliomyelitis epidemics caused by the type 2 virus are not frequent. An epidemic of this type was recorded in Australia (Victoria State) in 1952—1953 [9]. The retrospective serological studies made by PAUL, RIORDAN and MELNICK [10] have also revealed an epidemic caused by the type 2 virus in Alaska in the 1930-es.

In the 1954 epidemic in Hungary it was possible to isolate all the three types. The peculiarity of the epidemic was its long duration causing high morbidity rate in the winter months. (One of our strains was isolated in January, 1955.) Further studies are needed to decide whether there was any correlation between the long duration of the epidemic and the prevalence of the type 2 virus.

Summary

Nine strains of poliomyelitis virus were isolated in tissue cultures during the 1954 epidemic in Hungary. For typing of the strains isolated immune sera were prepared in monkeys. Typing was made by neutralization tests in tissue cultures. Three of our strains belonged to type 1 (Brunhilde), and six to type 2 (Lansing). From the results obtained by PINTÉR et al. and also by us, we suppose that in the 1954 epidemic in Hungary type 2 virus was prevailing.

LITERATURE

1. ENDERS, J. F., WELLER, T. H., ROBBINS, F. C.: Science **109**, 85 (1949).
2. PINTÉR, M., ÁBRAHÁM, E., RÁVNAY, M.: Acta Microbiol. Hung. **3**, 399 (1956).
3. FÖLDES, P.: Orv. Hetil. **96**, 1429 (1955).
4. The Comittee on Typing : Amer. J. Hyg. **52**, 323 (1950).
5. SYVERTON, J. T., SCHERER, W. F., ELWOOD, P. M.: J. Lab. Clin. Med. **43**, 286 (1954).
6. LÉPINE, P., BARSKI, G., ENDO, M., BLUSSON, J.: Bull. Acad. Nat. Med. **138**, 50 (1954).
7. MELNICK, J. L., PAUL, J. R., WALTON, M.: Amer. J. Publ. Health **45**, 429 (1955).
8. Poliomyelitis. W. H. O. Monogr. Ser. No **26**, 297 (1955).
9. THAYER, J. R., FERRIS, A. A.: Med. J. Austral. I, 347 (1955).
10. PAUL, J. R., RIORDAN, J. T., MELNICK, J. L.: Amer. J. Hyg. **54**, 275 (1951).

SIGNIFICANCE OF BACTERIOPHAGE IN INFANTILE ENTERIC INFECTIONS

By

M. Eörsi, L. Jablonszky, H. Milch and G. Barsy

State Institute of Hygiene and St. Stephen's Hospital, Budapest

(Received June 8, 1956)

The authors' observations during an epidemic period of infantile enteric infection in 1952, have suggested that phages may play an aetiological role in this condition. The results have been published in a previous communication [1].

Both in the previous and in the present work, parallel records of clinical and laboratory findings were compared. The present data were collected by examining the faeces of patients with and without enteritis ; in another series the faeces of infants kept in a ward with eight beds were examined almost daily. Clinical records were made of 1174 infants and altogether 5186 faecal samples from these were subjected to bacteriological and phage examination.

The present investigations were focussed on the following problems.

1. Connection between clinical and laboratory findings regarding the possible pathogenic role of bacteriophage *i. e.* the difference between groups of infants with and without enteritis as to the proportion of isolation of phage and the corresponding bacterium.
2. The influence of faecal phages on the intestinal flora.
3. Variations in the serological behaviour of bacteria exposed to phage.
4. The role of phage and bacterial variants obtained by exposure to phage.
5. The role of phage in the spread of infection.

Materials and methods

A) *Laboratory methods*

The method for *demonstrating phages* has been described in a previous paper [1]. The number of indicator strains has become greater, as at present 7 phage types of *E. coli* 111 : B4 and 4 phage types of 55 : B5 strains can be distinguished. These and other, serologically non-identified strains were used as indicators. The latter strains were isolated from the faeces of infants with enteritis and on the basis of their phage sensitivity they were supposed to be pathogenic. These cultures were selected on the one hand by taking into consideration their sensitivity to the phage isolated from the same faeces, and on the other by examining their behaviour to phages occurring in the faeces of other infants within the same community.

The different phage types of 0 : 111 and 0 : 55 strains were designated with Arabic numerals : 111/1, 111/2, 111/3, 111/4, 111/5, 111/6, 111/7 ; 55/1, 55/2, 55/3, 55/4.

O : 111 strains were typed with phages "a", "a_1", "a_2", and "b", O : 55 strains with phages "k" and "l", respectively [2]. Serologically non-identified *E. coli* strains thought to be responsible

for enteritis were designated as C/1, C/2, C/3 ... C/21 and the corresponding phages as F/1, F/2, F/3 ... F/21, respectively.

For agglutination, *E. coli* sera 111 : B4, 55 : B5, 26 : B6 ; H : 2, H : 6, H : 11, H : 12 were used. The sera were prepared and controlled by the Department of Bacteriology, State Institute of Hygiene, Budapest. Serological examination was performed by slide agglutination, the determination of H antigens being done after a passage through U-tubes.

Phage sensitivity tests were carried out with bacteria belonging to both known and unknown serological types. For determining the sensitivity to phages, *type-* and *fix*-phages were prepared in this laboratory by the method of CRAIGIE and YEN.

Type-phages served for distinguishing between strains belonging to the same, known serotype ; *fix-phages* were used to identify strains with unknown antigenic structure.

The phages were examined as to their titre, specificity, and connection to other phages which had been fixed and adapted previously.

The relationship between strains used for propagation was also considered.

Sensitivity to phages was determined by transferring bacteria from a 2-hour broth culture to agar plates and subsequently dropping phages onto the culture. Every strain was tested against all phages prepared in this laboratory. On one agar plate 12 to 16 various phages could be tested at the same time.

Sera from patients were examined by tube agglutination, the serial dilutions beginning at 1 : 50. Antigens were obtained by suspending the growth of 24-hour agar slants in saline. Control examination of the antigens was done in 0,85, 2,5, and 5,0 per cent NaCl. Readings were made after incubation of 2 and 20 hours at 37 °C.

Antibodies against bacteriophage were detected in various dilutions of the serum to be examined, to which the minimum dilution of phage not giving confluent lysis had been added. Sera were examined in twofold serial dilutions beginning at 1 : 5. The mixture of serum and phage dilutions was incubated for 1½ hours at 37 °C, then left to stand in the refrigerator at 4 °C for another 1½ hours. Phage action on bacteria was demonstrated by the technique described above. In the readings, the maximum dilution of serum inhibiting lytic activity to about 90 per cent was considered. Sera of normal individuals and of rabbits immunized with the corresponding phage served as controls.

Preparation of antibacteriophage immune sera. Rabbits were injected at three-day intervals with subsequent doses of 0,3, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 ml of phage that gave confluent lysis. 3 or 4 days after the last injection the blood of the rabbits was tested for antiphage titre and specificity. Bleeding of the animals was performed within a week. As a preservative, phenol (0,5%) was added to the sera.

Variation of bacteria after exposure to phage was investigated by treating susceptible bacteria with the corresponding phage *in vitro*.

To 5,0 ml of a phage diluted 1 : 10 1 or 2 drops of a 2-hour broth culture of the bacterium was added. In the experiments phages giving confluent lysis were used and dilutions were made with yeast extract broth. The cultures were incubated at 37 °C for 20 hours, then washed twice in saline. After washing the sediment was streaked on agar plates.

After such treatment the bacteria were examined for agglutinability not only with diagnostic *E. coli* sera but also with antiphage sera.[1]

The change in phage sensitivity of the treated strains was also examined.

Both agglutinability and phage-sensitivity were determined again after subculturing and storing the strain.

B) *Individual analysis of the cases*

The detailed analysis of microbiological and clinical findings regarding the individual cases was considered to be very important. The way to be followed was often shown by the connection between these data. Serological changes shown by patients due to bacterial variations could also be followed this way.

C) *Statistical methods*

For evaluating the connection between clinical and laboratory findings the method of the

[1] The difference in agglutinability between the treated and untreated strain indicates some changes in antigenic structure. The variations have not been analysed in detail, the antigens not being considered in cross-absorption tests.

2×2 contingency tables was applied. For estimating the degree of association, YULE's coefficient of association was used [3].

$$q = \frac{(AB)(\alpha\beta) - (A\beta)(\alpha B)}{(AB)(\alpha\beta) + (A\beta)(\alpha B)}$$

Significance was estimated by the χ square test, using the tables of FISCHER and YATES [4].

Results

A) *Results of statistical evaluation*

Tables I and II summarize the results of examination of 1663 faecal samples from 737 patients who were under hospital treatment in 1952 [5]. It should be noted that these data were confirmed by subsequent investigations in the following years.

Table I

Frequency distribution of infants with and without enteritis, according to faecal examinations

Result of faecal examination for		Number of patients		Percentage of patients		Ccefficient of association q	Values of	
phages	bacteria	with enteritis	without enteritis	with enteritis	without enteritis		χ^2	p (%)
negative	negative	202	146	39,4	65,2	— 0,48	12,9	< 0,1
negative	positive	62	23	*12,1*	*10,3*	0,09	0,3	> *50,0*
positive	negative	156	40	30,4	17,9	0,33	12,0	< 0,1
heterologous pos. ..	positive	58	14	11,3	6,2	0,31	4,0	< 5,0
homologous pos. ..	positive	35	1	6,8	0,4	0,88	12,3	< 0,1
Total		513	224	100,0	100,0	—	—	—
Positive for both bacteria and phages		93	15	18,1	6,6	0,51	15,4	< 0,1
Positive only bacteriologically		155	38	30,2	16,9	0,36	13,5	< 0,1
Positive only for phage		249	55	48,5	24,5	0,49	36,1	< 0,1

Table I shows that of the infants 513 had enteric infection, the remaining 224 suffered from other disease. In the left side columns of Table I the results of faecal examinations are shown. Positive bacteriological examination means in most of the cases that *E. coli* 111 : B4 or 55 : B5 was cultured from the faeces. Some of the stools were positive for *Shigella flexneri* or *sonnei*. For a bacterium strain a phage was regarded homologous if it had been isolated from the same faeces and had a lytic activity on that strain. The phage was called heterologous if it had a lytic action on one of the indicator strains, but no sensitive bacteria could be shown in the faeces it had been isolated from.

From Table I the following facts have to be pointed out.

a) In the group of patients with enteric infection the number of negative laboratory findings was significantly smaller than that in the group without enteritis.

b) There was no important difference between the two groups as to the proportion of patients with positive bacteriological and negative phage examination.

c) The proportion of patients positive only for phage was significantly higher in the enteric group.

d) A considerable difference existed between the two examination groups as regards the number of faeces positive for both phage and identified bacteria. There was an even greater difference when considering the faeces positive for bacteria and the homologous phage.

It should be noted that patients were examined on more than one occasion. So in Table I the patients were included according to positive findings. In the following case the patient was included in the group positive by both bacteriological and phage examination.

1st examination : faeces positive only bacteriologically,

2nd examination : faeces positive for phage and identified bacteria,

3rd examination : faeces negative (for both).

In Table II the result of examination of patients with enteritis is presented, detailing whether the faecal sample was taken before, during, or after the manifestation of symptoms.

Table II

Examination of infants with enteritis, according to the clinical course of the disease

Result of faecal examination for		Number of examinations			Percentage of examinations		
phages	bacteria	Before	During	After	Before	During	After
		Manifest symptoms					
negative	negative	136	484	416	64	60	65
negative	positive	16	91	63	7	11[1]	10[1]
positive	negative	50	172	136	23	22	21
positive	positive	12	59	28	6	7[2]	4[2]
Total		214	806	643	100	100	100
Positive only bacteriologically		28	150	91	13	18[3]	14
Positive only for phage ...		62	231	164	29	29	25

	χ^2	p(%)
[1]	0,69	> 30
[2]	5,1	< 5
[3]	4,8	< 5

According to the statistical evaluation of Table II, it is clear that the total number of faeces bacteriologically positive was significantly greater during the symptoms than after them. The difference is even more remarkable in the group of faeces positive for both serologically identified bacteria and phage. After the symptoms had disappeared, the number of bacteriologically positive findings showed a non-significant decrease only.

B) *Results of microbiological examinations*

1. *Studies on the in vivo influence of phages on bacteria*

At the beginning of the investigations the isolated strains were identified only serologically. Later on the strains were examined with the phages prepared in the laboratory [6].

A number of strains were isolated which showed sensitivity to type phages 111 or 55 but did not agglutinate in sera 111 : B4 or 55 : B5. By the daily examination of the faecal samples the following observations were recorded.

At the first examination *E. coli* 111 : B4 or 55 : B5 was cultured from the faeces. The subsequent examinations yielded *E. coli* strains inagglutinable in the corresponding OB serum, but sensitive to type phages 111 or 55. In most of these cases phages lysing *E. coli* 111 : B4 or 55 : B5 strains were found in the previously examined faeces or in the same sample from which the inagglutinable strain had been cultured. The phage-sensitivity of *E. coli* 111 : B4 or 55 : B5 and of the corresponding inagglutinable strains were not perfectly identical ; nevertheless, the difference was found to be within the type phages. Other examinations showed an inverse phenomenon, *viz.* the inagglutinable, phage-sensitive strain had been isolated before *E. coli* 111 : B4 or 55 : B5 appeared in the faeces.

The variation of certain, serologically non-identified *E. coli* strains was also observed. These strains were supposed to be pathogenic on the basis of phage examinations. In subsequent isolations they showed changes in their behaviour towards fix phages and towards the corresponding antiphages [7]. According to recent investigations, some of the *E. coli* strains designated as C/1 . . . C/21 are each other's variants. (These strains had been isolated and designated in the order of isolations before type- and fix-phages were obtained. At the time of the isolation of strain C/X no 55 type phages were available, therefore this strain could then not be classified as belonging to phage-type 55. Strain 111/4, however, could immediately be identified with the available phage as belonging to phage-type 111 of *E. coli*).

The investigations have shown that the intestinal flora of infants who are being treated at the same time, in the same ward, is fairly homogeneous. In the

same period the majority of the faecal samples contains bacterium or phage strains identical in sensitivity or in lytic action. In a certain time, however, their faeces contain a new microflora, different from the previous one.

It was observed as early as in the summer and autumn of 1951 that infants harbouring F/X (a phage for the serologically non-identified *E. coli* strain C/X) in their intestinal flora, at subsequent examinations excreted *E. coli* 55 : B5 bacteria. It was found that phage "k" (a type phage for 55 : B5 strains) had a lytic action on strain C/X. This observation suggests that a connection exists between 55 : B5 and F/X.

In studying an outbreak of infantile enteritis in 1953, the following results were obtained. *E. coli* 55 : B5 was cultured from the faeces of 32 infants during the outbreak, while in the post-epidemic period only 24 infants were found to excrete this organism.

During the outbreak 5 infants excreted F/X and on subsequent examinations *E. coli* 55 : B5. On the contrary, 8 patients excreted 55 : B5 first and F/X later. From the faeces of 4 patients 55 : B5 and F/X were alternately isolated. One infant who had no enteritis was found positive for 55 : B5 at the first examination and for F/X at the second. In the post-epidemic period, one infant with enteritis excreted F/X at the first examination and 55 : B5 at the subsequent examination [8].

Based on these observations, it is suggested that bacterial variation due to phages may exist *in vivo*, it being well-known that there is a possibility of bringing about bacterial variants *in vitro* by exposure to phages.

The role of bacteriophage in *in vivo* bacterial variations has been confirmed by further observations. Of serially examined infants, 14 proved to be excreting *E. coli* 111 : B4 [9]. The infants were generally found to be positive on 2 to 7 occasions. From one of them 111 : B4 was isolated ten times, while from another only once. Of the positive faeces, 4 contained homologous phage. The subsequently isolated 111 : B4 strains found in faeces negative for phage proved to be similar in sensitivity to both phages and antibiotics. In three cases 111 : B4 strains isolated from faecal samples positive for phage differed from each other at the repeated isolations. In the remaining one phage-positive case, however, the repeatedly isolated 111 : B4 strains behaved in a similar way. In two of the former three cases the strains isolated before and after the appearance of phage differed both in antigenic structure and phage-sensitivity. In one case the variation was limited only to alteration in phage-sensitivity and, at the next isolation, in antibiotic-sensitivity.

2. *Exposure of bacteria to phages in vitro*

The supposed bacterial variations taking place in the intestinal tract were attempted to be brought about *in vitro* [7].

Table III

In vitro variation of E. coli 111 : B4 strains, after exposure to phage

	Designation of strains				
	Unexposed 111/1	Exposed 111/1—a/1	Unexposed 111/4	Exposed 111/4—a/1	Exposed 111/4—k
Antigenic structure	111 : B4 : -	?	Not related to Escherichia O groups 1 to 111	O : 111 b_1 (O : 19) [B4] Unilaterally related to strain C/X	O : 111a, b B4
Agglutinability					
in serum 111 : B4	+	—	—	+	+
in antiphage serum a/1	—	+	+	—	—
in antiphage serum k	—	—	+	—	—
Phage sensitivity					
to phage F/a/1	CL	—	—	—	—
to phage F/k	—	—	few plaques	—	—

Key : 111/1 — a/1 = strain 111 : B4 exposed to phage F/a/1
111/4 — a/1 = strain 111/4 exposed to phage F/a/1
111/4 — k = strain 111/4 exposed to phage F/k
CL = confluent lysis

Table IV

In vitro variation of E. coli 55 : B5 strains after exposure to phage

	Designation of strains			
	Unexposed 55/3	Exposed 55/3—x	Unexposed C/X	Exposed C/X—X
Antigenic structure	55 : B5 : 6	Escherichia O : 4 Related to S. flexneri VIII_3* and strain C/X	?	55 : B5 Unilaterally related to strain C/X
Agglutinability				
in serum 55 : B5	+	—	—	+
in antiphage serum X	—	+	+	—
Phage-sensitivity				
to phage F/X	—	—	CL	—

Key : 55/3 — X = strain 55 : B5 : 6 exposed to phage F/X
C/X — X = strain C/X exposed to phage F/X
CL = confluent lysis
* Designated according to *Rauss'* antigenic schema.

Table V

In vitro variation of E. coli strains of unknown serotype exposed to phage

	Designation of strain			
	Unexposed C/7	Exposed C/7—7	Unexposed C/10	Exposed C/10—10
Agglutinability				
in antiphage serum 7	—	—	—	+
in antiphage serum 10	—	+	—	+
Phage-sensitivity				
to phage F/7	CL	—	CL	few plaques
to phage F/10	CL	—	sCL	—

Key: C/7—7 = strain C/7 exposed to phage F/7; C/10—10 = strain C/10 exposed to phage F/10; CL = confluent lysis; sCL = semi-confluent lysis.

Taking into consideration the laboratory findings, strains were selected which were supposed to produce variants easily.

Tables III, IV, V show the antigenic structure, agglutinability, and phage sensitivity of such strains, before and after exposure to phages.[2]

From the Tables it can be concluded that bacteria exposed to phages undergo radical variations.

Table III shows that the original *E. coli* 111:B4-strain treated with phage "a_1" produces a variant no more agglutinable in serum 111 : B4 and no more sensitive to phage "a_1". The strain, however, becomes agglutinable in antiphage serum "a_1". *E. coli* 111/4 (an undescribed serotype) after treatment with phages "a_1" and "k" becomes agglutinable in serum 111 : B4 and, according to the O antigen determination, the new variant actually belongs to the antigenic group O : 111. The strain loses its agglutinability in antiphage sera "a_1" and "k", and acquires resistance to phage "k".

Table IV shows the behaviour of strain 55/3 (55 : B5 : 6) after exposure to phage "X". The strain loses its agglutinability in serum 55 : B5, but becomes agglutinable in antiphage serum "X". The new variant belongs to another *E. coli* O antigen group. Strain C/X (an undescribed *E. coli* serotype), after treatment with phage "X" will agglutinate in serum 55 : B5 and will belong to O group 55. The new variant is not any more agglutinable in antiphage serum "X", but is resistant to phage "X".

Table V shows the changes produced in two *E. coli* strains of unknown serotype.

[2] The authors are indebted to Professor K. RAUSS for the antigenic analysis of these strains.

It should be noted that the mechanism of agglutination of bacteria by antiphage sera is yet unsolved.

3. *Examination of sera from patients*

A group of infants suffering from enteritis was examined for antibodies against bacteria and phages [6].

It should be emphasized that, although the number of examinations presented here is relatively small, the results call for further investigations.

The infants' faeces were examined daily during the manifestation of enteritis, while blood samples were taken 6 to 8 weeks after recovery. All in all, 23 patients were examined in two groups.

1. 12 of the sera were taken from infants whose faeces had proved to contain phage. Only 7 out of the 12 sera were examined for the capacity to neutralize phage activity.

2. 11 sera were obtained from infants whose faeces had contained serologically identified bacteria but no phage. 4 of these sera were subjected to neutralization test.

For agglutination, the following *E. coli* strains were used as antigens. 1. Serologically identified strains ; 2. strains which could not be identified with the available diagnostic sera, but could be classified as members of certain phage types ; 3. strains which had been exposed to type or fix-phages *in vitro*.

For neutralization tests in group 1, type- and fix-phages corresponding to phages isolated from the faeces were used. For testing the sera in group 2, phages were selected that were thought to play part in the supposed development of pathogenic bacteria.

Because of the small number of infants examined, the results are only briefly summarized, as follows.

10 out of the 12 sera in group 1 contained antibodies for bacteria. Six sera agglutinated only those strains that had been exposed to phage *in vitro*. No sera contained agglutinins against bacteria of known serotype, although four of them belonged to patients previously positive for *E. coli* 111 : B4. Of the 7 sera examined for phage inactivation, 4 contained neutralizing antibodies.

Of the sera examined in group 2, 4 gave a positive agglutination. 3 of them agglutinated only untreated bacteria of unidentified serotype. The remaining serum agglutinated a non-identified *E. coli* strain, which had been exposed to phage. Phage neutralizing antibodies could not be shown in any of group 2 sera.

In one of the infants, nine subsequent faecal examinations yielded neither *E. coli* 111 : B4 nor 55 : B5 bacteria. The faeces, however, contained a phage acting on *E. coli* 55 : B5.

From Table VI it is evident that the infant's serum did not contain antibodies agglutinating *E. coli* 55 : B5 : 6 at a dilution of 1 : 50 or higher.

Table VI

a) *Showing agglutinins in infant K. D.'s serum*

Antigen	Serum dilutions		
	1 : 50	1 : 100	1 : 200
E. coli 55 : B5 : 6	—	—	—
E. coli 55 : B5 : 6 — F/k*	+++	++	±

*Strain 55 : B5 : 6 after exposure to phage F/k.

b) *Showing phage-neutralizing antibodies in infant K. D.'s serum*

	Result of phage action on E. coli 55 : B5 : 6
F/k + NaCl	CL
F/k + normal rabbit's serum	CL
F/k + reconvalescent patient's serum ...	few plaques

Key : CL = confluent lysis.

The same strain, however, after it had been exposed to phage "k", became agglutinable in the same serum even at a 1/200 dilution. The serum neutralized phage "k" at the dilution of 1 : 10.

C) *Results of epidemiological studies*

The role of bacteriophage in the spread of infection was suspected as early as 1952.

Table VII

The spread of E. coli 111 : B4 or 55 : B5 and the homologous or heterologous phages

Positive faecal examination	Number of infants		
	examined	causing further infection	infected
E. coli 111 : B4 or 55 : B5	9	1	1
E. coli 111 : B4 or 55 : B5 plus phage .	4	4	20
Phage	15	9	63

Table VII shows the observations as to the spread of *E. coli* 111 : B4, 55 : B5 and heterologous phages. These data were obtained from serial examination of infants treated in the same ward. 9 of the infants proved to harbour *E. coli* bacteria known to be associated with infantile enteritis. None of these infants were found to be positive for phages. Spreading of infection to another infant was observed only in one case.

The faeces of 4 infants contained not only *E. coli* 111 : B4 or 55 : B5, but also phage. All the four cases caused further infections, in altogether 20 infants. Among the four cases an infection due to *E. coli* 111 : B4 occurred. During the spread of this infection, both *E. coli* 111 : B4 and the homologous phage were isolated from the furniture of the ward.

15 infants were positive only for phages. It is remarkable that 9 of them caused further infections [8].

A regularity can also be observed as to the spread of other phages acting on serologically non-identified *E. coli* strains. This is shown by the fact that the wide spread of each phage was observed in certain definite periods. The observations are well illustrated by tracing the spread of phage F/9. This phage was isolated from 18 cases of infantile enteritis in 16 days [10].

Table VIII

Spread of phage F/9 in a hospital ward, May 1953

Days	Designation of beds												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
May 5		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	111/1
6		φ	—	—	φ	φ	—	—	φ	111/1	—	—	—
7		φ	[9]	[9]	[9]	—		—	—	—		—	—
8		—		—	—	—		—	—	—	·	—	—
9		—		—	φ	φ		—	φ	—	111/2	φ	—
11		—		·	—		—	—	·	—	φ	—	φ
12	—	—		·	[9]		[9]	—	·	[9]	—	—	[9]
13	—	φ		·	[9]		[9]	—	·	[9]	—	—	—
14	—	[9]		·		—	—	·	·	[9]	—	—	[9] 111/1
15	[9]	φ		·	—	—	—		·	[9]	[9]	—	[9]
18	[9]	[9]	—	·	[9]	—	—		[9]	[9]	[9]	—	[9]
19	[9]	[9]	[9]	·	[9]	—		—	—	[9]	—	—	[9]
20	[9]	[9]	[9]	·	[9]	[9]		φ	[9]	[9]	—	[9]	[9]

Key : ⌐ = infant admitted ; ⌙ = infant discharged

Faecal examinations : [9] = phage F/9 lysing *E. coli* C/9; φ = phage lysing other *E. coli* strains ; 111/1 = *E. coli* 111 : B4 :— ; 111/2 = *E. coli* 111 : B4 : 2 ; — = negative examination ; · = no examination performed.

Table VIII shows the result of faecal examinations in a ward with 13 beds. Within the period from May 5 to May 20, 1953, the fast spread of F/9 was ob-

served. It should be noted that during this period the sporadic occurrence of *E. coli* 111 : B4 without phage was noted, but this infection did not spread to other infants.

Discussion

From the statistical evaluation of the present investigations it can be concluded that there was no correlation between the frequency of findings positive for *E. coli* 111 : B4 or 55 : B5 and the frequency of enteric infections. The same results were obtained by the authors in 1953, when 1161 faecal samples from 115 patients were examined. Likewise RUDNAI and MIHÁLYFI [11] showed that in nurseries the occurrence of *E. coli* serotypes associated with infantile enteritis was found to be nearly as frequent among healthy infants as among infants with enteritis.

The fact that some pathogenic organism does not cause infection on every occasion has been a problem since the early days of bacteriology. There is no doubt that factors such as temporary immunity, disposition and condition of the macro-organism, certainly play a part in the resistance to infectious diseases. On the other hand, bacteria thought to be pathogenic simply cannot be regarded as always capable of causing disease by themselves. Nor can they alone determine the clinical course of the disease.

From the present investigations we have concluded that, in addition to bacteria, bacteriophages are the factor responsible for infections of infantile enteritis.

NETER's examinations [12] suggest the same conclusions, *i. e.* that phages play an important aetiological role in that disease.

According to the present investigations, in infantile enteritis the simple detection of pathogenic bacteria is not satisfactory, as the presence of these bacteria does not actually necessitate that they will give rise to pathological disturbances.

Summarizing the statistical evidence of the present investigations, the following conclusions can be drawn.

1. The proportion of laboratory findings positive for heterologous phage is significantly higher in the group of patients with enteric infection than in the group without enteritis.

2. An even greater difference exists between the two groups as to the positive findings for both serologically identified bacteria and homologous phage.

3. The proportion of positive findings for both phage and bacteria is significantly higher during the time there are manifest symptoms than after that. The same is not true for cases positive only bacteriologically.

The results of these investigations are closely connected with each other and are in accordance with the authors' hypothesis that phages cause the libe-

ration of endotoxins responsible for the clinical symptoms and for developing a severer type of the disease. The comparison of the statistical data with the clinical course of the disease makes it possible to reach further conclusions.

It is common that infants exposed to any unusual change should react with diarrhoea. Both pathogenic organisms and those that appear to be non-pathogenic may exert some influence on the human body. In most cases the infection with one of these bacteria produces a reaction of lesser importance. It is not impossible that in response to this stimulus the infants acquire some immunity.

A severer reaction may be induced by exposing the organism simultaneously to several effects ; such as the transforming effect of faecal phages on bacteria, when at the same time endotoxins are liberated.

According to the statistical evaluation, the number of phage positive faeces is significantly larger in enteric infections than in other diseases. The presence of phage means the development of a new bacterial flora, which will be resistant to the same phage. It should be noted that in the few fatal cases the isolated phages had a lytic action on all the indicator strains. In the latter instance death ensued with great rapidity and was probably due to endotoxins liberated by the polyvalent phage.

The proportion of faeces positive both for phage and serologically identified bacteria shows a striking difference between the two examination groups. In these cases the infants probably develop a severe attack of enteritis caused by bacteria and the liberated endotoxins. The combined effect of bacteria and phages is confirmed by the fact that after the symptoms have disappeared the findings are almost invariably negative for both phage and bacterium.

Thus the statistical evidence is in accordance with the conclusion that the bacteriophage is the factor either directly or indirectly responsible for the clinical manifestations of the disease.

The use of type-phages has made it possible to subdivide the *E. coli* antigenic types into sub-types.

Type and fixed phages allowed an extensive analysis of the faecal flora. The results of these investigations have shown that the *in vivo* variation of bacteria is a factor not to be neglected.

Variation of bacteria by exposure to phages has been studied by numerous authors [13, 14]. Most of them have emphasized that such variations occur in the body but rarely, therefore are of little importance. For many years in this laboratory we have been phage-typing *Salmonella typhi* strains that had repeatedly been isolated from typhoid carriers all over the country. The records show that variation in the phage type of subsequently isolated strains occurred very rarely [15].

In the faeces of infants with enteritis, however, bacteriophage can be shown to be present in a high percentage.

The daily examination of faecal samples from these infants showed regular

variations in the agglutinability and phage-sensitivity of the isolated bacteria after the homologous phage had appeared. These facts call the attention to the importance of phage. The bacterial variants brought about by phages may also be responsible for the disease.

New points of view have been opened by following the bacterial variations with the aid of phages. There is no reliable interpretation of the fact that antibodies rarely, if ever, occur in the blood of infants with enteritis. By examining sera from recovered infants whose faecal examination had shown the presence of pathogenic microorganisms, it has been observed that antibodies seem to be produced against the new bacterial variant and, also, against the phage. It should be noted that only a small number of such examinations has so far been made, and further observations are required to clear the problem.

The present investigations as to the spread of the infection also confirm our previous hypothesis. The transmission of infection from one infant to others did not occur if the infant was harbouring only serologically identified *E. coli* strains, but no phage. On the contrary, further infections were observed if an infant's faeces were found to be positive also for phage. Isolation of the pathogenic bacterium *(E. coli* 111 : B4) from the furniture of the ward was succesful only in the latter cases.

Further investigations are required to throw light on the mode of spread. NETER and SHUMWAY [16], LAURELL et al. [17], BRAUN and HENCKEL [18], VÉGHELYI et al. [19], FARKAS and SZÉCSEY [20] and the present authors showed that the same serotype of *E. coli* can often be isolated from the faeces and from the throat at the same time. From our recent investigations lysogenic strains or latent phages liberated from them seem to be responsible for the transmission of the disease. The nature of the spreading of phage strongly suggests the possibility of droplet infection.

The results of the present work show new clinical and microbiological aspects for studying infantile enteric infections.

As bacteriophage and bacterial variants brought about by them undoubtedly play a part in the aetiology of enteric infections, for the sake of successful therapy and prophylaxis further investigations should be made in this direction.

Acknowledgements

The authors are indebted to DR. J. LUKÁCS, physician-in-chief of the Department of Paediatrics, St. Stephen's Hospital, for his valuable collaboration, and also to F. BUNTH, M. FERENCZI and I. VARGHA for the technical assistance.

Summary

5186 faecal samples from 1174 infants with enteritis have been subjected to bacteriological and phage examination. From the results some conclusions of interest have been drawn, as follows.

1. Bacteria associated with infantile enteritis are not capable of causing disease by themselves. Another factor, the bacteriophage is also necessary.

2. The phage may act by liberating endotoxins from bacteria and, on the other hand, by inducing variations in the bacteria. Against these new bacteria the infant may have no immunity. The direct and indirect roles of phage have been confirmed by a few phage-neutralization tests. Bacterial variations due to phage were reproduced *in vitro*.

3. Spread of the infection was observed only when phage could be isolated from one of the infants, and it might be due to lysogenic bacteria or latent phages liberated from them. In this case the phage could mostly be isolated from the throat.

LITERATURE

1. Eörsi, M., Jablonszky, L., B. Milch, H.: Népegészségügy **8**, 220 (1953); Acta Microbiol. Hung. **1**, 1 (1954).
2. Eörsi, M., B. Milch, H.: (Unpublished) Meeting of the Enteric Section of the Hungarian Academy of Sciences. November, 1953.
3. Yule, U.: Phil. Trans. Roy. Soc. London, *A*. **194**, 272 (1900).
4. Fisher, R. A., Yates, F.: Statistical Tables. London (1948).
5. Eörsi, M., Jablonszky, L., B. Milch, H., Barsy, G.: (Unpublished) Meeting of the Enteric Section of the Hungarian Academy of Sciences. November, 1953.
6. Eörsi, M., Jablonszky, L., B. Milch, H.: (Unpublished) Meeting of the Enteric Section of the Hungarian Academy of Sciences. November, 1954.
7. Eörsi, M., B. Milch, H.: (Unpublished) Presented at the Meeting of Enteric Section of the Hungarian Academy of Sciences. November, 1954.
8. Eörsi, M., Jablonszky, L., B. Milch, H.: (Unpublished) Presented at the Meeting of Enteric Section of the Hungarian Academy of Sciences. December, 1955.
9. Eörsi, M., B. Milch, H.: (Unpublished) Presented at the Meeting of Enteric Section of the Hungarian Academy of Sciences. November, 1953.
10. Eörsi, M., Jablonszky, L., B. Milch, H., Barsy, G.: (Unpublished) Presented at the Meeting of Enteric Section of the Hungarian Academy of Sciences. November, 1953.
11. Rudnai, O., Mihályfi, I.: Orv. Hetil. **47**, 1303 (1955).
12. Neter, E., Korns, R. F., Trussel, R. E.: Pediatrics **12**, 377 (1953).
13. Lennox, E. S.: Virology **1**, 190 (1955).
14. Zinder, N. D., Lederberg, J.: J. Bact. **64**, 679 (1952).
15. Eörsi, M.: Acta Microbiol. Hung. **3**, 285 (1956).
16. Neter, E., Shumway, C. N.: Proc. Soc. Exp. Biol. **75**, 504 (1950).
17. Laurell, G., Magnusson, J. H., Frisell, E., Werner, B.: Acta Paed. **40**, 302 (1951).
18. Braun, O. H., Henckel, H.: Zschr. Kinderheilk. **70**, 275 (1952).
19. Véghelyi, P. et al.: Gyermekgyógy. **4**, 97 (1953).
20. Farkas, G., Szécsey, G.: Orv. Hetil. **21**, 581 (1955).

INVESTIGATIONS INTO THE ANTIGENIC COMPOSITION OF THE SALMONELLA GROUP

By

G. TOLNAI

State Institute of Hygiene, Budapest

(Received, June 12, 1956)

It has been known for long that the bacterial cell contains more than one antigen. GRUBER and DURHAM [5] were the first to demonstrate that bacteria could be differentiated from one another by means of the agglutination test. Starting out from this observation, DURHAM [2] developed his theory of the mosaic pattern of bacterial antigens. Later, in studies on the antigenic structure of bacteria belonging to the Salmonella group, WHITE, and still later KAUFFMANN [9] made use of the agglutination and agglutinin absorption tests to demonstrate in the mosaic various components, which facilitate distinction to be made between, and identification of, the single members of the Salmonella group. There are at present 144 types known to belong to this group by virtue of their somatic and flagellar antigens and this number is steadily increasing as new and new bacteria are described to possess such properties which justify their inclusion in this group. In studies on the chemical structure of somatic antigens, MORGAN [13, 14], then MORGAN and PARTRIDGE [15, 16] pointed out that, from the components of somatic antigens determining the serologic type, the polysaccharide is responsible for the specificity, whereas the protein component is common to all members of the Salmonella and Shigella groups.

FREEMAN was the first to study the carbohydrate composition of the hydrolysed polysaccharide of *S. typhi* [4] and found that it was built up of d-glucose, d-mannose and d-galactose. JOKOYAMA [7] added rhamnose to the list.

The adoption of paper chromatography to this type of work has marked the onset of new, vigorous attempts at the full elucidation of the problem. WESTPHAL et al. [10, 27] have examined the carbohydrate pattern of a few hydrolysates prepared from Salmonellae by the phenol extraction method described by them. The above mentioned simple sugars were demonstrated by WESTPHAL et al., too. However, they isolated also such desoxy-sugars, which had not been known to occur in nature elsewhere: methyl-aldose-pentoses were isolated from *S. typhi* and *S. abortus equi*, respectively. PON and STAUB [20] corroborated the findings of WESTPHAL et al.

The investigations described in this paper were aimed at the elucidation of the following problems.

a) By means of serological methods, MORGAN and PARTRIDGE showed that the protein component was common to all extracts prepared from strains of the Salmonella group. We wished to establish whether this identity would manifest itself also in the amino acid composition of the protein component of extracts.

b) Attempts have been made to determine eventual differences, qualitative and/or quantitative, in the polysaccharide spectrum of single strains belonging to different groups of the KAUFFMANN—WHITE classification.

c) Acetone-dried bacterial powder prepared from cultures of strain Ty_2 of *S. typhi*, and the BOIVIN extract derived from it have been examined comparatively for amino acid and carbohydrate composition.

Materials and methods

Bacterium strains. These were the representants of the various groups of the KAUFFMANN—WHITE scheme :

Group A : *S. paty A*
« B : *S. paty B., S. typhimurium, S. abortus equi*
« C : *S. kunzendorf, S. bareilly*
« D : *S. typhi* O 901, H 901, Ty_2, Vi 965, *S. enteritidis*
« E : *S. anatum, S. meleagridis*

From other groups: *S. veneziana, S. minnesota, S. coli* (Vi)

Cultivation, media. The methods employed were those already described [29].

Preparation of extracts. The BOIVIN extract was prepared according to KABAT and MEYER[8] from acetone-dried bacteria grown in dialysed medium. After three extractions all the supernatants were pooled, then dialysed against running water for 48 hours at room temperature, then against distilled water for 24 hours under refrigeration, and dried at room temperature.

Paper chromatography. Using Schleicher- and Schüll paper 2043/a, both the descending [1] and the ascending [28] methods were carried out. For determining the amino acid content of extracts, the solids obtained by drying were hydrolysed in 20 per cent hydrochloric acid at 160 °C for 16 hours, neutralised with freshly prepared silver oxide, dried *in vacuo* and the solids were taken up in distilled water, in the desired volume [23]. In a total volume of 0,02 ml 4000 micrograms were dripped on the paper. To demonstrate carbohydrates the extracts were dissolved in normal sulphuric acid to make a concentration of 20 mg/ml and the solution was hydrolysed at 100 °C for 6 hours. After neutralisation with barium chloride the vacuum-dried material was dripped on the paper in volumes of distilled water specified in the experimental section.

Solvents. In studies on amino acids, the solvent used in ascending paper chromatography was the mixture of butanol—glacial acetic acid—water recommanded by PARTRIDGE [17], while with the descending method phenol buffered at pH 1 and 12, and butanol buffered at pH 2 were used [11]. In the case of carbohydrates pyridin : butanol : water (2 : 3 : 1,5) was used with both methods [30].

For developing amino acids 0,2 per cent ninhydrine in butanol saturated with water [17], for the demonstration of carbohydrates, aniline-hydrogen-phthalate [18], and for the detection of glucosamine, a basic triphenyltetrazolium chloride (TTC), [26] were used.

The chromatograms were run at 20 $\pm$ 2 °C for 30 hours.

Nitrogen was determined by the KJELDAHL method. Polysaccharide was estimated by the MOLISCH—UDRÁNSZKY method, as modified by SZÁRA [24], using the alpha naphthol potassium sulfonate reagent.

Results

Amino acid composition

In the BOIVIN extract of the Salmonellae tested the total nitrogen varied from 2 to 3 per cent. For this reason aliquots with the same solid content were hydrolysed. The amino acids appearing in the hydrolysed BOIVIN extracts of

the 16 bacteria tested and in the hydrolysate of the Ty_2 bacterial powder are presented in Fig. 1/a and Fig. 1/b, respectively. In tests made in different solvents by the descending and ascending methods it was ascertained that the BOIVIN extract of different members of the Salmonella group produced qualitatively identical but quantitatively different amino acid spots. The descending chromatography in butanol buffered at pH 2 showed good separation. Except

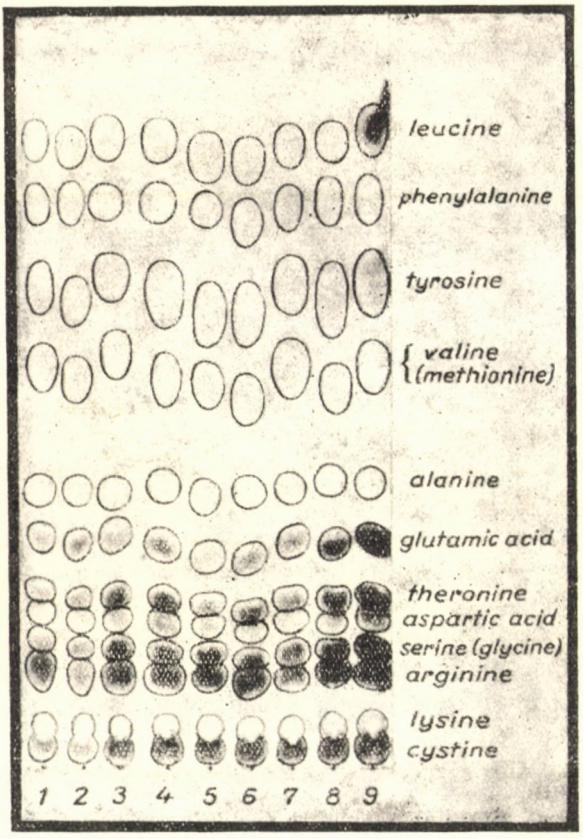


Fig. 1a. The amino acid spectrum of hydrochloric acid hydrolysates of different Salmonella strains. Solvent: butanol buffered at pH 2. Descending method

for the proline spot of *S. coli*, the same amino acids appeared in the hydrolysates. These were identified by running single hydrolysates with known amino acids and comparing the R_f values for the spots that appeared. It is noteworthy that the Ty_2 bacterial powder and the trichloracetic acid extract prepared from it showed the same amino acid composition.

In view of the fact that in tests with different solvents of different pH the hydrochloric acid hydrolysates of the extracts contained identical amino acids, it

seems probable that the protein fraction of these hydrolysates is composed of the same amino acids.

Carbohydrate composition

According to the data in Table I, the polysaccharide content of the BOIVIN extracts prepared from the strains tested varied from 10,2 to 34,8 mg per 100 g.

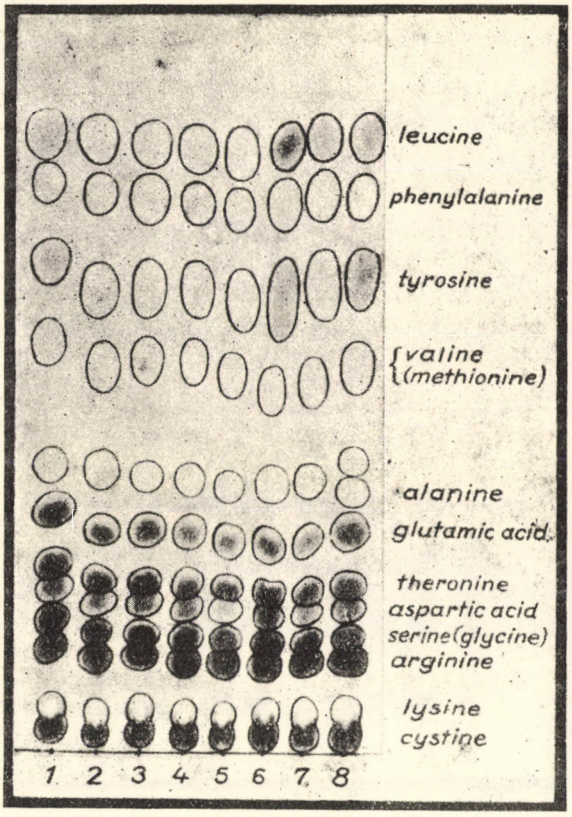


Fig. 1b. The amino acid spectrum of hydrochloric acid hydrolysates of different Salmonella strains. Solvent: butanol buffered at pH 2. Descending method

For this reason the investigations have been conducted in two directions. In one case the hydrolysates of extracts identical in solid content were examined, and in the other case the extracts were hydrolysed, adjusted to an equal carbohydrate concentration and were examined in this way.

In order to determine the adequate concentration for the demonstration of all the simple sugars present, 0,02 ml aliquots were dripped onto the chromato-

graphic paper from each of 3 hydrolysed extracts of a 20 mg/ml or 40 mg/ml concentration. The lower concentration proved also sufficient for the detection of all the simple sugars present.

Table I

Carbohydrate content of Salmonella strains
(Caclculated in dextrose. MOLISCH—UDRÁNSZKY reaction, as modified by SZÁRA)

S. typhi Ty_2 baci	12,8 mg/%
S. typhi Vi 965	16,4 «
S. typhi Ty_2 endo	20,0 «
S. typhi H 901	25,2 «
S. typhi O 901	24,2 «
S. enteritidis	21,2 «
S. minnesota	22,8 «
S. coli	34,8 «
S. paty A	17,4 «
S. paty B	10,2 «
S. typhimurium	23,2 «
S. abortus equi	17,4 «
S. kunzendorf	33,0 «
S. bareilly	31,2 «
S. anatum	27,6 «
S. meleagridis	29,0 «
S. veneziana	23,6 «

In addition to the monosaccharides already mentioned, notably d-glucose, d-galactose, d-mannose and rhamnose, the sulfuric acid hydrolysates of the single extracts contained a sugar similar in R_f value to xylose, as well as the pentoses called the "fast component" by WESTPHAL et al. The single kinds of carbohydrate were identified by running simple sugars together with 2 hydrolysed extracts. We have so far not succeeded in identifying precisely the sugar similar in R_f value to xylose. The results of these tests are presented in Fig. 2.

The hydrolysates of the 16 test strains were examined in pyridine-butanol-water by the ascending and descending methods. By the ascending method the sugar content of extracts identical in solid content, and by the descending method the extracts adjusted to the same carbohydrate concentration were compared. It is obvious that the carbohydrate composition of the extracts is far from being as uniform as their amino acid composition. The differences in the case of carbohydrates are not only quantitative, but also qualitative. Since the two methods yielded highly comparable values, only the results of the tests on hydrolysates adjusted to the same carbohydrate concentration are presented in Fig. 3/a and

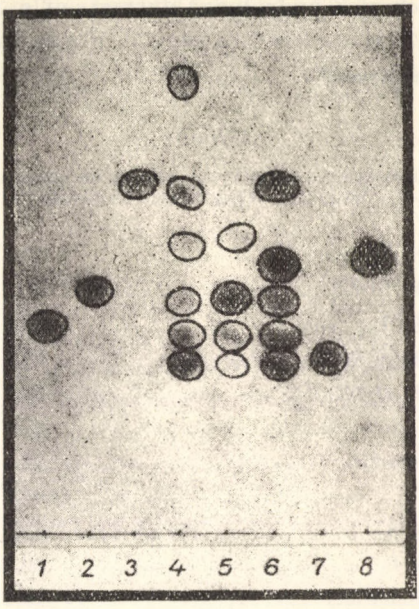


Fig. 2. The spectrum and identification of carbohydrates in the sulphuric acid hydrolysates of 2 strains of Salmonella. Solvent : butanol : pyridine : water. Descending method

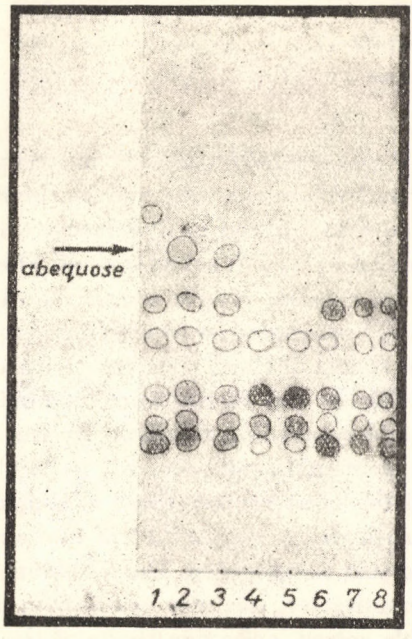


Fig. 3a. The carbohydrate spectrum of sulphuric acid hydrolysates of Salmonella strains, adjusted to equal sugar concentration. Solvent : butanol : pyridine : water. Descending method

Fig. 3/b. It can be also seen that abequose and tyvelose, which have been described by WESTPHAL et al. [27], are present also in the BOIVIN extracts prepared from certain strains of Salmonella.

In view of the fact that 1,5 to 6,5 per cent *N* acetyl-glucosamine was present in the hydrolystes of extracts prepared by different methods by ELKIN [3], WESTPHAL et al. [10, 27], PON and STAUB [20], as well as in the hydrolysate of *Sh. flexneri* (SLEIN and SCHNELL [22]) we, too, tested our hydrolysed BOIVIN

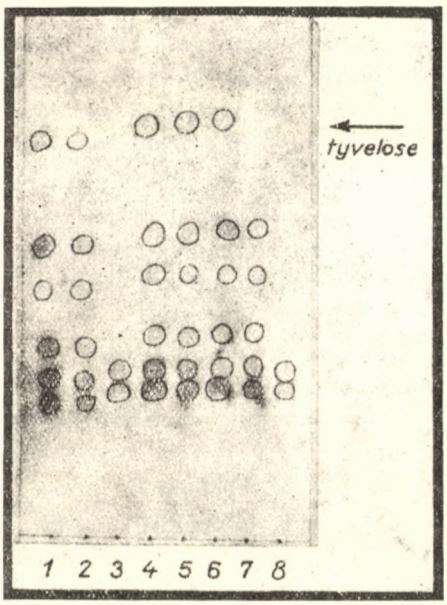


Fig. 3b. The carbohydrate spectrum of sulphuric acid hydrolysates of Salmonella strains, adjusted to equal sugar concentration. Solvent : butanol : pyridine : water. Descending method

extracts for glucosamine. In the control tests the 20 μg doses of glucosamine appeared invariably in the form of a spot at the corresponding R_f value after development with TTC, whereas no such spot appeared in any of the test hydrolysates.

Discussion

Numerous authors have been concerned with the problem of compounds determining the serologic characters of bacteria. One of the methods used for isolating these compounds is to treat the bacterial cell with various solvents, which elute first the compounds in the more superficial layers, then those in the deeper layers. The trichloracetic acid extraction method of BOIVIN results presumably in the dissolution of substances at the cell surface. According to

MILES and PIRIE [12], and HAAS [6], the antigen thus obtained retains the serological specificity of the bacterial cell. Owing to the nature of the extracting agent, no proteins of high molecular weight can be found in the extracts, which contain 2 to 3 per cent nitrogenous compounds and from 10,2 to 34,8 mg polysaccharide per 100 g. These values are, in general, lower than those given in the literature, presumably because of differences in the quality of extracts, in grade of purity and in the methods used for estimating polysaccharide. Apart from the above compounds, the extracts contain also considerable quantities of phospholipid.

In the hydrochloric acid hydrolysates of the extracts tested 12 amino acid spots were detected, except for *S. coli*, which yielded 13 spots. In tests made by different solvents and methods the same amino acids appeared in the hydrolysates, in obviously different quantities. These quantitative differences were merely indicated by our chromatograms; no quantitative tests were performed for single amino acids. The similarity in amino acid composition of our hydrolysates to the bacterial cell wall preparation of SALTON [21] is remarkable and seems to point at a relationship between the BOIVIN antigen and the bacterial cell surface.

MORGAN [13, 14] and MORGAN and PARTRIDGE [15, 16] have shown by serological methods that the protein component present in the diethyleneglycol extracts of Salmonellae is common to the members of the group, and that if a specific Salmonella polysaccharide is linked to the protein isolated from the extract prepared from bacteria of the Shigella group, it will react with the immune serum of the corresponding Salmonella strain. Our experiments lend support to this identity of proteins within the Salmonella group, by demonstrating that the protein fraction was composed of the same amino acids.

Confirming the view put forward by MORGAN, our experiments showed that the polysaccharide was the factor of decisive importance in serological specificity. As early as 1902, PICK [19] called attention to the important role played by the polysaccharide in the serology of typhoid fever. In *S. typhi* cultures digested with trypsin and pepsin PICK demonstrated the presence of a polysaccharide, which gave a positive precipitation reaction with typhoid immune serum after deproteinisation. Considering that more than 144 members of the Salmonella group are serologically distinct, it seems obvious to hold differences in polysaccharide composition responsible for the differences in serological properties. Our investigations seem to lend support to this view. Significant differences in the quantity of polysaccharide exist between the single strains, yet this is not the only difference. The hydrolysates of certain extracts contain, in different variations, desoxy-methyl-pentoses, which have not been known to occur in nature elsewhere. Classified according to the groups of the KAUFFMANN—WHITE scheme, the results of chromatography and the polysaccharide contents of the single strains are presented in Table II.

Table II

The polysaccharide content and post-hydrolysis carbohydrate composition of the Salmonella extracts tested

Kauffmann—White group	Salmonella strain	Polysaccharidae content, mg%	Sugars in hydrolysed extracts						
			glucose	galactose	mannose	xylose	rhamnose	fast abequose	component tyvelose
A	paty A	17,4	+	+	+	+	+		
B	paty B	10,2	+	+	+	+	+	+	
	typhimurium	23,2	+	+	+	+	+	+	
	abortus equi	17,4	+	+	+	+	+	+	
C	kunzendorf	33,0	+	+	+	+			
	bareilly	31,2	+	+	+	+			
D	typhi Ty_2	20,0	+	+	+	+	+		+
	typhi O 901	24,2	+	+	+	+	+		+
	typhi H 901	25,2	+	+	+	+	+		+
	Vi 965	16,4	+	+					
	enteritidis	21,2	+	+	+	+	+		+
E	anatum	27,6	+	+	+	+	+		
	meleagridis	29,0	+	+	+	+	+		
F	veneziana	23,6	+	+	+	+	+		
	minnesota	22,8	+	+	+	+	+		
	coli	34,8	+	+					

Finally, we wished to determine whether the acetone-treated Ty_2 bacterial powder yielded components identical with, or different from, those yielded by the hydrolysed trichloracetic acid extract of the same bacterial powder. Hydrolysis of the protein fractions yielded the same amino acids. The bacteria contained 12,8 mg polysaccharide per 100 g, as compared to the 20 mg per 100 g value for the BOIVIN extract. After hydrolysis the polysaccharide composition remained the same, indicating that the same amino acids and polysaccharides are present in the bacterial cell and in its extract.

Summary

The total nitrogen and polysaccharide contents have been examined of the trichloracetic acid extracts of 16 Salmonella strains belonging to different groups of the KAUFFMANN—WHITE scheme, as well as of the acetone-treated bacterial powder of strain Ty_2. The total nitrogen content varied in the extracts from 2 to 3 per cent. As determined by paper chromatography, the

hydrochloric acid hydrolysates of the extracts of each strain contained the same 12 amino acids; *S. coli* contained also proline, as the 13th amino acid.

The polysaccharide content of the extracts varied from 10,2 to 34,8 mg per 100 g. As determined by paper chromatography, the sulphuric acid hydrolysates showed also qualitative differences, in accordance with the serological types of the KAUFFMANN—WHITE schema.

The bacterial powder and the hydrolysed BOIVIN extract of the *S. typhi* strain Ty_2 contained the same amino acids and simple sugars.

Acknowledgements

Author is indebted to DR. B. LÁNYI for making the Salmonella strains available, to MRS. J. MAJOR for carrying out the nitrogen estimations and for valuable assistance in the course of chromatographic studies and to MRS. ZS. RÓBERT for the estimation of polysaccharides.

LITERATURE

1. CONSDEN, R., GORDON, A. H., MARTIN, A. J. P.: Biochem. J. **28**, 224 (1944).
2. DURHAM, H. E.: J. Exper. Med. **5**, 353 (1901).
3. ELKIN, S. B.: Биохимия **16**, 333 (1951).
4. FREEMAN, G. G.: Biochem. J. **36**, 240 (1942).
5. GRUBER, M., DURHAM, H. E.: Münch. Med. Wschr. **43**, 285 (1896).
6. HASS, R.: Ztschr. Immunitätsf. **96**, 275 (1939).
7. JOKOYAMA, S.: Tokohu Ig. Z. **33**, 1010 (1943).
8. KABAT, E. A., MAYER, M. M.: Experimental Immunochemistry, Thomas, Springfield, 1949.
9. KAUFFMANN, F.: Enterobacteriaceae. Ejnar Munksgaard, Copenhagen, 1951.
10. LÜDERITZ, O., WESTPHAL, O. Z.: Naturforsch. **7b**, 548 (1952).
11. MCFARREN, E. F.: Anal. Chem. **23**, 168 (1951).
12. MILES, A. A., PIRIE, N. W.: The Nature of the Bacterial Surface, Blackwell, Oxford 1949.
13. MORGAN, W. T. J.: Biochem. J. **30**, 909 (1936).
14. MORGAN, W. T. J.: Biochem. J. **31**, 2003 (1937).
15. MORGAN, W. T. J., PARTRIDGE, S. M.: Brit. J. Exp. Path. **23**, 151 (1942).
16. MORGAN, W. T. J., PARTRIDGE, S. M.: Biochem, J. **34**, 169 (1940).
17. PARTRIDGE, S. M.: Biochem. J. **52**, 238 (1948).
18. PARTRIDGE, S. M.: Nature **164**, 443 (1949).
19. PICK, E.: Beitr. Chem. Physiol. Path. **1**, 393 (1902).
20. PON, G., STAUB, A. M.: Bull. Soc. Chim. Biol. **34**, 1132 (1952).
21. SALTON, M. R. J.: Biochim. Biophys. Acta **10**, 512 (1953).
22. SLEIN, M. W., SCHNELL, G. W.: J. Biol. Chem. **203**, 837 (1953).
23. SZÁRA, I.: Kísérl. Orvostud. **3**, 71 (1951).
24. SZÁRA, I.: Personal communication.
25. TOLNAI, G., HOLLÓS, I.: 1953 Meeting of the Hungarian Microbiological Society.
26. WALLENFELS, K.: Naturwiss. **37**, 491 (1950).
27. WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O., FROMME, I., JOSEPH, N.: Angewandte Chem. **65**, 555 (1953).
28. WILLIAMS, R. I., KIRBY, H.: Science **107**, 481 (1948).
29. TOLNAI, G., BARSY, GY.: Acta Microbiol Hung. 1956. In the press.
30. WALLEMFELS, K.: Ann. Chem., 1953.

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója Műszaki felelős: Farkas Sándor
A kézirat beérkezett: 1956. IX. 11. — Terjedelem: 9 (A/5) ív, 16 ábra, 3 melléklet

40619/57 — Akadémiai Nyomda, Budapest — Felelős vezető: Puskás Ferenc

The *Acta Microbiologica* publish papers on microbiological subjects in English, German, French and Russian.

The Acta *Microbiologica* appear in parts of varyng size, making up one volume.

Manuscripts should be addressed to:

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Correspondence with the editors should be sent to the same address.

The rate of subscription to the *Acta Microbiologica* is 110 forints a volume. Orders may be placed with "Kultúra" Foreign Trade Company for Books and Newspapers (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Account No 43-790-057-181) or with representatives abroad.

Les *Acta Microbiologica* paraissent en français, allemand, anglais et russe et publient des travaux du domaine de la microbiologie.

Les *Acta Microbiologica* sont publiés sous forme de fascicules qui seront réunis en un volume.

On est prié d'envoyer les manuscrits, destinés à la rédaction, à l'adresse suivante:

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Toute correspondance avec la rédaction doit être envoyée à cette même adresse.

Le prix de l'abonnement est de 110 forints par volume.

On peut s'abonner à l'Entreprise pour le Commerce Extérieur de Livers et Journaux »Kultúra« (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Compte-courant No. 43-790-057-181) uo à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

«*Acta Microbiologica*» публикуют трактаты из области микробиологии на русском, немецком, английском и французском языках.

«*Acta Microbiologica*» выходят отдельными выпусками разного объема. Несколько выпусков составляют один том.

Предназначенные для публикации рукописи следует направлять по адресу:

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

По этому же адресу направлять всякую корреспонденцию для редакции.

Подписная цена «*Acta Microbiologica*» — 110 форинтов за том. Заказы принимает предприятие по внешней торговле книг и газет «Kultúra» (Budapest VI,. Népköztársaság útja 21. Текущий счет № 43-790-057-181) или его заграничные представительства и уполномоченные.

35,— Ft

INDEX

Tolnai, G. and *Barsy, G.:* Active and Passive Mouse Protection Tests Used in the Assay of Typhoid Vaccines 227

Kardeván, A. und *Kapp, P.:* Untersuchungen über das Vorkommen der Toxoplasmose an Haustieren in Ungarn. 237

Fűrész, I., Kubinyi-Schwanner, M. und *Józsa, G.:* Über die Bewertung der Laboratoriumsuntersuchungsresultate bei den mit Chloramphenicol behandelten Typhuskranken 253

Gunda, L., Joó, I., Richter, P. and *Váli, A.:* Preparation of Typhoid Vaccine from Separated Antigenic Components. I. Preparation of Purified O and Vi Antigens 263

Uri, J., Bognár, R. and *Békési, I.:* Fungicidal Effect of Methyl Derivatives of 8-Hydroxyquinoline on Dermatophytes 279

Szita, J.: Differential Diagnosis of Enterococci 289

Ivánovics, G., Alföldi, L. and *Lovas, B.:* Cultivation and Electron Microscopy of a Bacteriocinogenic Strain of Bacillus megaterium 295

Győrffy, B. and *Kállay, I.:* Streptomycin Resistance of Serratia marcescens 309

Ivánovics, G., Alföldi, L. and *Széll, Á.:* Serological Types of Bacillus megaterium and their Sensitivity to Phages 333

Molnár, E. and *Fornosi, F.:* Aetiologic Study of Poliomyelitis Cases Occurred in the Second Half of 1955 in Hungary 353

Koch, A. and *Csonka, É.:* Effects of Formaldehyde on Influenza Virus. — I. Effects on the Haemagglutinating Activity of the Virus 357

Lovrekovich, L.: Simple Methods for Testing the Nitrate Reducing, Catalase and the Fat Splitting Activity of Bacteria 363

ACTA MICROBIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS

E. FARKAS, J. HORVÁTH, S. KOTLÁN, R. MANNINGER,
A. PELC, K. RAUSS, J. SZIRMAI

REDIGIT

G. IVÁNOVICS

TOMUS IV FASCICULUS 2

AKADÉMIAI KIADÓ BUDAPEST

1957

ACTA MICROBIOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA MIKROBIOLÓGIAI KÖZLEMÉNYEI

KIADÓHIVATAL: BUDAPEST, V., ALKOTMÁNY UTCA 21.

Az *Acta Microbiologica* német, angol, francia és orosz nyelven közöl értekezéseket a mikrobiológia tárgyköréből.

Az *Acta Microbiologica* változó terjedelmű füzetekben jelenik meg. Több füzet alkot egy kötetet.

A közlésre szánt kéziratok géppel írva, a következő címre küldendők:

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Ugyanerre a címre küldendő minden szerkesztőségi levelezés.

Az *Acta Microbiologica* előfizetési ára kötetenként belföldre 80, külföldre 110 Ft. Megrendelhető a belföld számára az Akadémiai Kiadónál (Budapest, V., Alkotmány utca 21. Bankszámla 05-915-111-44), a külföld számára pedig a »Kultúra« Könyv és Hírlap Külkereskedelmi vállalatnál (Budapest, VI., Magyar Ifjúság útja 21. Bankszámla: 43-790-057-181), vagy külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

Die *Acta Microbiologica* veröffentlichen Abhandlungen aus dem Bereiche der Mikrobiologie in deutscher, englischer, französischer und russischer Sprache.

Die *Acta Microbiologica* erscheinen in Heften wechselnden Umfanges. Mehrere Hefte bilden einen Band.

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind an folgende Adresse zu senden:

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

An die gleiche Anschrift ist auch jede für die Redaktion bestimmte Korrespondenz zu richten.

Abonnementspreis pro Band: 110 Forint. Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Aussenhandels-Unternehmen »Kultura« (Budapest, VI., Magyar Ifjúság útja 21. Bankkonto Nr. 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

ACTA MICROBIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS
E. FARKAS, J. HORVÁTH, S. KOTLÁN, R. MANNINGER,
A. PELC, K. RAUSS, J. SZIRMAI

REDIGIT
G. IVÁNOVICS

TOMUS IV FASCICULUS 3

AKADÉMIAI KIADÓ BUDAPEST

1957

ACTA MICROBIOL. HUNG.

ACTA MICROBIOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA MIKROBIOLÓGIAI KÖZLEMÉNYEI

KIADÓHIVATAL: BUDAPEST, V., ALKOTMÁNY UTCA 21.

Az *Acta Microbiologica* német, angol, francia és orosz nyelven közöl értekezéseket a mikrobiológia tárgyköréből.

Az *Acta Microbiologica* változó terjedelmű füzetekben jelenik meg. Több füzet alkot egy kötetet.

A közlésre szánt kéziratok a következő címre küldendők:

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Ugyanerre a címre küldendő minden szerkesztőségi levelezés.

Az *Acta Microbiologica* előfizetési ára kötetenként belföldre 80, külföldre 110 Ft Megrendelhető a belföld számára az Akadémiai Kiadónál (Budapest, V., Alkotmány utca 21. Bankszámla 05-915-111-44), a külföld számára pedig a »Kultúra« Könyv és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál (Budapest, VI., Népköztársaság útja 21. Bankszámla: 43-790-057-181) vagy külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

Die *Acta Microbiologica* veröffentlichen Abhandlungen aus dem Bereiche der Mikrobiologie in deutscher, englischer, französischer und russischer Sprache.

Die *Acta Microbiologica* erscheinen in Heften wechselnden Umfanges. Mehrere Hefte bilden einen Band.

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind an folgende Adresse zu senden:

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

An die gleiche Anschrift ist auch jede für die Redaktion bestimmte Korrespondenz zu richten.

Abonnementspreis pro Band: 110 Forint. Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Außenhandels-Unternehmen »Kultura« (Budapest, VI., Népköztársaság útja 21. Bankkonto Nr. 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

ACTIVE AND PASSIVE MOUSE PROTECTION TESTS USED IN THE ASSAY OF TYPHOID VACCINES

By

G. TOLNAI and G. BARSY

State Institute of Hygiene, Budapest

(Received May 7, 1956)

There is no general agreement in the literature concerning the experimental models and evaluation of active and passive mouse protection tests used in the assay of typhoid vaccines. In the present work we have made a revision of the known experimental models of active mouse protection tests and an attempt was also performed to improve the passive mouse protection test by using a standard serum.

Materials and methods

Challenge of mice. Ty_2 strain was used throughout. With the FELIX method [4] a 6-hour old culture grown on HARTLEY agar was suspended in RINGER's solution and was used in 0,5 ml volumes. The bacterial count of the challenge dose in the different groups (Tables I and II) increased in geometrical progression. With the mucin method, standard lyophilized culture of the Ty_2 strain was used. One of the ampoules containing the lyophilized culture was opened 6 hours before use and the content was suspended in 5,0 ml peptone water, as recommended by RAUSS [14]. After incubation at 37° C for 6 hours dilutions were made of the culture and the dilution chosen for infection was mixed well with 5 per cent WILSON granular mucin. According to earlier experiments [22], the results obtained by the mucin method were comparable to those obtained without the use of mucin.

Experimental animals. In general, albino mice from a home stock were used. Occasionally for comparison fawn-coloured mice from a home stock and strains B and M obtained from the Phylaxia State Institute for Vaccine Production were also used.

Immunization. Vaccines AD and AD_1 were adsorbed bacillary vaccines, bearing the production No. 20 and 21, respectively [20].

The standard vaccine was prepared from Ty_2 bacteria grown in the dialyzed medium of DOLE [3], as modified by us [21]. It was centrifuged under aseptic conditions, killed and dried with acetone, making 15 g powder at a time. The dried bacteria were stored at room temperature and were suspended immediately before use, in the desired concentration. On analytical scales, 125 mg bacterial powder was weighed, homogenized in physiological saline in an achate mortar and suspended in 50 ml-volume to yield approximately 10 000 million germs per ml [10]. The tenfold dilution of this suspension (made by means of a calibrated pipette) represented the standard vaccine.

The standard serum was a mixture of sera from patients convalescing after typhoid fever. The sera were kindly supplied by the Central Hospital for Infectious Diseases, Budapest. In 1954 30, and in 1955 50 such samples were obtained; equal volumes of each sample were mixed. They were Seitz-filtered and lyophilized in 1,2 ml volumes per ampoule. Approximately 100 ampoules were obtained in this way. This standard serum was matched with the „Provisional International Standard" obtained in the lyophilized form from WHO.

Immunization was made invariably through the subcutaneous, and infection through the intraperitoneal route. In the passive protection test intraperitoneal immunization was employed. The post-infection observation period was 48 hours. Blood from at least two dead animals from each group was obtained by heart puncture and cultured to prove the specificity of the cause of death.

Statistical analysis. Except for sex, the animals were selected at random, making use of the table described by FISHER and YATES [7]. LD50 was calculated according to REED and MUENCH [18]. (Potency ratios were calculated by probit analysis.)

Experimental

Active mouse protection test

This test is commonly used in the assay of typhoid vaccines. There is, however, no international agreement concerning the theoretical aspects of the test, or the technique of immunization and infection. The models of the active mouse protection tests may, in general, be classified into two main groups.

a) The test animal is immunized with a single fixed dose and is infected with increasing doses.

b) Immunization is carried out with graded doses of the vaccine and the challenge dose is the single, fixed one.

Of the two methods, that described under *a)* is the older and more extensively used one. The procedure has been accepted, *e. g.*, by the Civil Health Administration of the USA [13], by the Soviet Union, Czechoslovakia and Hungary. Theoretically, the test is based on the consideration that the protective value of the vaccine is determined by the magnitude of the danger against which it affords protection. Attempts have been made to express this kind of protective value quantitatively. For example, LOVREKOVICH and RAUSS [11] introduced in 1942 the concept of mouse units in the titration of vaccines. One mouse unit is the smallest amount of the extract capable of protecting a mouse weighing 18 to 20 g against the lethal action of an adequate dose (lethal dose) of Ty_2 bacteria. Recently, a similar unit called typhoid immunity unit (TIU) has been introduced by LUIPPOLD [12].

Earlier, the method described under *a)* was difficult to carry out, because the preparation of the infective suspension was a rather delicate task. Excessive number of bacteria had to be used to achieve deaths among test animals less susceptible to typhoid and the margin between the ineffective dose and that causing 100 per cent mortality was always very narrow. Moreover, the susceptibility of test animals showed seasonal changes. For this reason, the technique of infection demanded utmost precision and attention and even then failure was not inevitable, either because all the test animals died or because no evaluable mortality occurred in any of the groups. In such cases the entire procedure had of course to be repeated. The introduction of the mucin technique [13] has brought considerable improvement. The mucin technique [19], and its use in Hungary [14, 20, 22] have been dealt with in the literature.

The method involving immunization with a single fixed dose and infection with graded doses has been studied by using vaccines of known potency. Vaccine

AD was tested in two parallel experiments, comparing at first half, and then quarter of the original concentration. The results are shown in Tables I and II. In both cases immunization with the fixed dose and challenge with an increasing number of bacteria indicated that the ½ and ¼ concentrations were less potent than the original. A comparison of the LD50 values does not, however, permit even an approximate estimation of the true difference between the ½ and ¼ concentrations. This phenomenon has been ascribed to the fact that the relation between the amount of antigen injected and the immune response attainable exists only within certain limits. Beyond these the increase of the amount of antigen injected is not any more accompanied by a proportionate increase in the immune response, which might even decrease, as we, too, have observed it [20]. Thus, overdosage of the vaccine is a source of error distorting the result of comparison always in favour of the vaccine of poorer quality. This is the explanation of the failure of the experiments shown in Tables I and II. In order to eliminate the above source of error, it is common practice to employ lower concentrations for inducing immunity in similar tests [1, 23]. However, when vaccines of unknown potency are used it is not possible to foretell which dose of the vaccine will exceed the smallest amount inducing maximum immunity.

It has been also shown by our parallel experiments that unreliable information can only be obtained by expressing the protective value of the test vaccine in terms of the hazard averted by it. It may suffice in this respect to analyse the results obtained for the original concentration of vaccine AD. In the earlier experiment this vaccine had been found to be capable of protecting

Table I

The protective value of typhoid vaccine AD and of its 1/2 dilution

Method : Immunization with one dose, graded infection.
Inoculation : 0,5 ml to each mouse.
Infection : 4 weeks following immunization.

Number of bacteria in challenge dose, millions	Mortality in groups of 25 mice each	
	AD	AD/2
50	1	1
75	7	11
112,5	8	12
168,75	17	16
LD50 (million bacteria)	125,4	109,1
Control LD50 (million bacteria)	26,7	

Table II

The protective value of the typhoid vaccine AD and of its 1/4 dilution

Method : Single immunizing dose, graded infection.
Inoculation : 0,5 ml into each mouse.
Infection : 4 weeks after immunization.

Number of bacteria in challenge dose, millions	Mortality in groups of 22 mice each	
	AD	AD/4
50	1	1
75	5	9
112,5	10	13
168,75	14	19
LD50 (million bacteria)	120,6	94,4
Control LD50 (million bacteria)	15,9	

50 per cent of the immunized mice against 125,4 million bacteria in the challenge dose at the same time, the LD50 for control mice was 26,7 million germs.

The ratio between these two LD50 values was approximately 1 to 5. One week later the same vaccine afforded 50 per cent protection against 120,6 million bacteria in the challenge dose as compared to the LD50 value of 15,9 million germs for the controls: this time the LD50 (immunized) to LD50 (non-immunized) ratio was 1 to 8.

Thus, the results were divergent within such short a period, in spite of the fact that the conditions of both experiments were identical. It is obvious that by decreasing the amount of antigen injected, as well as by the use of the mucin technique the above results could be improved. However, one feels reluctant to accept the view that for example the TIU suggested by LUIPPOLD would be of any practical significance.

In 1949, BATSON [1], presenting convincing experimental and statistical evidence, proved the superiority of immunization with variable doses and infection with a single fixed dose to the aforementioned method. According to his final conclusion, in the mouse protection tests of typhoid vaccines graded immunization, and infection with a fixed dose proved to be superior to the method of immunization with a fixed dose, and infection by graded doses. With the former method minor changes in dose yielded more significant differences, the slope of the dose-response curve was steeper and the 50 per cent point could be determined more accurately ; moreover, sex had less influence on the results.

On the basis of the investigations of BATSON et. al [2], the US Army Health Service has adopted the graded immunization-fixed dose infection method in

active mouse protection tests for the assay of typhoid vaccines. KOHLER, of Switzerland [9], and GRABAR and LE MINOR, of The Pasteur Institute of Paris [8], use similar procedures.

The reversed gradation is not the only difference between the two methods. With the first method the principal trend of thought in the experiments is that the protective value of the test vaccine is related to the hazard against which it affords protection. On the other hand, the other method is not intended to yield any absolute value ; it expresses the protective value of the test vaccine in relation to a vaccine of known potency, which thus plays the role of a reference standard. The proper choice of the reference standard, and the maintenance of its constant potency are the factors of fundamental importance in this method. We used acetone-killed and powdered Ty_2 organisms for preparing the standard vaccine, taking care that the conditions of preparation be always identical. So far, our standard has met the requirements ; it was highly effective and the preparations made at different times proved to possess constant activity. Under our working conditions tests on adsorbed vaccines involved specific problems. Our standard is a simple bacillary vaccine. The mice injected with it reach the peak of immunity one week after inoculation and maintain that for one week. The immune response to adsorbed vaccines develops slower, reaching the peak in mice in about four weeks. For this reason, immunization with the standard was carried out two weeks after immunization with the adsorbed vaccine, while infection was carried out simultaneously.

In Table III are shown the survival rates for mice immunized with different dilutions of the standard, AD, and AD/2 vaccines, the latter being the ½ dilution of the AD vaccine. In all three cases four immunizing doses were given. As it can be seen, the increase in the amount of antigen injected went parallel with the increase of survival rate of mice in all three groups. The potency ratios indicate that the potency of the adsorbed vaccine is superior to that of the bacillary vaccine, and offer useful information concerning the relative potencies of the two test vaccines. As related to the standard vaccine, the concentrated vaccine had a potency of 320 per cent, the ½ dilution of it 168 per cent. An even more precise method is to compare the value of the original concentration with that of the ½ concentration. The ½ diluted vaccine possessed 50,3 per cent of the activity of the original concentration. This high degree of accuracy is naturally also a result of chance; however, the limits of error shown alongside the potency ratios suggest that satisfactory results may be obtained even under less favourable conditions.

In Table IV are shown the results for the experiment carried out one week later. The same vaccine was used as in the earlier experiment, except that it was diluted 1 to 4, instead of the former 1 to 2. The original concentration was found to have an activity of 309 per cent, as related to that of the standard, almost the same value had been obtained one week earlier. The activity of the

Table III

Potency of vaccine AD and of its 1/2 dilution

Method: graded immunization, single infecting dose.
Standard: Ty_2 vaccine.
Infection: AD and AD/2 4 weeks after immunization.
Standard 2 weeks after immunization.
Infective dose: 10^{-4} dilution of a 6-hour peptone-water ampoule culture.
Control LD50 10^{-8} dilution.

Dilution of vaccine	Number of survivors in groups of 16 mice each		
	St	AD	AD/2
1 : 160	0	3	—
1 : 80	2	10	4
1 : 40	6	12	10
1 : 20	10	15	11
1 : 10	—	—	15

Vaccine	Relative potency (%)	Fiducial limits (%)
Standard	100	
AD	320	203 — 597
AD/2	168	103 — 340
AD	100	
AD/2	50,3	29,2 — 83,2

1/4 dilution, as related to that of the standard, was 76 per cent, *i. e.* almost 1/4 of the 309 per cent value. The activity of the 1/4 dilution, as expressed in percentage of the activity of the original concentration, was 27 per cent instead of the 25 per cent expected, with very narrow limits of error.

The graded immunization—fixed dose infection method, as well as the use of the standard vaccine yielded excellent results in our experiments. The results were reproducible and the true differences in protective value existing between the test vaccines could be shown with a high degree of accuracy. The other method (that involving immunization with a fixed dose and graded infection) yielded no reproducible results and it could only indicate that the activity of the original concentration differed from that of the 1/2 and 1/4 dilutions, but made no quantitative evaluation possible.

The success of the titration method greatly depends upon the quality and care of the experimental animals. For this reason the experimental animals were kept under carefully controlled conditions. In a series of experiments we

Table IV

Potency of vaccine AD and of its 1/4 dilution

Method : graded immunization, single-dose infection.
Standard : Ty_2 vaccine.
Infection : AD and AD/4 : 4 weeks following immunization.
Standard : 2 weeks following immunization.
Infective dose : $5 \cdot 10^{-3}$ dilution of a 6-hour peptone-water ampoule culture.
Control LD50 10^{-8} dilution.

Dilution of vaccine	Number of survivors in groups of 25 mice each		
	St	AD	AD/4
1 : 160	0	5	—
1 : 80	2	12	—
1 : 40	8	16	4
1 : 20	13	21	12
1 : 10	—	—	18
1 : 5	—	—	22

Vaccine	Relative potency (%)	Fiducial limits (%)
Standard	100	
AD	309	190 — 589
AD/4	76	50 — 131
AD	100	
AD/4	27	17 — 43

could observe the different behaviour of the different strains of mice. In this series 3 strains of mice were used, the Phylaxia strains B and N and the home strain D. Groups of each strain were inoculated with the standard vaccine and with the vaccine AD_1, respectively. Vaccine AD_1 originated from production series other than the adsorbed vaccine used in the previous tests. In this series the immunogenic capacity of the adsorbed vaccine was determined after 2 weeks, as we did with the standard vaccines instead of after 4 weeks. The results are shown in Table V. The potency ratios were this time lower because of the shorter immunization period of the adsorbed vaccine. It is remarkable that, although different results were obtained for the different groups of mice, each potency ratio proved to fall within the limits of error determined in the other two cases. The limits of error varied highly from strain to strain. From this it obviously follows that the tests should always be carried out on the same strain.

Table V

The potency of vaccine AD_1 in different strains of mouse

Method: graded immunization, single-dose infection.
Standard: Ty_2 vaccine.
Infection: 2 weeks after immunization.
Infecting dose: 10^{-4} dilution of a 6-hour peptone-water ampoule culture.
Control LD50 10^{-8} dilution.

Mouse strain	Vaccine	Number of survivors in groups of 16 mice each, per dilution of vaccine			
		1 : 160	1 : 80	1 : 40	1 : 20
B	St	0	1	4	9
	AD_1	1	2	8	15
N	St	1	2	5	7
	AD_1	2	4	7	14
D	St	0	1	5	9
	AD_1	2	8	8	13

Mouse strain	Potency of vaccine AD_1 in percentage of the standard	
	relative potency %	fiducial limits %
B	187	126—286
N	207	122—444
D	254	149—530

Passive mouse protection test

Similar to the practice in foreign countries, after having made the laboratory assay tests, our Institute estimates the potency and the reactivity of a vaccine in small groups of human subjects.

The potency test is based on the generally accepted assumption that the potency of typhoid vaccines is proportionate to the concentration of mouse-protecting antibodies in the serum of inoculated persons [10, 14, 15].

RAUSS [16] carries out the passive mouse protection test with sera from inoculated persons for the assay of dysentery vaccines in the following way. From persons immunized with a fixed dose, blood is taken both before and after inoculation. Mice are immunized intraperitoneally with 0,1 ml of the pre-inoculation, and with 0,01 ml of the post-inoculation sera, respectively; then in both groups of mice the LD50 is determined by challenging the mice by differ-

ent number of bacteria. From the ratio of the two LD50 values, the protective index is calculated.

This method has been adopted by the Vaccine Control Department of our Institute for the estimation of mouse-protecting antibody appearing after the use of typhoid vaccines.

In an earlier work [20] the protective values of different serum mixtures were compared. We modified the above method as follows : the groups of mice immunized with different dilutions of the two kinds of serum mixture were challenged with equal number of bacteria and thus the protective values could be compared directly. Based on the results it was suggested that in the mouse-protection tests the fixed-dose immunization and graded infection method might be employed instead of the graded immunization and fixed-dose infection.

The value of this experimental model could also be enhanced considerably by using a standard reference serum for comparison. We have obtained 5,0 ml of the "Provisional International Standard" of the WHO [5].

For routine purposes, however, we have prepared a home standard from pooled human convalescent sera as described in the methodical section. According to RAUSS [17] such sera have a high protective value. We suppose moreover that when human sera are to be tested human reference sera may be more convenient than horse sera.

Table VI

Comparison of the protective value of the provisional international standard serum and of the serum mixture recommended as home standard

Survival rates for groups of 12 mice each.
Method : graded immunization, single-dose infection.
Infecting dose : 10^{-6} dilution of a 6-hour peptone-water ampoule culture.
Control LD50 $5 \cdot 10^{-9}$ dilution.

International provisional standard		Home standard	
Dose of serum 10^{-5} ml	Number of survivors	Dose of serum 10^{-3} ml	Number of survivors
0,0625	1	0,03125	1
0.125	3	0,0625	2
0,25	4	0,125	3
0,5	5	0,25	4
1	6	0,5	10

Serum	Relative potency (%)	Fiducial limits (%)
I P St	100	
H St	2,12	0,83—5,57

The protective value of convalescent sera may offer a satisfactory means of comparison for judging the potency of the vaccine it being obvious that one cannot require the vaccine to produce an immunity higher in degree than the protective value of the convalescent serum. Our own standard has been compared with the international standard for potency. The results are presented in Table VI. According to the analysis, the convalescent serum represented about 1/50 of the protective value of the international standard. Though the stability of our home standard has proved to be satisfactory, it is advisable to repeat this comparative test at intervals.

Summary

Two models of the active mouse protection test employed in the assay of typhoid vaccines have been subjected to study. The method involving immunization with a fixed dose and infection by graded doses can be criticized for the following reasons.

1. A fixed dose may be easily overdosed, resulting in a distortion of the results of assay in favour of vaccines of poorer quality, *i. e.* the method does not truly indicate the differences in protective value existing between the vaccines.

2. The method fails to express the protective value of the vaccine in terms of the hazard averted. Highly variable results have been obtained for the same vaccine in tests made at short intervals.

Immunization by graded doses and infection by a fixed dose, with the simultaneous introduction of a standard vaccine indicated reliably and within remarkably narrow limits of error the true measure of the difference in the protective value of different vaccines, on the one hand, and yielded reproducible results, on the other.

The latter method is recommended for use in passive mouse protection tests, with pooled sera from patients convalescent from typhoid as the standard.

Acknowledgements. The authors are indebted to DR. L. ERDŐS for his valuable advices DR. P. FERENCZ for permission to obtain blood from convalescent patients, and to J. KLUG for expert technical assistance.

LITERATURE

1. BATSON, H. C.: J. Exp. Med. **90**, 233 (1949).
2. BATSON, H. C.: Publ. Health Rep. **66**, 789 (1951).
3. DOLE, V.: Proc. Soc. Exp. Biol. **63**, 122 (1946).
4. FELIX, A.: J. Hyg. **49**, 268 (1951).
5. FELIX, A., PETRIE, G. F.: J. Hyg. **38**, 673 (1938).
6. FINNEY, D. J.: Probit analysis. Cambridge Univ. Press. 1952.
7. FISHER, R. A., YATES, F.: Statistical tables. Oliver and Boyd. London. 1948.
8. GRABAR, J., LE MINOR, S.: Ann. Inst. Pasteur. **88**, 601 (1955).
9. KOHLER, H.: Schweiz. Ztschr. Path. Bakt. **16**, 796 (1953).
10. LANDY, M.: Amer. J. Hyg. **58**, 148 (1953).
11. LOVREKOVICH, I., RAUSS, K.: Ztschr. Immunitätsf. **101**, 194 (1942).
12. LUIPPOLD, G. F.: Amer. J. Publ. Health **35**, 153 (1945).
13. National Institute of Health, Minimum Requirements : Typhoid Vaccine. Bethesda (1942).
14. RAUSS, K., KÉTYI, I.: Acta Physiol. Hung. **3**, 619 (1952).
15. RAUSS, K., KÉTYI, I. : Acta Microbiol. Hung. **2**, 401 (1955).
16. RAUSS, K., KÉTYI, I.: Orv. Hetil. **97**, 141 (1956).
17. RAUSS, K., KÉTYI, I.: Acta Physiol. Hung. **3**, 415 (1952).
18. REED, L. J., MUENCH, H.: Amer. J. Hyg. **27**, 493 (1938).
19. SILER, J. F. et al.: Immunization to typhoid fever. Johns Hopkins Press. Baltimore. 1941.
20. TOLNAI, G., BARSY, Gy.: Acta Microbiol. Hung. **3**, 373 (1956).
21. TOLNAI, G., HOLLÓS, I.: 1953 Congress of the Hungarian Microbiological Society.
22. TOLNAI, G., VÁCZI, L., BARSY, GY.: Acta Microbiol. Hung. **3**, 353 (1956).
23. WADSWORTH, A. B.: Standard methods. Williams & Willkins, Baltimore. 1947.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VORKOMMEN DER TOXOPLASMOSE AN HAUSTIEREN IN UNGARN

Von

A. KARDEVÁN und P. KAPP

Institut für Pathologische Anatomie der Veterinärmedizinischen Hochschule, Budapest

(Eingegangen am 18. Juli 1956)

Auf die Verbreitung der Toxoplasmose in Ungarn sind unsere Haustiere noch nicht eingehend untersucht worden. In einer 1952 veröffentlichten Abhandlung hatten wir bereits mitgeteilt, daß wir in Ausstrichpräparaten aus der Milz und Lunge eines verendeten Feldhasen Toxoplasmen nachweisen konnten, deren Züchtung aber damals nicht gelang. In der ungarischen humanmedizinischen Literatur sind mehrere auf das Vorkommen der Toxoplasmose deutende Mitteilungen erschienen (FOCHER, 1951 ; LEICHNER und SZEPES, 1951 ; CSERMELY, 1953 ; ZOLTAI und CSABA, 1953 ; WEINSTEIN, 1954). Außer CSERMELY hatten jedoch die einheimischen Autoren auf das Vorliegen der Toxoplasmose lediglich aus der klinischen Untersuchung geschlossen.

Die wenigen ungarischen Angaben sowie die Erfahrung, daß die Quelle der menschlichen Infektionen in der Tierwelt zu suchen ist, ließen es nötig erscheinen, die Verbreitung der Toxoplasmose bei unseren Haustieren zu untersuchen. Im Hinblick darauf, daß der Hund im Zusammenhang mit der menschlichen Infektion an erster Stelle steht, nahmen wir unsere Untersuchungen zum Nachweis des Vorkommens der Toxoplasmose in Ungarn in erster Linie an Hunden vor, zumal die Mehrzahl der Großstadtmenschen zu dieser Tierart in der engsten Beziehung steht.

Unsere Untersuchungen lassen sich in drei Abschnitte einteilen. Im *ersten Abschnitt* berichten wir über unsere systematischen Untersuchungen an den mit der Diagnose Hundestaupe zur Sektion gelangten, im Leben neurale Symptome aufweisenden Hunden zwecks Nachweis der Toxoplasmose, im *zweiten Abschnitt* über die anläßlich unserer Routineuntersuchungen an einer Katze und einem Kaninchen festgestellten Toxoplasmose und im *dritten Abschnitt* über die Züchtung eines Toxoplasma-Stammes aus dem erwähnten Kaninchen.

I.

Bei Beginn der histologischen Untersuchungen zum Nachweis der Toxoplasma bei Hunden schien es im Hinblick auf die Ähnlichkeit des Krankheitsbildes mit dem der Hundestaupe am zweckmäßigsten, Hunde zu untersuchen, die unter hundestaupeartigen Symptomen zugrunde gegangen waren. Jedoch

mit Rücksicht darauf, daß es praktisch sehr schwierig gewesen wäre, von den an Hundestaupe eingegangenen verhältnismäßig zahlreichen Hundekadavern jeweils mehrere Organe eingehend histologisch zu untersuchen, nahmen wir die Untersuchungen auf Toxoplasmose lediglich an den Kadavern der Hunde vor, die unter neuralen Symptomen zugrunde gegangen waren. Im vergangenen und gegenwärtigen Jahr wurden im Laufe von 8 Monaten die Kadaver von 20 Hunden untersucht, deren klinische Diagnose Enzephalitis bzw. Enzephalomyelitis war. Nach der pathologisch-anatomischen Untersuchung der Tiere nahmen wir in erster Linie aus dem Zentralnervensystem, von einigen Ausnahmen abgesehen aber auch aus anderen Organen, pathohistologische Untersuchungen vor. Bei 2 der 20 Hundekadaver vermochten wir mit der pathohistologischen Untersuchung durch Toxoplasma verursachte mehr oder minder schwere Enzephalitis festzustellen. Der pathohistologische und pathologisch-anatomische Befund der beiden Fälle sei nachfolgend mitgeteilt.

Fall Nr. 1

Kadaver einer 6 Monate alten, braunen irischen Setter-Hündin aus dem Besitz des Budapester Einwohners K. Gy. Klinische Diagnose: Febris catarrhalis nervosa infectiosa canis.

Sektionsbefund: Mäßige Abmagerung. Die Bindehaut ist gerötet, mit wenig schleimig-eitrigem Sekret bedeckt. An den Sohlenpolstern und am Nasenspiegel ist die Hornschicht verdickt (3—5 mm dick), hart, stellenweise rißig. Die Dünndarmschleimhaut ist leicht gerötet und vaskulär injiziert. In der Rindensubstanz einer Niere ist ein bohnengroßer, grauweißer, speckglänzender Herd sichtbar. An den anderen intraabdominalen sowie intrathorakalen Organen sind keine pathologischen Veränderungen wahrnehmbar. Die Blutgefäße der Hirnhäute sind erweitert, sonst sind an der Oberfläche und Schnittfläche des Gehirns makroskopisch keine krankhaften Veränderungen zu sehen.

Histologische Untersuchung: Im Gehirn, auf den Hirnmantel beschränkt, rechtsseitig im Gyrus sigmoideus, linksseitig am Gyrus ansatus- und Pars caudalis-Abschnitt der Hirnrinde, sind ausgedehnte entzündliche Herde vorhanden. Die Herde befinden sich im allgemeinen unter der weichen Hirnhaut in der oberflächlichen Schicht der grauen Substanz, obwohl sie sich hier und da zu den tiefergelegenen Teilen hin, fast ganz bis zur weißen Substanz ausdehnen. Auf diesen Gebieten ist das Lumen der Blutgefäße erweitert und enthält viele rote Blutkörperchen und weiße Blutzellen. Die Wand einzelner Blutgefäße ist verdickt und von einer sich mit Eosin homogen rosa färbenden Substanz durchtränkt. In der Umgebung einzelner Blutgefäße sind geringere oder schwerere, aus histiozytenartigen Zellen bestehende mantelartige Infiltrationen zu beobachten. Das ektodermale Gebiet ist dichter oder lockerer mit Mikro- und Makrogliazellhaufen infiltriert, zwischen denen auch einige Lymphozyten und weiße Blutzellen mit gelapptem Kern zu erkennen sind. Die Kerne der in den Herden

befindlichen Zellen sind gut gefärbt. Außer den eben beschriebenen Herden sind auch *kleinere umschriebene Herde* von 150—200 μ Durchmesser wahrnehmbar, häufig auch in den tieferliegenden Schichten der grauen Substanz. Diese Herde bestehen im wesentlichen aus ebensolchen Zellen wie die großen. Mit Thionin-Färbung kann nachgewiesen werden, daß einzelne der auf dem Gebiet

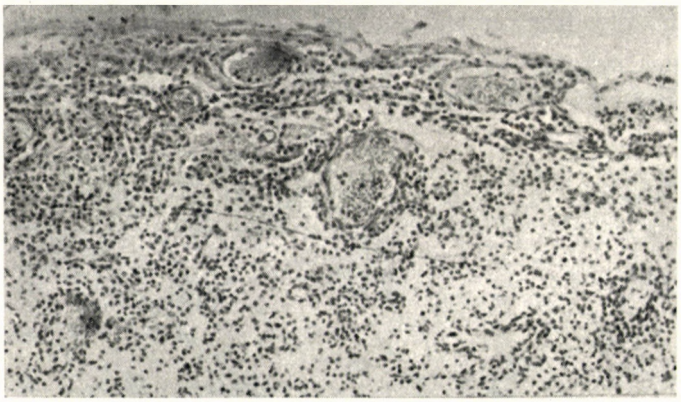


Abb. 1. Infiltration in der grauen Substanz der Hirnrinde und in den weichen Hirnhäuten. H.-E.-Färbung. Vergrößerung 1 : 80 (Hund)

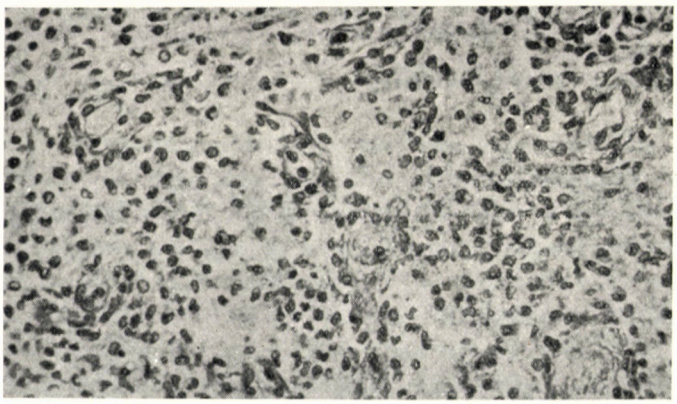


Abb. 2. Überwiegend aus Gliazellen bestehende Infiltration in der grauen Substanz der Hirnrinde. H.-E.-Färbung. Vergrößerung 1 : 400 (Hund)

der entzündlichen Herde anzutreffenden Nervenzellen geschwollen sind, die Tigroidschollen in ihrem Plasma sind zerfallen, und der Kern der Zellen liegt exzentrisch. An einzelnen Abschnitten der weichen Hirnhaut, insbesondere den großen und kleinen Herden entsprechend, aber auch an anderen Stellen, sind die Blutgefäße sehr stark erweitert; sie enthalten viele rote Blutkörperchen und weiße Blutzellen. Die Substanz der weichen Hirnhaut ist hauptsächlich perivaskulär von Lymphozyten und histiozytenartigen Zellen infiltriert (Abb. 1 und 2).

In den in der Rindensubstanz des Gehirns beschriebenen Herden vermochten wir für Toxoplasmose charakteristische Pseudozysten nachzuweisen (Abb. 3). Ihre Anzahl und Verteilung in den einzelnen Herden ist sehr verschieden. Die größeren Herde können auch 8—10 Pseudozysten enthalten, in den kleineren befindet sich überhaupt keine oder lediglich eine Pseudozyste. Nicht selten sind Pseudozysten auch in geringerer oder größerer Entfernung von den beschriebenen entzündlichen Herden vorzufinden, wo sie ohne jede Zellreaktion im Hirngewebe liegen. Der Durchmesser der Pseudozysten schwankt zwischen 10,4—15,6 μ. Auf den mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten weisen die Zysten eine feine, blaß gefärbte, sich aber von der Umgebung gut differenzierende

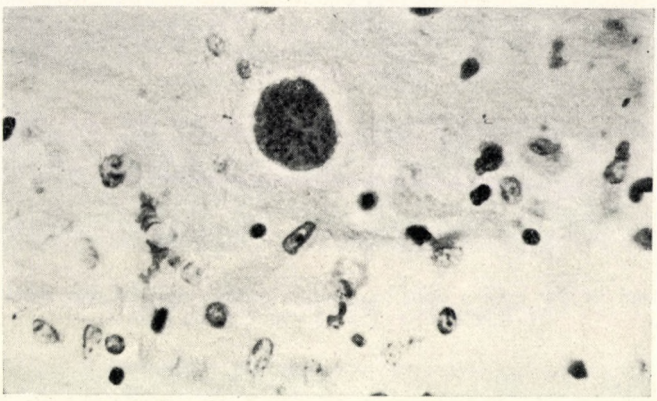


Abb. 3. Pseudozyste in der Hirnrindensubstanz (Hund). H.-E.-Färbung. Vergrößerung 1 : 480

dünne Hülle auf; der Kern der Toxoplasmaexemplare in den Zysten tritt in der blaßrosa gefärbten Grundsubstanz in Form von feineren oder gröberen blauen Punkten in Erscheinung. An einer Stelle, in der Umgebung eines Blutgefäßes, fanden wir auch in einer kleinen Gruppe frei gelagerte Toxoplasmen (Abb. 4). Mit der FEULGENschen Thymonukleinsäure-Reaktion färbt sich der Kern der Toxoplasmen hellrot.

Die Toxoplasma-Pseudozysten sind den von Enzephalitozoen hervorgerufenen Zysten sehr ähnlich. Die in den von uns beobachteten Pseudozysten befindlichen Parasitenexemplare waren jedoch gramnegativ, während bei den Enzephalitozoen die Gram-Färbung bekanntlich positiv ausfällt.

Außer den angeführten Veränderungen fanden wir auf anderen Hirngebieten lediglich Hyperämie in der grauen Substanz. In der weißen Substanz der Hirnrinde konnten wir mit der SPIELMEYERschen Markscheidenfärbung kleinere oder größere unregelmäßig geformte demyelinisierte Gebiete nachweisen (Abb. 5). Auch auf kleineren Gebieten des Hirnstammes, und zwar in der Gegend der Vierhügel, der VAROLschen Brücke und des Striatums sahen wir demyelinisierte Zonen. Hier und da waren in der Nachbarschaft der demyelinisierten Gebiete leichtere gliazellige Reaktionen und Vakuolenbildungen sicht-

bar. Die Blutgefäße des Rückenmarks waren erweitert; einzelne Nervenzellen am Lumbalabschnitt sind blaß gefärbt und gedunsen; ihr Kern liegt exzentrisch.

Bei der histologischen Untersuchung der peripheren Nerven fanden wir am Nervus ischiadicus keine erwähnenswerten Veränderungen. In einem Seh-

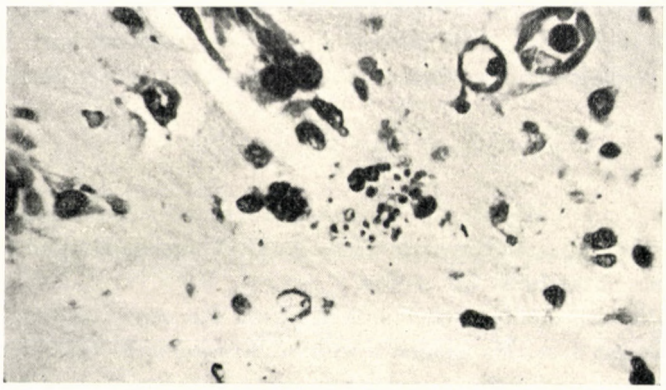


Abb. 4. Frei gelegene Toxoplasmen neben einem Blutgefäß. Hirnrinde (Hund). H.-E.-Färbung. Vergrößerung 1 : 480

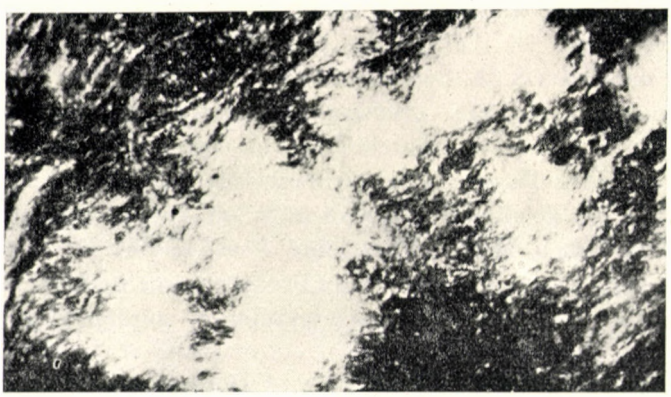


Abb. 5. Demyelinisation der markhaltigen Nervenfasern in der Hirnrinde (Hund). Markscheidenfärbung nach *Spielmeyer*. Vergrößerung 1 : 80

nerv konnten wir in der Nähe des Chiasmas eine Pseudozyste nachweisen, die nicht von entzündlicher Zellreaktion umgeben war.

In der Leber war leichte seröse Entzündung zu beobachten.

In beiden Nieren ist im allgemeinen Hyperämie, hie und da in der Umgebung der Blutgefäße mäßige rundzellige Infiltration zu sehen. In einer Niere ist das Interstitium, von der Rinden- bis zur Marksubstanz auf einem ungefähr keilförmigen Gebiet von Lymphozyten, Histiozyten und Granulozyten stark

infiltriert. Die Kapillaren der Glomeruli sind auf diesem Gebiet hyalin degeneriert, im freiem Raum einzelner BOWMANsche Kapseln befindet sich geronnene Flüssigkeit, und die Kanälchen sind mit Zellfragmente enthaltenden Hyalinzylindern angefüllt.

In der Lunge konnten im allgemeinen Hyperämie und in einzelnen Gebieten Ödem nachgewiesen werden. Einige Alveolenhöhlen enthielten außer Serum auch neutrophile Granulozyten sowie geschwollene und desquammierte Epithelzellen. In den Epithelzellen der Bronchien waren Staupekörpechen nachweisbar.

Fall Nr. 2

Kadaver einer 8 Monate alten, wolfsgrauen deutschen Schäferhündin aus dem Besitz des Budapester Einwohners R. K. B. Klinische Diagnose: Enzephalomyelitis, Febris catarrhalis inf. canis.

Bei der *Sektion* stellten wir lediglich akute Herzerweiterung, Lungenödem und Magenkatarrh fest. Im Gehirn waren makroskopisch Veränderungen nicht zu beobachten.

Histologische Untersuchung : Mit der SPIELMEYERschen Markscheidenfärbung waren an vielen Stellen der weißen Substanz der Hirnrinde sowie in den Hauptblättern des Kleinhirnwurms kleinere und größere, unregelmäßig geformte demyelinisierte Gebiete nachweisbar. In der Umgebung der entarteten markhaltigen Nervenfasern ist eine leichte gliazellige Reaktion sichtbar. In der Hirnrinde, in der Gegend des Sulcus praesylvius, unmittelbar unter der Hirnhaut, konnten einige kleinere, größtenteils aus Gliazellen bestehende Herde festgestellt werden. In einem Gliazellherd war eine Toxoplasmen enthaltende Pseudozyste von 12 μ Durchmesser nachzuweisen. Trotz sorgfältigen Suchens fanden wir nur noch an einer Stelle, und zwar im Nucleus caudatus, in Nachbarschaft der seitlichen Hirnkammer, eine Pseudozyste, die ohne jede Zellreaktion im Hirngewebe saß. Sonst waren im Hirn keine pathologischen Veränderungen. Die anderen Organe des Hundekadavers wurden histologisch nicht untersucht.

Wir konnten demnach an einem Hund Hyperkeratose der Nasenspiegel und Sohlenpolster sowie katarrhalische Darmentzündung mit dem histologischen Befund einer wohl ausgebildeten disseminierten produktiven Enzephalitis und Demyelinisation der markhaltigen Nervenfasern, am anderen Hund Magenkatarrh, akute Herzerweiterung und Lungenödem mit dem histologischen Befund einer ausgedehnten Demyelinisation der markhaltigen Nervenfasern und geringfügigen Herdenzephalitis produktiven Charakters. Im Bereich der entzündlichen Herde, aber auch von diesen entfernt, fanden sich in beiden Fällen toxoplasmahaltige Pseudozysten.

Im Gehirn von Hunden, die von Toxoplasmen teils durch natürliche Ansteckung, teils durch experimentelle Übertragung befallen waren, beschrieb COHRS

(1952) zwei Formen der Veränderungen: eine mit Nekrosen einhergehende und eine andere, bei der in der Hirnsubstanz granulomartige Herde hauptsächlich aus Gliazellen gebildet wurden. In unseren beiden Fällen waren die histologischen Gehirnveränderungen der letzterwähnten Form ähnlich, und die entzündlichen Prozesse beschränkten sich fast ausschließlich auf den Hirnmantel.

In letzter Zeit tauchte die Frage auf, ob die zum Verenden der Hunde führenden Prozesse in den von Toxoplasmen befallenen Hunden von den Toxoplasmen allein hervorgerufen werden, oder ob in der Entwicklung der Krankheit nicht gegebenenfalls auch andere Faktoren mitwirken. In dieser Hinsicht beziehen wir uns auf die Mitteilungen von MÜLLER (1951), SEIBOLD und HOERLEIN (1955) sowie CAMPBELL, MARTIN und GORDON (1955), die bei Toxoplasmose in den verschiedenen Zellen die für Hundestaupe bezeichnenden azidophilen Zytoplasma-Einschlußkörperchen beobachteten und infolgedessen annehmen, daß das Virus der Hundestaupe Disposition zu Toxoplasmose erzeugt. In dem unserseits untersuchten ersten Hunde vermochten auch wir in den Epithelzellen der Bronchien azidophile Staupekörperchen zu beobachten. Wir haben daher den Eindruck, daß die Toxoplasmose auch in diesem Fall im Anschluß an die Hundestaupe als ihre Komplikation auftrat. Vermutlich war auch im zweiten Fall die Hundestaupe die Grundkrankheit, da die toxoplasmabedingte Enzephalitis in diesem Tier so schwach in Erscheinung trat, daß sie das Verenden allein nicht hervorrufen konnte.

Unsere Untersuchungsergebnisse bieten neuere Angaben zur Ätiologie der sog. »Hard pad disease«, da wir im ersten Fall das charakteristische Bild dieser Krankheitsform (Hyperkeratose des Nasenspiegel- und Sohlenpolsters, die Demyelinisation der markhaltigen Nervenfasern im Hirn) beobachteten. Auf Grund unserer Untersuchungsresultate sind wir in Übereinstimmung mit mehreren Autoren (LAUDER und Mitarbeiter, 1954 ; u. a.) der Meinung, daß die sog. Hard pad disease keine selbständige Krankheit darstellt, sondern sich vermutlich als eine Teilerscheinung der Hundestaupe entwickelt. Die Demyelinisation der markhaltigen Nervenfasern im Gehirn kommt unserer Ansicht nach wahrscheinlich auf allergischer Grundlage unter Mitwirkung des Hundestaupevirus zustande. Als Ursache der Demyelinisation könnte in unseren Fällen möglicherweise auch die Wirkung der von den Toxoplasmen erzeugten Toxine in Frage kommen. Dagegen spricht allerdings, daß zwischen dem Ausmaß der Demyelinisation und der Anzahl der Toxoplasmen kein Zusammenhang zu bestehen scheint, da die Demyelinisation in unserem zweiten Fall, wo Toxoplasmen nur in geringer Zahl anwesend waren, größeren Umfanges war als im ersten Fall, der eine schwerere Form der toxoplasmabedingten Enzephalitis aufwies.

Es ergibt sich die Frage, wie häufig mit dem Vorkommen der Toxoplasmose unter den Hunden in Ungarn gerechnet werden muß. In dieser Hinsicht bieten unsere verhältnismäßig wenigen Untersuchungen keine bewertbaren Ergebnisse. Die Tatsache jedoch, daß wir bei 2 von 20 unter neuralen Sympto-

men eingegangenen Tieren toxoplasmabedingte Enzephalitis bzw. Ansteckung mit Toxoplasmen feststellen konnten, beweist, daß diese Krankheit in Ungarn nicht selten vorkommt, insbesondere wenn wir berücksichtigen, daß wir nur die mit Neurosymptomen verbundenen Formen der Krankheit gesucht hatten. Das Ausmaß der Verseuchung ließe sich in größerem Maßstab lediglich durch serologische Untersuchungen feststellen, obwohl hinsichtlich der Zuverlässigkeit der verschiedenen serologischen Verfahren noch kein einheitlicher Standpunkt zutage tritt. Vom Gesichtspunkt des öffentlichen Gesundheitswesens deuten auch die bisherigen Ergebnisse darauf hin, daß mit der Toxoplasmose der Hunde auch in Ungarn gerechnet werden muß und hier, ebenso wie im Ausland vielfache Gelegenheit zur Übertragung auf Menschen besteht.

II.

Neben den an Hunden vorgenommenen systematischen Untersuchungen verfolgten wir auch die Toxoplasmaerkrankungen anderer Tierarten. Wenn bei den im Institut sezierten verschiedenen Tieren Veränderungen vorkamen, die Verdacht auf Toxoplasmose erwecken konnten, wurden die Organe der Kadaver eingehend histologisch untersucht und aus den Veränderungen aufweisenden Organen auch experimentelle Übertragungsversuche vorgenommen. Im weiteren teilen wir unsere bei einer Katze und bei einem Kaninchen gemachten Beobachtungen mit. Aus letzterem vermochten wir durch experimentelle Übertragung die Toxoplasmen zu isolieren.

Kadaver einer 4jährigen, kastrierten, schwarzen *Hauskatze* aus dem Besitz des Budapester Einwohners É. J. Klinische Diagnose : Enzephalitis.

Der *Sektionsbefund* der intraabdominalen und intrathorakalen Organe war im wesentlichen negativ. Die Blutgefäße der Hirnhäute waren erweitert, die Schnittfläche der Hirnsubstanz in der Gegend des rechten Nucleus caudatus war gelb gefleckt.

Bei der *histologischen Untersuchung* des Gehirns waren rechtsseitig, insbesondere im Nucleus caudatus, im Nucleus lentiformis und im vorderen Drittel des Thalamus, schwere Veränderungen zu sehen. An dem der seitlichen Hirnkammer unmittelbar benachbarten Abschnitt des Nucleus caudatus ist die Hirnstruktur in einer ziemlich schmalen Zone noch gut erkennbar. Die Wand der kleineren und größeren Blutgefäße ist verdickt und färbt sich mit Eosin intensiv und homogen, die Endothelzellen sind geschwollen, stellenweise verschwunden. Perivaskulär sind lymphozytäre und histiozytäre Infiltrationen sichtbar (Abb. 6). An den anderen Abschnitten des Nucleus caudatus sowie am kranialen Abschnitt des Nucleus lentiformis und des Thalamus ist die Hirnsubstanz völlig zerstört. Ihr spongiös aufgelockertes Gewebe ist mehr oder weniger mit Mikrogliazellen angefüllt (Abb. 7 und 8). Die Gliazellen sind an einzelnen Stellen gut gefärbt, vielenorts sind aber an ihrem Kern Anzeichen der Karyorrhexis zu beobachten. Das Plasma vieler Gliazellen ist von vakuolöser

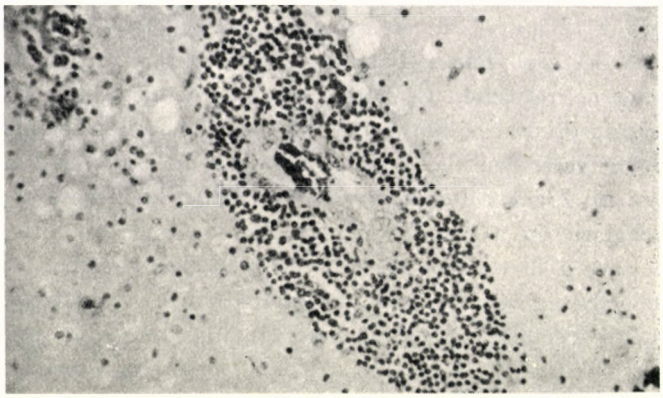


Abb. 6. Perivaskuläre Infiltration im Nucleus caudatus (Katze). H.-E.-Färbung. Vergrößerung 1:340

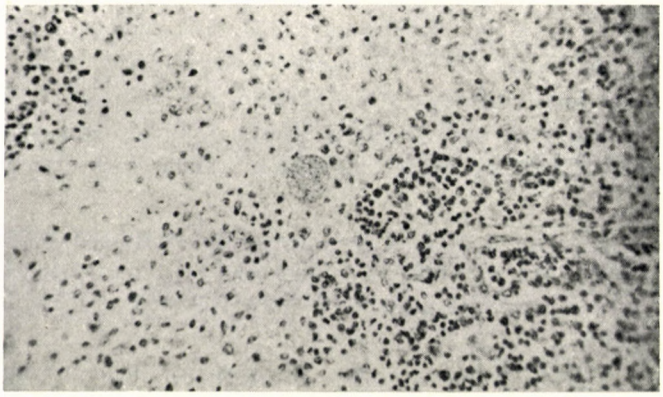


Abb. 7. Diffuse Infiltration im Nucleus caudatus. In der Mitte des Gesichtsfeldes eine Pseudozyste (Katze). H.-E.-Färbung. Vergrößerung 1 : 340

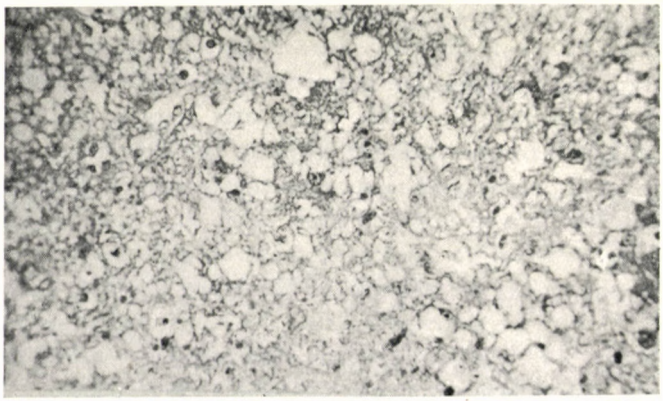


Abb. 8. Nucleus caudatus. Aufgelockerte, spongiöse Hirnsubstanz (Katze). H.-E.-Färbung. Vergrößerung 1 : 340

Struktur. Die Vakuolen erweisen sich nach Sudan III- bzw. Scharlachrotfärbung größtenteils als Fett-Tröpfchen (Fettkörnchenzellen). Auf den von Gliazellen infiltrierten und nekrotischen Gebieten sind die Umrisse der Blutgefäße nur verschwommen zu erkennen, der Kern der Endothelzellen ist blaß gefärbt, ja stellenweise sogar verschwunden oder pyknotisch. In der Wand mehrerer Blutgefäße können im Plasma der adventitiellen Zellen kleinere und größere Fetttröpfchen nachgewiesen werden. Auch in den hie und da noch erkennbaren, schwer degenerierten Nervenzellen sind Fett-Tröpfchen sichtbar. Auf den vorhin beschriebenen Gebieten befinden sich in ziemlich großer Zahl toxoplasmahaltige Pseudozysten. Die Pseudozysten sind unregelmäßig verstreut, ihr Durchmesser beträgt im allgemeinen 10—15 μ, ihr Aufbau gleicht im wesentlichen dem der vorhergehend beschriebenen.

In anderen Gehirnregionen, und zwar im vorderen Drittel des Hirnmantels auf beiden Seiten, in stärkerem Ausmaß in der weißen als in der grauen Substanz sowie in der Gegend der Corp. quadrigemina, des linksseitigen Nucleus caudatus und Thalamus, sind rings um die kleineren und größeren Blutgefäße breite, aus Lymphozyten und Histiozyten bestehende, mantelartige Infiltrationen zu beobachten. Pseudozysten fanden wir in diesen Gebieten nur vereinzelt.

Die weichen Hirnhäute weisen an vielen Stellen starke lymphozytäre Infiltrationen auf.

Aus der Beschreibung geht hervor, daß die Toxoplasmen in der von uns untersuchten Katze, im Gegensatz zu der an den beiden Hunden beobachteten produktiven Enzephalitis, mit ausgedehnteren Nekrosen verbundene Prozesse herbeigeführt haben.

Das etwa 8 Monate alte, weiße Kaninchenweibchen ergab folgenden *Sektionsbefund:* Kadaver eines stark abgemagertes Tieres. Die Milz ist vergrößert, an ihren Randteilen sind linsengroße, an der Oberfläche etwas hervorstehende, in die Tiefe ungefähr keilförmig hineinreichende, anderswo hirsekorngroße, ungefähr runde grauweiße kleine Herde zu sehen. Die kleinen Herde sind von der Umgebung nicht scharf getrennt, ihre Schnittfläche ist grauweiß, im allgemeinen trocken und bröcklig. Die Schnittfläche einzelner kleinerer Herdchen ist schwach speckglänzend. Die Schleimhaut des Magens und Dünndarms ist etwas gerötet und stellenweise vaskulär injiziert. Die Umgebung der mesenterialen Lymphknoten ist serös infiltriert. Die mesenterialen Lymphknoten sind geschwollen, ihre Substanz ist ungewöhnlich weich. Ihre Schnittfläche ist gallerartig glänzend und sehr feucht. In der Substanz eines Lymphknotens sind einige hirsekorngroße, grauweiße, mattglänzende Herdchen zu sehen. Leber und Nieren sind normal. Die Lunge ist hellziegelrot und fühlt sich auf hirsekorngroßen Gebieten kompakt an. An ihrer Schnittfläche sind hirsekorn- bis kleinerbsengroße, grauweiße Herde mit verschwommenen Grenzen zu beobachten.

Die Blutgefäße der Hirnhäute sind erweitert, die Hirnsubstanz ist schwach ödematös infiltriert. Die aus der Milz, der Leber und den mesenterialen Lymph-

knoten vorgenommenen bakteriologischen Untersuchungen fielen negativ aus. Im Ausstrichpräparat aus der Milz vermochten wir durch mikroskopische Untersuchung Toxoplasmen nicht nachzuweisen.

Histologische Untersuchung: Die Milz ist im allgemeinen blutreich, die Zellen der roten Pulpa sind locker gelagert. Zwischen den Pulpazellen befindet sich eine seröse Flüssigkeit. Hie und da sind unter der Milzkapsel auch kleinere oder größere Blutungen sichtbar. In der Milzsubstanz kann man verstreut, den makroskopisch beobachteten Herden entsprechend, Nekrosegebiete wahrnehmen. Die ausgedehnteren nekrotischen Gebiete liegen unmittelbar unter der



Abb. 9. Ausgedehnter Nekroseherd in der Milzsubstanz (Kaninchen). H.-E.-Färbung. Vergrößerung 1 : 80

Milzkapsel und erinnern an Infarkte (Abb. 9). In ihrer mit Hämatoxylin-Eosin im allgemeinen homogen rosa gefärbten Substanz sind die Umrisse der Zellen und Blutgefäße nur verschwommen zu erkennen. Die nekrotischen Gebiete enthalten dicht gelagerte kleinere und größere Fett-Tröpfchen. Am Rand der Nekrosegebiete sind hie und da in geringer Anzahl neutrophile Granulozyten und Lymphozyten anzutreffen. Die in anderen Abschnitten der Milzsubstanz anwesenden nekrotischen Gebiete sind im allgemeinen kleiner als die vorigen, rund oder unregelmäßig geformt, und befinden sich einmal in der roten Pulpa, ein andermal in den Malpighischen Körperchen. In der roten Pulpa und in den Malpighischen Körperchen ist die Wand einzelner Blutgefäße verdickt und mit Eosin homogen hellrot gefärbt.

In den mesenterialen Lymphknoten sind die Follikel auseinandergeschoben, die Substanz der Lymphknoten ist aufgelockert, die Gewebsspalten sind mit seröser Flüssigkeit gefüllt. In der aufgelockerten Lymphknotensubstanz treten unregelmäßig geformte nekrotische Gebiete in Erscheinung, die im wesentlichen ähnlichen Aufbau zeigen wie die in der Milzsubstanz beschriebenen Nekroseherde.

Nach langem Suchen sind in der Milz, in der Umgebung der Nekrosen, sowie in den Lymphknoten winzige pseudozystenartige Gebilde zu sehen. Freie Toxoplasmaexemplare vermochten wir nicht zu finden.

In der Lunge sind an mehreren Stellen, auf umschriebenen, runden oder unregelmäßig geformten Gebieten, die Alveolen mit proliferierendem Bindegewebe angefüllt. Im Gehirn, in der grauen Substanz der Hirnrinde, unmittelbar unter der Hirnhaut sowie im Hirnstamm sind kleinere, hauptsächlich aus Gliazellen bestehende Herdchen sichtbar (Abb. 10). Pseudozysten konnten wir in diesen Herden nicht nachweisen.

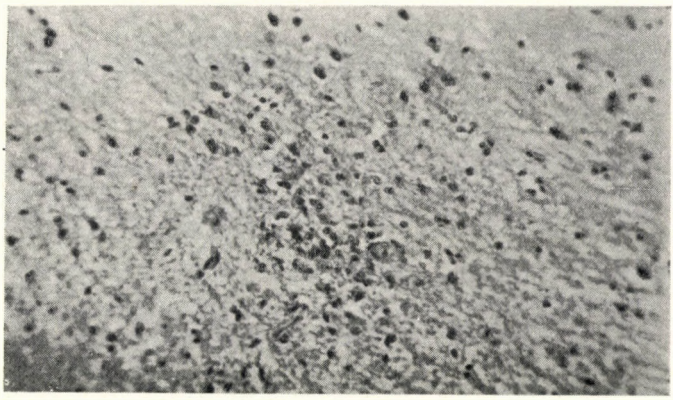


Abb. 10. Hauptsächlich aus Gliazellen bestehender kleiner Herd in der Hirnrinde (Kaninchen). H.-E.-Färbung. Vergrößerung 1 : 340

III.

Aus der Milz des oben besprochenen Kaninchenkadavers versuchten wir, die Toxoplasmen durch experimentelle Übertragung auf Versuchstiere zu isolieren. Wir bereiteten aus der Milz des Kaninchens mit physiologischer Kochsalzlösung eine Suspension, von dem wir 0,3—0,4 ml in die Bauchhöhle von 2 Mäusen spritzten. Nach der Impfung wiesen die beiden Mäuse keinerlei Krankheitssymptome auf. Eine der Mäuse töteten wir 5 Wochen nach der Impfung ; die aus ihrem Hirn bereitete Emulsion wurde in die Bauchhöhle von 4 Mäusen injiziert. 3 Mäuse gingen am 10., 12. und 19. Tage nach der Impfung ein. Die mikroskopische Untersuchung der Ausstrichpräparate aus der Bauchhöhlenflüssigkeit, aus der Milz und Leber auf Anwesenheit von Toxoplasmen fiel in allen Fällen negativ aus. Im Gehirn der am 19. Tage eingegangenen Maus fanden wir jedoch bei der histologischen Untersuchung (die anderen Mäuse waren diesbezüglich nicht untersucht worden) zahlreiche Pseudozysten, die sich ohne jede Reaktion im Hirngewebe befanden. In den weichen Hirnhäuten war eine umschriebene, chronische Entzündung festzustellen. Die 4. Maus wurde am 64. Tage nach der

Impfung getötet. Die histologische Untersuchung ergab das gleiche Resultat wie bei der am 19. Tage eingegangenen Maus.

Mit dem aus dem Gehirn der am 64. Tage getöteten Maus mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellten Suspension infizierten wir 10 Mäuse und 2 Goldhamster durch Einspritzung in die Bauchhöhle. 5 Mäusen verabreichten wir gleichzeitig mit der Suspension und nochmals 24 Stunden später jeweils 5 mg Cortison-Azetat subkutan. Vom 4. Tage nach der Infektion beginnend, untersuchten wir die intraabdominale Flüssigkeit täglich oder zweitäglich auf Anwesenheit von Toxoplasmen. In der Bauchhöhlenflüssigkeit der mit Cortison-

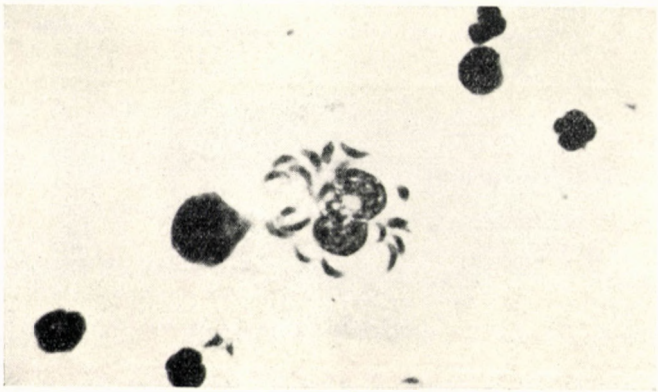


Abb. 11. Freie Toxoplasmen in der Bauchhöhlenflüssigkeit einer Maus. Experimentelle Übertragung. Färbung nach GIEMSA. Vergrößerung 1 : 480

Azetat behandelten Mäuse waren vom 6. Tage an, bei einem Teil der nicht mit Cortison-Azetat behandelten Tiere vom 8. Tage an auf den nach *Giemsa* gefärbten Ausstrichpräparaten teils frei anwesende, teils in Zellen eingeschlossene Toxoplasmen nachweisbar (Abb. 11). Die mit Cortison-Azetat behandelten 5 Mäuse gingen am 9. und 10. Tage nach der Infektion ein. 1—2 Tage vor dem Verenden waren die Mäuse matt. Die Toxoplasmen waren in den Ausstrichpräparaten aus dem Bauchhöhlenexsudat sowie der Milz und Leber sämtlicher Mäuse feststellbar. Von den nicht mit Cortison-Azetat behandelten Mäusen gingen 3 am 11. und 12. Tage nach der Infektion ein; auch ihre Untersuchung auf Anwesenheit von Toxoplasmen ergab ein positives Resultat. Zwei mit Cortison-Azetat nicht behandelte Mäuse verendeten erst am 28. und 29. Tage. Bei sämtlichen Mäusen, die 9—12 Tage nach der Infektion verendeten, beobachteten wir anläßlich der Sektion Darmentzündung, mäßige Milzschwellung, Leberschwellung und dicht gelagerte, nadelstichgroße graue Herde in der Leber. Bei der histologischen Untersuchung finden sich in der Leber der Mäuse unregelmäßig gelagerte, stellenweise konfluierende Nekroseherde, die zur Umgebung hin nicht von entzündlicher Reaktion umschlossen sind. Die Leberzellkerne sind im Allgemeinen geschrumpft

und dunkel gefärbt oder in geringerem oder größeren Maße gequollen und enthalten grobkörniges Chromatin. In der Lebersubstanz sind verstreut Toxoplasmahaufen zu erkennen. In der Milz sind histologisch ebenfalls frei anwesende Toxoplasmen nachweisbar. In der Niere eines Tieres waren freie Toxoplasmen auch in den Glomeruli. In der Lunge ist das histologische Bild einer beginnenden interstitiellen Pneumonie sichtbar, die freien Toxoplasmen liegen in Häufen. Im Gehirn einiger der an akuter Toxoplasmose verendeten Mäuse befanden sich aus Gliazellen bestehende kleine Herde sowie hie und da in Gruppen freie Toxoplasmen.

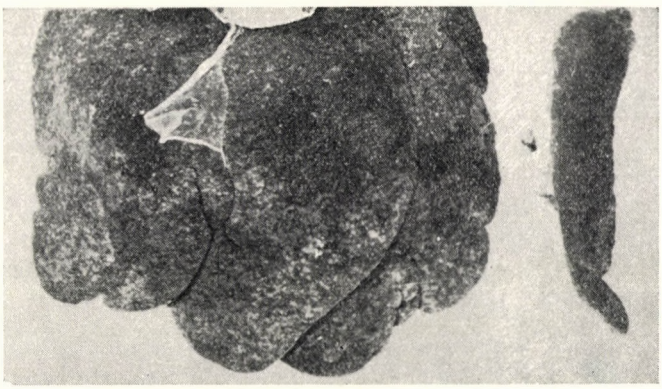


Abb. 12. Milzschwellung, Nekroseherde in der Leber und Milz (Kaninchen). Experimentelle Übertragung

Zwei der nicht mit Cortison-Azetat behandelten Mäuse, von denen eine in ihrer Bauchhöhlenflüssigkeit Toxoplasmen enthielt, verendeten, wie schon erwähnt wurde, erst am 28. und 29. Tage nach der Infektion. Bei einer dieser Mäuse war in den dem Verenden vorangehenden Tagen die partielle Lähmung der hinteren Extremitäten festzustellen. Bei der Sektion war nichts als eine mäßige Milzschwellung zu sehen, Toxoplasmen waren in der Bauchhöhlenflüssigkeit in der Milz und Leber nicht vorhanden. Das Gehirn dieser Mäuse wurde nicht untersucht.

Die beiden Goldhamster hockten vom 3.—4. Tage nach der Impfung zusammengekauert im Käfig, waren appetitlos, magerten in kurzer Zeit stark ab und verendeten am 15. Tage nach der Ansteckung. Bei der Sektion vermochten wir neben der Abmagerung nichts festzustellen. In den aus Bauchhöhlenflüssigkeit, Milz und Leber hergestellten Ausstrichpräparaten waren Toxoplasmen nicht nachweisbar. Bei der histologischen Untersuchung sah man in der Leber Aktivierung der RES-Zellen und hie und da die Bildung von submiliaren Herdchen, die aus RES-Zellen bestanden. In der Lunge waren interstitielle Pneumonie und einige winzige Pseudozysten, in der Herzmuskulatur herdartige histiozytäre und lymphozytäre Infiltration und in den Herzmuskelfasern gut ausgebildete

Pseudozysten zu beobachten. Das Gehirn enthielt produktive, vor allem aus Gliazellen bestehende Herde und Pseudozysten.

Mit der Bauchhöhlenflüssigkeit einer an akuter Toxoplasmose erkrankten Maus infizierten wir zwei Kaninchen, und zwar in der Weise, daß wir in die Bauchhöhle der kranken Maus 2 ml physiologische Kochsalzlösung einführten und 0,2 bzw. 0,4 ml der zurückgewonnenen toxoplasmahaltigen Flüssigkeit den Kaninchen intravenös injizierten. Die Tiere verendeten am 5. und 6. Tage nach der Ansteckung. Bei der Sektion waren in beiden Kaninchen Milzschwellung, in Leber und Milz zahlreiche nekrotische Herde (Abb. 12), Dünndarmentzündung, Schwellung der mesenterialen Lymphknoten und Lungenödem festzustellen. Die Versuchskaninchen wiesen demnach im wesentlichen dieselben Veränderungen auf wie das Ausgangsmaterial, die auf natürliche Weise erkrankten Kaninchen.

Zusammenfassung

Im vergangenen und gegenwärtigen Jahr wurden 8 Monate hindurch alle sezierten Hunde, bei denen im Leben neurale Symptome aufgetreten waren, auf Toxoplasmose untersucht. Bei 2 der 20 untersuchten Hunde konnte histologisch toxoplasmabedingte produktive herdartige Enzephalitis bzw. Befall mit Toxoplasma festgestellt werden. Auf Grund der in einem Hundekadaver in den Epithelzellen der Bronchien nachgewiesenen azidophilen Staupekörperchen wird angenommen, daß in diesem Fall die Toxoplasmose im Anschluß an Hundestaupe aufgetreten war. Im weiteren wurde im Laufe der Routineuntersuchungen bei einer unter neuralen Symptomen zugrunde gegangenen Katze und bei einem Kaninchen Toxoplasmose nachgewiesen. Aus dem Kaninchenkadaver konnte durch Überimpfung auf Versuchstiere ein neuer Toxoplasma-Stamm isoliert werden. Bei den mitgeteilten Toxoplasmosefällen handelt es sich um die ersten diesbezüglichen Beobachtungen in Ungarn an Hund, Katze und Kaninchen.

LITERATUR

1. Bringmann, G. u. Holz, J.: Ztschr. Tropenmed. Parasit. **5**, 54 (1954); ref. Vet. Bull. **25**, 406 (1955).
2. Campbell, R. S. F., Martin, W. B., Gordon, E. D.: Vet. Rec. **67**, 708 (1955).
3. Cohrs, P.: Dtsch. Z. Nervenheilk. **168**, 227 (1952); ref. Zbl. Bakt. Ref. **154**, 65 (1954).
4. Cohrs, P., Carstensen, H.-Ch.: Dtsch. Tierärztl. Wschr. **59**, 161 (1952).
5. Csermely, H.: Orv. Hetil. **94**, 1052 (1953).
6. Erichsen, S., Harboe, A.: Acta Path. Microbiol. Scand. **33**, 56 (1953).
7. Fankhauser, R.: Schweiz. Arch. Tierheilk. **92**, 217 (1950); **93**, 128 (1951).
8. Flir, K.: Mh. Vet. Med. **9**, 197 (1954).
9. Focher, L.: Gyermekgyógy. **2**, 39 (1951).
10. Holz, J.: Tierärztl. Umsch. **8**, 88 (1953).
11. Jasper, D. E.: J. A. V. M. A. **118**, 22 (1951).
12. Kardeván, A., Kapp, P.: Magy. Állatorv. L. **6**, 363 (1951).
13. Lauder, I. M., Martin, W. B., Gordon, E. B., Lawson, D. D., Campbell, R. S. F. und Watrach, A. M.: Vet. Rec. **66**, 607 (1954).
14. Leichner, Zs., Szepes, I.: Orv. Hetil. **92**, 124 (1951).
15. Moulton, J. E., Linton, G. A.: Cornell Vet. **43**, 445 (1953).
16. Müller, T.: Nord. Vet. Med. **3**, 1973 (1951); ref. Zbl. Bakt. Ref. **154**, 66 (1954).
17. Otten, E., Westphal, A., Kajahn, E.: Mh. Prakt. Tierheilk. **2**, 305 (1950); ref. Vet. Bull. **22**, 71 (1952).
18. Piekarski, G.: Klin. Mbl. Augenheilk. **119**, 1 (1951); ref. Zbl. Bakt. Ref. **154**, 77 (1954).
19. Wildführ, G.: Toxoplasmose, Jena, 1954.
20. Wildführ, G., Hudemann, H.: Zbl. Bakt. Orig. **159**, 115 (1952—53).
21. Weinstein, P.: Szemészet, **91**, 85 (1954).
22. Zoltai, N., Csaba, K.: Népegészségügy, **34**, 331 (1953).

ÜBER DIE BEWERTUNG DER LABORATORIUMSUNTERSUCHUNGSRESULTATE BEI DEN MIT CHLORAMPHENICOL BEHANDELTEN TYPHUSKRANKEN

Von

I. Fűrész, M. Kubinyi-Schwanner und Gy. Józsa

Staatliches Institut für Hygiene und László-Krankenhaus, Budapest

(Eingegangen am 8. August 1956)

Durch die Anwendung von Chloramphenicol (im weiteren Chl.) in der Therapie der Typhuserkrankungen hat sich nicht nur der klinische Verlauf des Typhus verändert, sondern auch die Notwendigkeit einer Revision in der Bewertung der diagnostischen Laboratoriumsverfahren ergeben. In erster Linie gilt dies für die Widalsche Reaktion. Über ihr verändertes Verhalten stehen zahlreiche Literaturangaben zur Verfügung, die aber durchaus kein einheitliches Bild zeigen. Nach einigen Autoren wird die Widalsche Reaktion von Chl. überhaupt nicht beeinflußt (Scuro und Sorice [1], Bechermann und Otto [2], Broglie [3], Romano [4], Woodward [5], Knight und Mitarbeiter [6], Foster und Condon [7], Mollaret [8] und viele andere). Sehr viele Autoren behaupten hingegen, daß der Widalsche Titer bei der Chl.-Behandlung rasch sinkt, ja sogar negativ wird (Breda und Tasca [9], D'Alessandro und Bevere [10], Laporte [11], Musotto [12], Pellegrini [13], Fajn und Lihatschewa [14], Nadschmiddinow und Swesnikowa [15] u. v. a.). Laut Ángyán und Mitarbeitern [16] zeigt die Widalsche Reaktion im Laufe der Behandlung ausgeprägte Schwankungen. Die diesbezüglichen Meinungsverschiedenheiten gehen am deutlichsten aus der die Ergebnisse von 35 Autoren zusammenfassenden Tabelle von Scuro und Sorice [1] hervor. Hiernach wurden bei 543 Kranken sog. normale Agglutinintiter beobachtet, während die Titer bei 589 rasch sanken und bald negativ wurden. Ein Vergleich der verschiedenen Angaben wird dadurch erschwert, daß man in vielen Mitteilungen die O- und H-Agglutinine nicht unterscheidet bzw. gar nicht erwähnt und nur ganz allgemein von der Widalschen Reaktion spricht. Die wenigen Autoren, die sich mit der Entwicklung der O- und H-Titer befassen, stimmen im großen ganzen darin überein, daß der H-Titer von Chl. weniger beeinflußt wird und während der Krankheit weiter steigt, der O-Titer dagegen auf Chl.-Wirkung unverändert bleibt oder sinkt. Laut Matthaei [17], Knapp und Gerner [18], Romano [4], Christ [19], Seeliger und Vorlaender [20] entwickelt sich der O-Titer bei den mit Chl. behandelten Kranken entweder langsam oder überhaupt nicht, während der H-Titer von Chl. nicht wesentlich beeinflußt wird.

Auf Grund der vorstehend angeführten, durchaus nicht vollständigen An-

gaben hielten wir es für nötig, auch unserseits die Frage zu prüfen, wie die Chl.-Therapie auf die die Laboratoriumsergebnisse wirkt. Die WIDALsche Reaktion hielten wir auch bisher schon für eine nur mit Vorbehalt und Umsicht bewertbare indirekte Methode, die von zahllosen Faktoren abhängt und die bakteriologische Diagnose keinesfalls zu ersetzen vermag. Aus diesem Grunde beschränkten wir uns nicht allein auf die Beobachtung ihres Verhaltens, sondern verfolgten gleichzeitig auch die bakteriologischen Resultate, d. h. Züchtungen aus dem Stuhl und Hämokulturen.

Material und Methode

Aus dem Krankenmaterial des László-Krankenhauses wurden 76 Kranke systematisch nach folgendem Verfahren untersucht:

Von jedem Kranken entnahmen wir zweitäglich Blut und mit dem Rectumstäbchen Stuhl. Bei jedem neu aufgenommenen Kranken wurde also die erste Untersuchung bereits am Aufnahmetage, spätestens aber am folgenden vorgenommen. Aus den Blutsera führten wir mit dem bei uns und im ganzen Lande gebräuchlichen, von uns hergestellten H- und O-Diagnostikum bei jeder Gelegenheit von der Verdünnung 1 : 100 beginnend die O- und H-Agglutination durch. Die Ergebnisse wurden nach 20—22stündiger Inkubation mit dem Agglutinoskop abgelesen. Zwecks Vermeidung der subjektiven Bewertung und der sich daraus ergebenden Abweichungen wurde die Ablesung stets von derselben Person vorgenommen. Wir rechneten damit, daß sich der Krankheitserreger aus dem Blut oder Stuhl seltener züchten lassen wird als vor der Einführung der Antibiotikumtherapie, weshalb wir unsere Technik zu verbessern und möglichst viele positive Ergebnisse zu erzielen suchten. Von den Hämokulturen, d. h. von der die Blutgerinnsel enthaltenden Galle, strichen wir nicht nur nach 24 und 48 Stunden auf den Brillantgrün-Nährboden, sondern inkubierten diesen 6 Tage lang und stellten die ausgebreiteten Platten täglich fest. Die Stuhlproben wurden auf 3 Nährböden, Wismut-, Brillant- und Desoxycholatzitrat-Platten gestrichen, hiernach die rektalen Röhrchen in Anreicherungsnährboden gelegt und aus diesem nach 24 Stunden auf Wismut- und Brillantplatten gestrichen. Als anreichernden Nährboden verwendeten wir unter den zahlreichen zur Züchtung von Darmbakterien, hauptsächlich Salmonellen, gebräuchlichen Nährböden den von STOKES und OSBORN [21] neuerdings empfohlenen, Na selenit, Na taurocholat und Brillantgrün enthaltenden, der nach den vergleichenden Untersuchungen dieser Autoren die besten Resultate gibt. Der Nährboden wurde von uns in Modellversuchen kontrolliert.

Die Diagnose Typhus abdominalis wurde unter Berücksichtigung der klinischen Symptome, epidemiologischen Angaben und Laboratoriumsbefunde aufgestellt; hiernach litten 57 der untersuchten 76 Kranken wirklich an Typhus. Von diesen waren 7 weniger als 10, 20 Kranke 10—19 und 30 Patienten über 20 Jahre alt.

Untersuchungsergebnisse

Zweck unserer Untersuchungen war, wie schon erwähnt wurde, die aus der Chl.-Behandlung resultierenden Veränderungen der Laboratoriumsbefunde zu verfolgen. In den ausländischen Mitteilungen, die sich mit den Veränderungen der WIDALschen Reaktion beschäftigen, sind die Resultate nicht zusammengefaßt, sondern werden nur allgemein behandelt, oder man führt die auf jeden einzelnen Kranken bezüglichen Angaben gesondert an. Wir hielten dieses Verfahren nicht für genügend übersichtlich und waren daher bestrebt, unsere Ergebnisse nach einheitlichen Gesichtspunkten zusammenzustellen. Zur Aufarbeitung war es daher unbedingt erforderlich, daß uns von den Laboratoriums-

ergebnissen jedes einzelnen Kranken vom Zeitpunkt vor der Chl.-Behandlung, mindestens von 3 Untersuchungen während der Behandlung und auch von 2 Untersuchungen nach Beendigung der Therapie Angaben zur Verfügung standen. Von diesem Gesichtspunkt waren zur einheitlichen Aufarbeitung des Materials nur 39 der 57 untersuchten Kranken geeignet. Dies bedeutet jedoch nicht, daß wir nicht auch Kranke hatten, bei denen in den einzelnen Perioden viel mehr Untersuchungen vorgenommen wurden; neben den in der einheitlichen Aufarbeitung angeführten Patienten wird naturgemäß auch von diesen die Rede sein.

Die Kranken teilten wir in 3 Gruppen ein. In die erste Gruppe (a) nahmen wir die Kranken auf, bei denen zwischen Beginn der Erkrankung und Chl.-Behandlung weniger als eine Woche, in die zweite Gruppe (b) jene, bei denen ein bis zwei Wochen, in die dritte (c) diejenigen, bei denen mehr als zwei Wochen verstrichen waren.

Tabelle I/a enthält die Ergebnisse der 8 Kranken der ersten Gruppe.

Nur bei 2 Kranken war der Stuhl vor der Behandlung positiv, und bei der Hälfte der Kranken waren, wie zu erwarten war, in der Zeit vor der Behandlung die Hämokulturen positiv. Die Anzahl der Kranken mit 1 : 100 oder höherem H- oder O-Titer war vor, während und nach der Chl.-Behandlung praktisch unverändert.

Tabelle I/b zeigt die Angaben der 18 Kranken, bei denen zwischen Krankheitsbeginn und Chl.-Dosierung 1—2 Wochen verstrichen waren.

In dieser Gruppe war bereits der Stuhl bei der Hälfte der Kranken positiv, die Hämokultur hingegen, wie zu erwarten war, nur in 4 Fällen. Die Züchtbarkeit des Krankheitserregers aus dem Stuhl während der Behandlung verringerte sich sehr rasch, und auch hier wurde die Hämokultur in allen Fällen negativ. Die Anzahl der Kranken mit bewertbaren H- und O-Titer war praktisch bis zuletzt unverändert.

Die Befunde der 13 Kranken der 3. Gruppe, bei denen seit dem Krankheitsbeginn mehr als 2 Wochen verstrichen waren, sind auf Tabelle I/c veranschaulicht.

Es erscheint auffallend und widersinnig, daß der Krankheitserreger, obwohl in dieser Gruppe vor Beginn der Behandlung die meisten positiven Stuhlbefunde hätten festgestellt werden müssen, lediglich bei 3 Kranken aus dem Stuhl gezüchtet werden konnte und gleichzeitig in 2 Fällen bei der Krankenhausaufnahme auch noch positive Hämokulturen beobachtet wurden. Dieses scheinbar widersprechende Ergebnis kann darauf zurückzuführen sein, daß diese Gruppe mehrere Kranke enthielt, die mit Rezidiv aufgenommen wurden. Die Widalsche Reaktion war bei 11 bzw. 8 Kranken beim Titer 1 : 100 oder darüber positiv, die Anzahl der H-Titer aufweisenden Kranken praktisch unverändert und der O-Titer bei jeweils einem Kranken mehr während und nach der Behandlung positiv.

Einfluß der seit Krankheitsbeginn bis zum Beginn der Chloramphenicolbehandlung verstrichenen Zeit auf die Laboratoriumsbefunde

Tabelle I/a

Seit Ausbruch der Krankheit verstrichene Zeitdauer: 1 Woche.
Anzahl der Kranken: 8

Untersuchung	Vor der Behandlung	Am 2.	4.	6.	2.	4. Tage
		während der Behandlung			nach der Behandlung	
	Anzahl der Kranken mit positivem Befund					
Stuhl	2	1	2	—	1	1
Hämokultur	4	1	—	—	—	—
WIDAL 1/100 oder höherer Titer						
»H«	5	5	5	5	6	4
»O«	5	5	6	7	6	7

Tabelle I/b

Seit Ausbruch der Krankheit verstrichene Zeitdauer: 1—2 Wochen.
Anzahl der Kranken: 18

Untersuchung	Vor der Behandlung	Am 2.	4.	6.	2.	4. Tage
		während der Behandlung			nach der Behandlung	
	Anzahl der Kranken mit positivem Befund					
Stuhl	9	6	2	2	2	3
Hämokultur	4	2	1	—	—	—
WIDAL 1/100 oder höherer Titer						
»H«	12	11	12	15	12	9
»O«	13	12	15	17	13	9

Tabelle I/c

Seit Ausbruch der Krankheit verstrichene Zeitdauer: mehr als 2 Wochen.
Anzahl der Kranken: 13

Untersuchung	Vor der Behandlung	Am 2.	4.	6.	2.	4. Tage
		während der Behandlung			nach der Behandlung	
	Anzahl der Kranken mit positivem Befund					
Stuhl	3	2	2	1	1	1
Hämokultur	2	2	—	—	—	1
WIDAL 1/100 oder höherer Titer						
»H«	11	12	12	10	10	11
»O«	8	9	9	9	9	9

Die Entwicklung der WIDALschen Titer und ihre geometrischen Mittelwerte bei den 3 Gruppen ergeben sich aus Abb. 1.

Wie aus Abb. 1 hervorgeht, sind die H-Titer höher als die O-Titer. Auffallenderweise sind die H-Titer der ersten Gruppe höher als die der zweiten, doch handelt es sich letzten Endes nur um eine Verdünnungsdifferenz, d. h. um den Titer 1 : 200 oder 1 : 400, so daß die Abweichung nicht signifikant sein

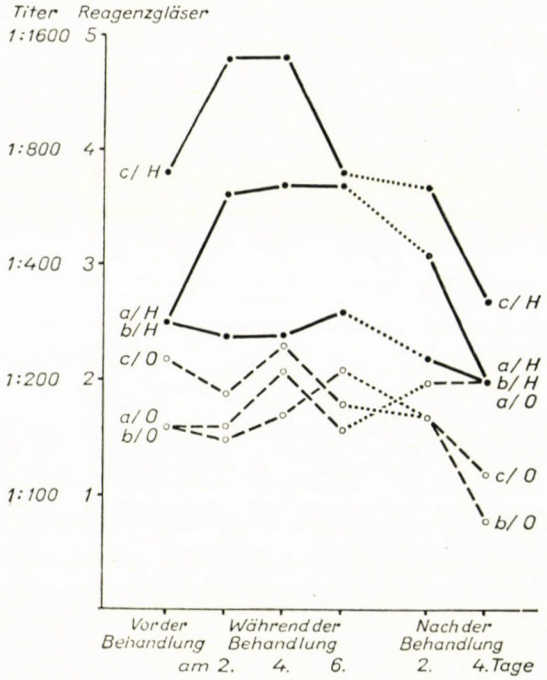


Abb. 1. Entwicklung der durchschnittlichen WIDALschen Titer nach Krankengruppen

kann. Wie zu erwarten war, fanden wir die höchsten H-Titer im Blutserum der dritten Gruppe, d. h. bei den Kranken, die nach der längsten Periode ohne Behandlung ins Krankenhaus aufgenommen wurden. Die O-Titer der drei Gruppen zeigen ähnlichen Verlauf, keiner steigt über den Wert 1 : 200. Nach Abb. 1 besteht demnach in der Entwicklung der O-Agglutinine, in welcher Krankheitsperiode die Chl.-Behandlung auch immer begonnen wurde, kein wesentlicher Unterschied. Im Verhältnis zu den Ausgangswerten können wir bei den H-Titern höchstens auf eine einer Verdünnungsdifferenz entsprechenden Erhöhung rechnen. Auch der O-Titer verhält sich ähnlich und weist am 4. oder 6. Tage der Therapie geringe Erhöhung auf, was bei der üblichen Methodik möglicherweise gar nicht wahrgenommen wird.

Bei den bisher mitgeteilten Angaben handelt es sich, wie bereits erwähnt wurde, um Durchschnittswerte. Wir halten es deshalb für nötig, uns mit den Kranken der einzelnen Gruppen noch eingehender zu befassen.

Bei der ersten Gruppe (a) wurden in Wirklichkeit nicht 8, sondern 11 Kranke untersucht. Bei 5 konnten aus dem Stuhl weder während noch nach der Behandlung jemals Typhusbazillen gezüchtet werden ; indessen befand sich in dieser Gruppe ein Kranker, aus dessen Stuhl der Erreger 8mal gezüchtet wurde. Der H-Titer von 4 Kranken stieg auf 1 : 800 oder darüber hinaus, bei 3 Kranken ergab der O-Titer ein-zweimal 1 : 800 ; diese Beobachtung hätten wir nicht machen können, wenn wir — wie in der Praxis üblich — die Untersuchungen wöchentlich einmal vorgenommen hätten. Demgegenüber bestand bei 3 Kranken während der ganzen Untersuchungsdauer niemals auch nur ein H- oder O-Titer von 1 : 100. Die höchsten H- und O-Titer sahen wir bei dem Kranken, bei dem der Krankheitserreger 8mal aus dem Stuhl gezüchtet werden konnte.

In der zweiten Gruppe (b) vermochten wir die Befunde von sämtlichen 18 Kranken aufzuarbeiten. Wie schon aus der Tabelle hervorgeht, konnte der Krankheitserreger aus dem Stuhl von 9 Kranken niemals kultiviert werden. Dagegen beobachteten wir einen Kranken, aus dessen Stuhl Typhusbazillen bei 22 von 28 Untersuchungen gezüchtet werden konnten ; gleichzeitig stieg der H-Titer dieses Kranken bis zu 1 : 3200, der O-Titer bis 1 : 800. Bei einem anderen Kranken ließ sich der Erreger bei 17 von 25 Untersuchungen züchten. In diesem Fall war jedoch keine Erhöhung der H- und O-Titer festzustellen. Auch in dieser Gruppe gab es zwei Kranke, bei denen kein bzw. nach mehrmaliger Untersuchung jeweils einmal ein H- oder O-Titer 1 : 100 festgestellt wurde.

Die dritte Gruppe (c) enthielt in Wirklichkeit 24 Kranke, doch waren im Hinblick auf die vorhin erwähnten Gesichtspunkte nur die Befunde von 13 zur Aufarbeitung geeignet. Dies war die am wenigsten einheitliche Gruppe, da es sich ja um Kranke mit 14—30tägiger Anamnese handelte. Aus dem Stuhl von 14 Kranken konnten wir den Krankheitserreger niemals züchten, hingegen war die Hämokultur bei 4 Kranken vor der Behandlung positiv. Während des Krankenhausaufenthalts wurde die Hämokultur noch bei weiteren 5 Kranken positiv. Die positive Hämokultur während oder nach der Behandlung stellten wir in 3 Fällen gleichzeitig mit dem Auftreten neuer klinischer Symptome, vor allem dem Erscheinen des Fiebers, d. h. eines Rezidivs fest, doch sei interessanterweise bemerkt, daß wir positive Hämokulturen in 2 Fällen am Ende der 4. Krankheitswoche sahen und diese nicht von klinischen Symptomen begleitet waren. Bei einem Kranken war dies der einzige positive bakteriologische Befund während der ganzen Krankheitsdauer, obwohl die WIDALsche Reaktion bereits bei der Aufnahme einen O-Titer von 1 : 1600 ergab. Im Laufe der Behandlung sank dieser Titer sodann. Während der ganzen Untersuchungsperiode beobachteten wir bei den 57 Kranken insgesamt 8 Rezidive. Diese Zahl ist nicht als hoch zu bezeichnen ; verschiedene Autoren beobachteten während der Chl.-Therapie im allgemeinen mehr Rezidive.

4 Kranke wurden ins Krankenhaus mit positivem bakteriologischen Befund, aber bereits symptomfrei aufgenommen ; diesen verabreichten wir

kein Chl., so daß sie in unserer Statistik nicht berücksichtigt werden konnten. Ihre Anzahl ist jedoch so gering, daß sie gegenüber den Behandelten keine Vergleichsgrundlage bieten.

Wie bereits einleitend erwähnt, wurden die Hämokulturen 6 Tage inkubiert und auf Brillantgrün-Nährböden übertragen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle II zusammengefaßt.

Tabelle II

Anzahl der positiven Hämokulturen nach der Inkubationsdauer

Inkubationsdauer in Tagen	Positiver Befund
1	13
2	9
3	6
4	1
5	—
6	1
Insgesamt :	30

Wie aus Tab. II hervorgeht, wären 7 der 30 positiven Hämokulturen verlorengegangen, wenn wir die Kulturen nicht 4 Tage lang inkubiert hätten; eine weitere positive Hämokultur gewannen wir am 6. Tage. Auf Grund dieses Befundes erscheint es unbedingt angezeigt, daß wir uns nicht mit 2tägiger Inkubation begnügen, sondern die Hämokulturen *mindestens* an 4 aufeinanderfolgenden Tagen inkubieren lassen.

Die bei Anwendung des anreichernden Nährbodens gewonnenen Resultate sind auf Tabelle III wiedergegeben.

Tabelle III

Durch unmittelbare Untersuchung und mit dem Anreicherungsverfahren gewonnene positive Züchtungsergebnisse

Befund		Zahl der Fälle
Unmittelbare Untersuchung	Anreicherung	
+	—	20
+	+	52
—	+	19
	Insgesamt	91

Wir gewannen insgesamt 91 positive Züchtungsergebnisse. In 19 dieser Fälle konnten die Typhusbazillen nur bei Anwendung des anreichernden Nähr-

bodens gezüchtet werden. Die Anreicherung wird in unserer Abteilung seit einiger Zeit auch routinemäßig bei der Aufarbeitung der mit der Bezeichnung »Bazillenwirt« bzw. »krank« eingesandten Untersuchungsmaterialien vorgenommen. Diese Resultate waren besser als bei den vorhin angeführten: bisher gewannen wir bei 22 von 71 positiven Untersuchungen nur durch Anreicherung positive Ergebnisse.

Die Behandlung von Typhuskranken mit Chl. wird bereits seit Jahren ausgeübt. Deshalb erschien es uns zweckmäßig zu untersuchen, ob wirklich sämtliche Typhusstämme Chl. gegenüber Empfindlichkeit aufweisen. Wir untersuchten mit der Reagenzglas-Verdünnungsmethode die Chl.-Empfindlichkeit von 200 aus Bazillenwirten und 200 aus Kranken gezüchteten Stämmen. Die Ergebnisse sind auf Tabelle IV zusammengefaßt.

Tabelle IV

Chloramphenicol-Empfindlichkeit der aus dem Stuhl von Bazillenwirten und Kranken gezüchteten Typhusstämme

Chloramphenicol-Konzentration µg/ml	Anzahl der Wachstum aufweisenden Stämme	
	Bazillenwirte	Kranke
1,56	16	3
3,12	171	178
6,25	13	19
12,50	—	—
Insgesamt	200	200

Von 12,5 µg/ml Chl. wurde das Wachstum sämtlicher Stämme gehemmt. Bei 6,25 µg/ml wiesen bereits 13 bzw. 19 Stämme Wachstum auf. Die meisten Stämme wuchsen bei 3,12 µg/ml, woraus also hervorgeht, daß die Empfindlichkeit der überwiegenden Mehrheit der Stämme zwischen 6 und 3 µg/ml liegt.

Unter Berücksichtigung des Umstandes, daß der erzielbare Blutspiegel bei durchschnittlicher Chl.-Dosierung zwischen 16—32 µg/ml liegt, reicht die unserseits festgestellte Empfindlichkeit unbedingt aus, um von Chl. auch weiterhin gute therapeutische Resultate erwarten zu können.

Es sei bemerkt, daß der größte Teil der von Bazillenwirten gezüchteten 200 Stämme von verschiedenen Personen herrührte, während wir von ein und demselben Kranken auch mehrere Stämme untersuchten, wenn wir solche zu züchten vermochten. Es ist daher erwähnenswert, daß der bei der 22. bzw. 17. Züchtung isolierte Stamm derselben Kranken, bei denen wir den Krankheitserreger aus dem Stuhl 22- bzw. 17mal züchten konnten, dieselbe Empfindlichkeit aufwies wie die das erste Mal kultivierten Stämme. D. h. im Laufe der Behand-

lung entwickelte sich keine Chl.-Resistenz. Dies steht im Widerspruch zu der unseres Wissens einzigen, in der Literatur mitgeteilten Beobachtung von COLQUHOUN und WEETCH [22], wonach der von einem Kranken gezüchtete, 12 μg/ml Chl. gegenüber empfindliche Typhusstamm nach erneuter Züchtung anläßlich eines Rezidivs im Anschluß an 20tägige Behandlung nur noch 35 μg/ml gegenüber Empfindlichkeit zeigte. Indessen genügen weder der einzige Fall der erwähnten Autoren noch unsere beiden Fälle, um hinsichtlich der gegebenenfalls in vivo zur Entwicklung kommenden Chl.-Resistenz Stellung nehmen zu können.

Besprechung

Auf Grund unserer Untersuchungen läßt sich in bezug auf die Verwendung und Bewertung der Laboratoriumsbefunde folgendes feststellen:

Die bakteriologische Diagnose bietet bessere Orientierung als die Ergebnisse der serologischen Reaktionen. Im Frühstadium der Krankheit ist auch weiterhin vor allem die Hämokultur entscheidend. Wir halten die Durchführung der Hämokultur auch im späteren Krankheitsstadium für wichtig, da sie bezüglich der seit Einführung der Chl.-Therapie häufiger vorkommenden Rezidive vielfach genaue Aufklärung gibt. — Aus dem Stuhl lassen sich die Typhusbazillen im Laufe der Chl.-Behandlung immer seltener züchten, und in der großen Mehrzahl der Fälle wird der Stuhl bereits in den ersten Tagen der Chl.-Verabreichung negativ. — Die Ergebnisse der WIDALschen Reaktion sind nur in sehr beschränktem Maße verwertbar und mit noch größerem Vorbehalt zu bewerten, als dies schon bisher geschah. Unabhängig davon, welche Zeitdauer zwischen dem Krankheitsausbruch und dem Beginn der Chl.-Dosierung verstrichen ist, können wir im allgemeinen nicht damit rechnen, daß der O- oder H-Titer während der Behandlung steigt. Hieraus folgt, daß wir bei einem klinisch Typhus entsprechenden Krankheitsbild die Diagnose auch dann aufrechterhalten müssen, wenn die Agglutinationstiter des Blutserums im Verlauf der Krankheit keine Erhöhung aufweisen, ferner auf Grund der vorangegangenen Ausführungen auch dann, wenn aus dem Stuhl während der ganzen Erkrankung Krankheitserreger niemals gezüchtet werden können. Hohe H- und O-Titer gewinnen wir im allgemeinen nur in den Fällen wo der Stuhl trotz der Chl.-Verabfolgung positiv bleibt; in diesen Fällen aber benötigen wir die Ergebnisse der WIDALschen Reaktion ohnehin nicht. Bei den mit Chl. Behandelten ist also die WIDALsche Reaktion auch zur retrospektiven Diagnose nicht geeignet. Letzten Endes müssen wir uns also in gesteigertem Maße auf die bakteriologischen Befunde stützen, weshalb es zweckmäßig erscheint, Anreicherungsnährböden zu verwenden bzw. die Hämokulturen mehrere Tage zu inkubieren.

Zusammenfassung

1. Die Laboratoriumsbefunde von 57 mit Chloramphenicol behandelten Typhuskranken wurden fortlaufend beobachtet.

2. Die negative WIDALsche Reaktion ist bei gleichzeitiger Chloramphenicolbehandlung noch vorsichtiger zu bewerten, als dies bisher geschah. Die H- und O-Titer weisen während der Erkrankung im allgemeinen keine Erhöhung auf. Infolgedessen zeugt das Ausbleiben der Titererhöhung bzw. eine positive WIDALsche Reaktion mit negativem oder nur niedrigem Titer nicht gegen Typhus. Hohe Titer sind im allgemeinen nur dann zu erwarten, wenn der Kranke den Krankheitserreger trotz der Behandlung längere Zeit hindurch entleert.

3. Im Laufe der Chloramphenicoltherapie verschwindet der Krankheitserreger gewöhnlich sehr rasch aus den Sekreten des Kranken.

4. Die zuverläßigsten Resultate ergeben sich auch weiterhin aus der zu Beginn der Erkrankung vorgenommenen Hämokultur.

5. Im Interesse der bakteriologischen Diagnose erscheint es zweckmäßig, die Hämokulturen mindestens vier Tage hindurch zu inkubieren und bei der Aufarbeitung des Stuhls neben der unmittelbaren Untersuchung auch flüssigen, anreichernden Nährboden zu verwenden.

6. Sämtliche untersuchten Typhusstämme (400) erwiesen sich Chloramphenicol gegenüber als empfindlich.

LITERATUR

1. SCURO, L. A., SORICE, F.: Clin. Ter. **3**, 407 (1953).
2. BECKERMANN, F., OTTO, G.: Dtsch. Med. Wschr. **14**, 66 (1951).
3. BROGLIE, M.: Ärztl. Wschr. **5**, 823 (1950).
4. ROMANO, A.: cit.: [1].
5. WOODWARD, T. E.: J. Amer. Med. Ass. **141**, 1097 (1949).
6. KNIGHT, V., RUIZ-SANCHEZ, F., MCDERMOTT, W.: Amer. J. Med. Sc. **219**, 627 (1950).
7. FOSTER, W. D., CONDON, R. J.: J. Amer. Med. Ass. **141**, 131 (1949).
8. MOLLARET, M.: cit.: [1].
9. BREDA, V., TASCA, G.: Excerpta Med. **4**, 7298 (1950).
10. D'ALESSANDRO, G., BEVERE, L.: cit. Scuro und Sorice.
11. LAPORTE, A. : cit. [1].
12. MUSOTTO, F.: Minerva Med. **42**, 177 (1951).
13. PELLEGRINI, M., BINI, P.: cit.: [1].
14. FAJN, O. I., LIHATSCHEWA, E. M.: Klin. Med. (Moskau). **31**, 6 (1953).
15. NADSCHMIDDINOW, T. H., SWESCHNIKOWA, E. S.: Klin. Med. (Moskau) **31**, 6 (1953).
16. ÁNGYÁN, J., BARNA, K., BURGER, T.: Orv. Hetil. **95**, 601 (1954).
17. MATTHAEI, F.: Münch. Med. Wschr. **93**, 887 (1951).
18. KNAPP, W., GERNER, W. D.: Ztschr. Hyg. **132**, 23 (1951).
19. CHRIST, P.: Dtsch. Med. Wschr. **76**, 722 (1951).
20. SEELIGER, H., VORLAENDER, K. O.: Ztschr. Immunitätsforsch. **110**, 128 (1953).
21. STOKES, J. L., OSBORN. W. W.: Applied Microbiol. **3**, 217 (1953).
22. COLQUHOUN, J., WEETCH, R. S.: Lancet **2**, 621 (1950).

PREPARATION OF TYPHOID VACCINE FROM SEPARATED ANTIGENIC COMPONENTS

I. PREPARATION OF PURIFIED O AND Vi ANTIGENS

By

L. GUNDA, I. JOÓ, P. RICHTER and A. VÁLI

"Human" State Vaccine Institute for Production and Research, Budapest

(Received August 16, 1956)

According to present knowledge, two antigenic components, the somatic O and Vi antigens, are responsible for all the immunobiological properties of *Salmonella typhi*. The flagellar antigen [4] does not play any role in this respect.

The immunological importance of the two antigens mentioned has been greatly confirmed by the extensive work carried out during the past two decades [1—9], in which numerous authors succeeded in isolating the two antigens in chemically pure form.

Despite the wide variety of methods employed for their isolation, the antigens obtained proved to be identical both chemically and immunobiologically, except for minor differences ; they possess the immunobiological properties of the intact cell and the active immunity induced by their use is not inferior to that induced by whole bacterial vaccines.

Chemical analysis has shown both antigens to be composed mainly of polysaccharides. The O antigen proved to be a lipid-polysaccharide-protein molecular complex [7, 8, 9, 10]. Recent investigations have revealed that the protein component of the O antigen does not play any significant role in inducing immunity. The lipopolysaccharide itself, which is very low in N, is at least as potent, or is even more potent, than the antigen complex complete with protein [10].

According to recent investigations, the Vi antigen is a polymer of N-acetylaminohexuronic acids [5]. The Vi antigen, too, occurs as a protein complex in the bacterial cell.

The antigenic substances are extracted from bacterial cultures by the use of chemicals breaking down protein, but leaving the polysaccharides unaffected. These agents separate the specific antigenic polysaccharide from the lipoprotein complex partially or completely. Such extractors are trichloracetic acid [6], ethyleneglycol [13], phenol [14], 15, formamide [17], urea (17 a), acetic acid [10], dilute hydrochloric acid [5], *etc.* The antigenic substance can be derived from the bacterial cell also by digestion with trypsin, which causes the polysaccharides to go into solution along with the other products of protein digestion.

The single methods of extraction derive from bacteria antigenic substances of variable polysaccharide content. Acetic acid and trichloracetic acid yield an antigen relatively high in protein, whereas the formamide and phenolic extractions yield an antigenic substance higher in polysaccharide.

The work carried out recently by LANDY *et al.* which led to the preparation of purified Vi antigen [5, 12] and O antigen [10] is of great significance. LANDY *et al.* have produced a vaccine from the Vi antigen obtained from *E. coli* 5396/38 strain and from the O antigen obtained from strain Ty O 901 (both antigens were purified). The vaccine was tested first in animals and then in man [18, 19, 20, 21, 22]. The results were highly favourable from the point of view of potency and reactivity alike.

The experiments conducted over almost 2 years, which constitute the subject matter of the present paper, were intended to develop a method by which relatively pure O and Vi antigens could be prepared on a technical scale. The antigens had to be suitable for use in the preparation of a typhoid vaccine potent enough and causing little reaction.

In the first experiments the specific, antigenic polysaccharides were extracted from bacteria by treatment with phenol and formamide. Ammonium sulphate and alcoholic fractionation were employed for the separation of O and Vi antigens from the products of proteolysis and from polysaccharide contaminants. Only minute amounts of O and Vi antigen could however be obtained in this way. One antigen was contaminated by the other and none showed satisfactory immunological properties. The single batches showed variable precipitation titres. In a few cases treatment with formamide at 80° C strongly reduced the precipitating power of the O antigen. Better results were obtained by alcoholic fractionation oft he BOIVIN extracts of bacterial suspensions. However, the yield was very low, and the antigenic components could not be isolated satisfactorily.

The afore-mentioned difficulties induced us to try other methods. Bacteriolysis by trypsin digestion, as described by RAISTRICK and TOPLEY (16), proved superior to any of the methods metioned. The method is the gentlest one as well. By employing a modification of this method, O and Vi antigens could be separated and purified and the toxicity of the highly toxic O antigen could be reduced without any loss in activity.

As a result of our experiments, a method has been developed ensuring a relatively high yield of purified O and Vi antigen from *S. typhi* and of Vi antigen from *E. coli* and *P. ballerup*. The O antigen thus obtained is less toxic than the formerly known preparations, without being inferior to the latter in antigenicity.

This paper deals with the method of preparation and with some chemical properties of the antigenic substances obtained. The results of immunological studies will be described in Part II.

Materials and methods

Strains used. *S. typhi*$_2$, *S. typhi* 899, *S. typhi* Nova; *E. coli* 5396/38, *P. ballerup* 107.

Precipitating sera. O immune serum produced with strain O 901 in the rabbit. Agglutinin titre, 1 : 20 000. Vi immune serum produced in the rabbit with strain Ty 965 "pure Vi". Agglutinin titre, 1 : 3200.

Precipitation test. In a total volume of 0,5 ml serial dilutions are made with NaCl, beginning with dilution 1 : 2, and to each dilution is added 0,1 ml of concentrated or 1 : 3 diluted O or Vi immune serum. After 2 hours in a 45° C water bath the tubes are placed into a refrigerator overnight and then read.

Trypsin. Trypsin was obtained at our institute, by acetonic fractionation of the dilute alcoholic extract of bovine pancreas. Potency, 1 : 250 USP units.

Chemical tests.

Estimation of nitrogen. N was estimated by the semi-micro KJELDAHL method after digestion with sulphuric acid in the presence of selenium and copper sulphate [21].

Estimation of phosphorus. P was estimated by the FISKE and SUBBAROW method, using a PULFRICH photometer [21].

Test for amino acids. For the detection of amino acids by paper chromatography the test antigen was hydrolysed with 25 per cent HCl in a sealed ampoule, at 100° C for 16 hours. The hydrolysate was evaporated until dry in a water bath then it was dried *in vacuo* (after repeated wetting) until all HCl evaporated. The solid residue was taken up in 1 ml distilled water. The amount of the solution containing the amino acid hydrolysate to be added to the paper was adjusted according to the amount measured in. Macherey-Nagel 618 EH filter paper was used in two-dimensional paper chromatography. Phenol saturated with water and containing 0,1 per cent ammonia and traces of potassium cyanide was used for running in one direction, whereas in the other direction butanol : glacial acetic acid : water (40 : 10 : 50) served as solvent. An 0,2 per cent ninhydrin in butanol was used as developer.

Demonstration of sugar components. The test antigen in a sealed ampoule is hydrolysed with 0,5 *N* sulphuric acid at 100° C for 8 hours. After that $Ba(OH)_2$ is added to neutralise the sulphuric acid. The precipitated hydrolysate is filtered and the filtrate is dried *in vacuo* at not more than 30° C. The solid residue is diluted to the required volume with distilled water. From this stock solution such a volume is added to the filter paper Schleicher Schüll 2043/b that the test dose of each carbohydrate component be around 20 μg. An aliqout mixture of butanol : pyridine : water (6 : 4 : 3) and butanol : glacial acetic acid : water (40 : 10 : 50) was used for running. Running time was 20 to 22 hours. The residue of the solvent mixture was expelled *in vacuo* and the dry filter paper was sprayed with anilinephthalate. After 15 min. at 100° C development was complete. Parallel with the test substance glucose, galactose, arabinose, rhamnose, xylose and ribose standards were also run. The preparations were partly Merck's, partly Schering and Kahlbaum's and partly May and Baker's products.

Molisch reaction. To 1 or 2 ml solution containing about 5 mg hexose are added 4 to 5 drops of 10 per cent alpha-naphthol. Two ml concentrated sulphuric acid is then allowed to flow down the side of the inclined tube, thus forming a layer of acid beneath the sugar. In case of positivity a blue zone appears at the junction between the two liquids.

Tollens reaction. To 5 ml of the test aqueous solution and an equal volume of hydrochloric acid (sp. gr. 1,19) is added 1 ml 1 per cent alcoholic resorcine solution. The mixture is slowly brought to the boil and maintained in mild boiling for 1 to 3 minutes. After cooling under tap water a colour appears characteristic of the kind of sugar present.

Ekkert reaction. About 5 mg meta-dinitrobenzene is taken up in 5 drops of alcohol, 2 ml of the test solution containing 5 to 10 mg of test substances is added, and the mixture is gently heated in the presence of *N* NaOH. In the presence of reducing sugars a dark purple colour develops rapidly.

Demonstration of proteins. 20 per cent sulphosalicylic acid solution; 1 per centpicric acid solution.

Electrophoretic studies. These involved the use of a Boskamp electrophoresis apparatus of the Antweiler type; a 0,4 per cent solution of fraction O in a borate buffer of pH 9,2; and a 0,8 per cent solution of the Vi antigen in an acetate buffer of pH 4,2.

Fractionated solubility test. An acetate buffer of pH 5,3 was used as a solvent and the determined quantities of the test substances were serially extracted with buffer.

Determination of solubility in distilled water at different pHs. A determined amount of the test fraction was extracted with equal volumes of distilled water, by shaking with glass beads.

Experimental

Preparation of cultures. The strains stored in lyophil ampoules were spread on tryptic digest beef agar plates. Among the irizating opaque colonies those showing the maximum Vi antigen content by agglutination were selected. The bacteria were grown partly by the common method of cultivation in digested beef agar medium in Roux flasks (18 hours at 37° C), and partly by mass cultivation in a fermentor (16 to 18 hours at 37° C). On completion of cultivation microscopic test for purity, agglutination test (with O and Vi sera) for antigen content and estimation of the microbial count by electrophotometry were carried out. To 1 volume of suspension were added 2,5 vol. of distilled acetone and the mixture was allowed to stand overnight. After decantation and centrifugation the bacterial sediment was washed twice with acetone, once with ether and dried *in vacuo*. This dried bacterial powder was used in the experiment.

Preparation of purified O and Vi antigens. 10 g bacterial powder is suspended in 1500 ml distilled water by homogenization in a China mortar in the presence of small volumes of distilled water, in order to facilitate suspension. To the bacterial suspension is added 0,4 g 1 : 250 USP trypsin and the pH is adjusted to 8,4. The flask is placed in a 37° C water bath and the pH is checked at 5 minute intervals. pH soon falls to around 7, and then it is readjusted to 8,4 with 2 *N* NaOH. This is done whenever it sinks below 8. In about 1 hour's time the reduction in pH will be slight, not amounting to more than 0,1 to 0,2. Meanwhile, the bacterial suspension has become translucent due to bacteriolysis. Only about 3 to 6 per cent of the initial bacterial mass remains insoluble.

At that point digestion is discontinued and the solution is separated from the slight solid residue by centrifugation at 3000 r. p. m. for 30 minutes. The opalescent supernatant is adjusted to pH 8 and 3 volumes of 96 per cent ethanol are added to it. After standing at +4° C for 4 hours the mixture is centrifuged at 3000 r. p. m. for 30 minutes, the supernatant is discarded, the precipitate is suspended in 300 ml dehydrated acetone and is centrifuged. Centrifugation and resuspension are repeated twice more and the sediment is suspended in 300 ml ether and centrifuged. The resulting sediment becomes air-dry in 10 to 15 minutes at room temperature (Fraction 1). Fraction 1 contains the O and the Vi antigen, side by side. The two antigenic components are separated and purified by the following procedure.

1 g of fraction 1 is dissolved in 150 ml distilled water at pH 7,6. 2,6 ml 20 per cent $NaNO_2$ is added and the solution is heated to 60° C. The pH is adjusted to 1,7 to 1,9 by adding 0,6 ml concentrated HCl. The mixture which from the liberated nitrous acid has become greenish-yellow in colour and precipitated is maintained at 60° C for 20 minutes, then cooled fast and centrifuged. The yellowish sediment is dried in ether and acetone (Fraction 2). To the supernatant are added 3 volumes of 96 per cent ethanol and after 1 hour at 1° C the settled preci-

pitated liquid is centrifuged. The sediment is dried in acetone and ether (Fraction 3). The supernatant is dried *in vacuo* or by exposure to hot air flow and dissolved in 7 ml distilled water at pH 1,8 to 2,0. The solution is clarified by centrifugation. The dried substance is extracted 3 to 4 times with 40 ml volumes of dry acetone. The last acetonic extract must be colourless. The residue of extraction is dissolved in 7 ml distilled water at pH 1,8 to 2,0 and the solution is clarified by centrifugation. To the solution are added 8 volumes of 96 per cent ethanol and the pH of the alcoholic mixture is adjusted to 7,6 to 7,8. The precipitate is allowed to stand for 1 hour, centrifuged and dried in acetone and ether, as described above (Fraction 4). In Table I are shown amounts of the single fractions yielded by 10 g prepared bacterial dry powder, as well as the percentage yields for bacterial powders. Whereas the 3 bacterial species yielded comparable amounts of Fractions 1 and 2, *P. ballerup* yielded about 4 to 6 times, and *E. coli* 6 to 7 times as much of Fraction 4, as did an equal quantity of strain Ty 2.

Table I

Yields of single fractions from test bacteria

Material	Yield from 10 g dry bacterium powder					
	Ty_2, as well as mixed culture of Ty_2, Nova, Ty 899		E. coli 5396/38		P. ballerup 107	
	g	%	g	%	g	%
Fraction 1	4,0—4,2	40—42	3,9—4,2	39—42	4,0—4,3	40—43
Fraction 2	0,0—0,6	0— 6	0,0—0,8	0— 8	0,0—0,3	0— 3
Fraction 3 (O antigen)	2,0—2,4	20—24	1,6—1,7	16—17	1,8—2,2	18—22
Fraction 4 (Vi antigen)	Ty_2 alone 0,09—0,16	Ty_2 alone 0,9—1,56	0,6—0,7	6— 7	0,4—0,6	4— 6
	Ty_2, Ty 899, Nova 0,2—0,28	Ty_2, Ty 899, Nova 2,0—2,8				

The antigenic character of the single fractions has been examined in precipitation tests against O and Vi precipitating sera, using a 0,3 per cent solution in saline of the test substances. The crude fraction (Fraction 1) precipitated from the solution of typhoid bacteria (a mixed culture of Ty_2 and Ty_2, 899 and Nova strains, respectively) contained aliquots of O and Vi antigen and had a high precipitation titre. The relatively small amount of (and often not recoverable) Fraction 2 contained only the O antigen, in variable titres. Fraction 3 precipitated exclusively with the O serum, at a titre higher than Fraction 1. Fraction 4 precipitated exclusively with the Vi serum, at high dilutions. The fractions de-

rived from *P. ballerup* and *E. coli* were tested against the Vi serum only. Fraction 1 precipitated up to high dilutions of antigen and Fraction 4 up to very high levels of dilution. On grounds of these tests, Fraction 3 obtained from typhoid strains is considered a relatively pure O antigen, whereas Fraction 4 is accepted as a Vi antigen of identical purity. The numerical values of precipitation are shown in Table II.

The fractions showing strong antigenic activity have been subjected to chemical and physical study so as to determine their chemical properties and grade of purity (homogeneity).

Table II

Results of precipitation tests

Material	Precipitation with anti Vi serum	Precipitation with anti O serum
Fraction 1 from *S. typhi* strains 0,3 per cent solution	1 : 120	1 : 240
Fraction 2 from *S. typhi* strains 0,3 per cent solution	—	1 : 320
Fraction 3 from *S. typhi* strains 0,3 per cent solution	—	1 : 360
Fraction 4 from *S. typhi* strains 0,3 per cent solution	1 : 160	—
Fraction 1 from *E. coli* 5396/38 0,3 per cent solution	1 : 240	—
Fraction 1 from *P. ballerup* 107 0,3 per cent solution	1 : 240	—
Fraction 4 from *E. coli* 5396/38 0,3 per cent solution	1 : 640	—
Fraction 4 from *P. ballerup* 107 0,3 per cent solution	1 : 640	—

The N content of the fractions, as determined by the semi-micro KJELDAHL method, and their P content, as estimated by the FISKE and SUBBAROW method, are given in Table III. A comparison of the total N in Fraction 1 with that in Fractions 2,3 and 4 derived from Fraction 1 reveals that treatment with nitrous acid resulted in a 25 to 35 per cent decrease in N content, without any loss in antigenic activity. This loss in N content is due to the reaction of free amino acid groups with nitrous acid, in which the NH_2 groups are exchanged with OH and gaseous N is released. In Fractions 1 and 3, P content varied from 2,2 to

Table III

Results of chemical tests

Fraction No.	N %	P %	Sulphosalicylic acid test	Picric acid test	Biuret test	Molisch reaction	Tollens reaction	Ekker test
1 Ty_2 and mixed/Ty_2, Nova 899	5,8—6,2	2,5—2,8	—	—	±	+	+	+
2 Ty_2 and mixed	3,7—4,2	2—2,6	±	±	±	+	+	+
3 Ty_2 and mixed	3,2—3,6	2—2,4	—	—	±	+	+	+
4 Ty_2 and mixed	4,6—4,7	0,1	—	—	±	+	+	+
4 *E. coli* 9396/38	4,5—4,7	0,1	—	—	±	+	+	+
4 *P. ballerup* 107	4,6—4,7	0,1	—	—	±	+	+	+

2,8 per cent. Its variation was not parallel with the decrease or increase of antigenic activity, as determined by the precipitation test. The Vi antigen (Fraction 4) contained less than 0,1 per cent of P. This value however, is below the error of assay. 0,3 per cent solutions in distilled water of the single fractions were tested also with sulphosalicylic acid and picric acid as protein reagents, and with the MOLISCH, TOLLENS and EKKER reactions as polysaccharide tests. The biuret reaction was also carried out. According to a previous report, Fraction 1, pure O antigen (Fraction 3), as well as the pure Vi antigen (Fraction 4) were negative for protein, whereas their polysaccharide reactions were definitely positive. Each fraction gave a mild biuret reaction.

Fractionated solubility tests. 0,6 g amounts of antigen were serially extracted with 10 ml volumes of a pH 5,3 acetate buffer, by shaking at 25° C, followed by centrifugation at 6000 r. p. m. for 20 minutes. The sediment was quantitatively dried in acetone and ether and the loss in weight was determined. Extraction and drying were carried out in the same centrifuge tube. Extraction, drying and weighing were repeated until the total amount of substance had dissolved, or until the solvent could not solve any more of the eventually present residue. In Fig. 2 is shown the correlation between the dissolved amounts and number of successive solutions.

The digested, diazotated material proved to be approximately homogeneous as regards solubility. The loss of weight of the 0,6 g amount dissolved in fractions

proved to be constant within the limits of experimental error, up to the last 5 to 10 per cent amounts, when the weight loss was somewhat less.

Relation between antigen solubility in water and pH: 0,6 g amounts of antigen were extracted by shaking for 2 hours at 25° C, with 20 ml volumes of distilled water. Extraction was furthered by using glass beads. In the first extraction the distilled water suspension was adjusted to pH 2 with 0,1 *N* hydrochloric acid. On completion of extraction the insoluble residue was centrifuged off at 6000 r. p. m., the supernatant was decanted and the residual solids were dried by homogenization with 50 ml dehydrated acetone and centrifugation. This procedure was then repeated twice with acetone and three times with ether. After the last ether suspension had been centrifuged, the sediment was dried by exposure to 30° C air for 30 minutes and was weighed after having allowed it to stand over phosphorpentoxide for 2 hours. In this way we have determined the quantities dissolved out by water within the given pH range. The dry residue was extracted again, this time with 20 ml water at pH 3. Extractions and estimations were continued at every pH unit up to pH 9. The quantities dissolved out by water at different pH ranges have been tabulated. In this respect, Fraction 3 representing the O activity differed significantly from Fraction 4, the one bearing the Vi antigenic property. Toward alkaline pH values the solubility of the O fraction increased. At pH 2, 1,1 mg was dissolved by each ml; at pH 9, 8,5 mg. The Vi antigen was very well soluble in the acid range. At pH 2, a 10 per cent solution could even be prepared. Solubility sharply declined toward neutral and alkaline reaction. At pH 8, only a 0,6 per cent solution could be made. The solubility of the two kinds of antigen continuously increased or decreased toward the appropriate pH values. A rapid loss in solubility corresponding to the isoelectric point at pH 2 to 9 did not occur with either antigen. The solubility relations are illustrated in Fig. 1. The marked difference in solubility at acid pH makes it possible easily to separate the two antigens in their mixture (trypsinic bacterial solution). This difference in solubility has been made use of also in the above described method for the preparation of O and Vi antigens. The difference in solubility is even more marked in a 70 per cent alcoholic medium than it is in distilled water.

Attemps have been made to demonstrate the sugar components of the two kinds of antigen by paper chromatography. Three sugar components could be shown in the O antigen : glucose, rhamnose and galactose. In the paper chromatographic pattern of the antigen prepared from strain Ty_2 the spot of a fast-migrating sugar component appeared above the spot of rhamnose, showing a migration rate as related to that of rhamnose of $R_{Rh} = 1{,}42$. As a yet unidentified sugar component with a similar migration rate has been described by DAVIES [23] to occur during hydrolysis of *S. paratyphi* A., and *S. cholerae suis* polysaccharides.

The position of the paper chromatographic spots of the Vi antigen hydrolysate suggests the presence of gluco- and galacturonic acid. In Fig. 6 are shown the

paper chromatographic spots of the O antigen, beside the sugars used for comparison.

Electrophoretic studies. The crude polysaccharide mixture precipitated with ethanol after digestion with trypsin, as well as the pure O antigen and pure

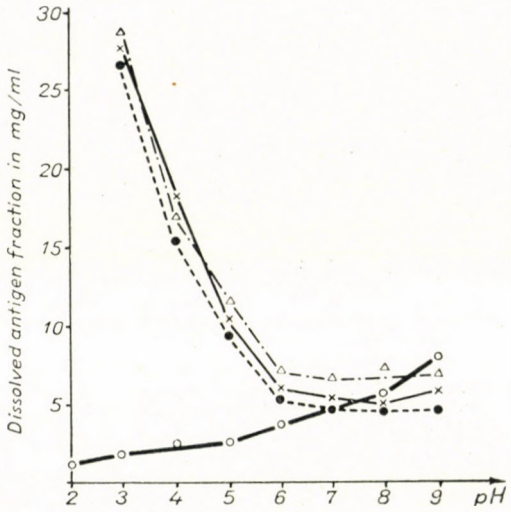


Fig. 1. Solubility in water of O and Vi antigens separated after treatment with nitrous acid, as the function of pH

○ "O" antigen from Ty_2, × Vi antigen from Ty_2
△ Vi antigen from *P. ballerup*, ● Vi antigen from *E. coli*

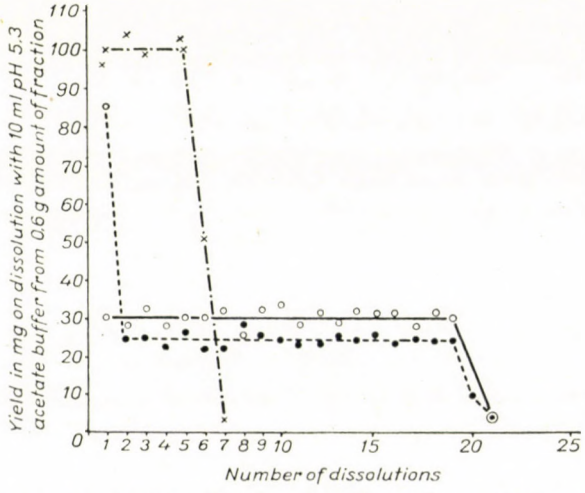


Fig. 2. Homogeneity curves of antigen fractions from Ty_2, as determined on grounds of solubility

× Fraction 4 from Ty_2 (Vi antigen)
○ Fraction 3 from Ty_2 (O antigen)
● Fraction 1 from Ty_2 (Crude antigen treated only by fermentation, without treatment with nitrous acid and containing O and Vi antigens)

Vi antigen were studied by electrophoresis, in the afore-mentioned way. In Fraction 1 two components were demonstrated. The O antigen (Fraction 3) and Vi antigen (Fraction 4) contained a single sharp component. The electro-

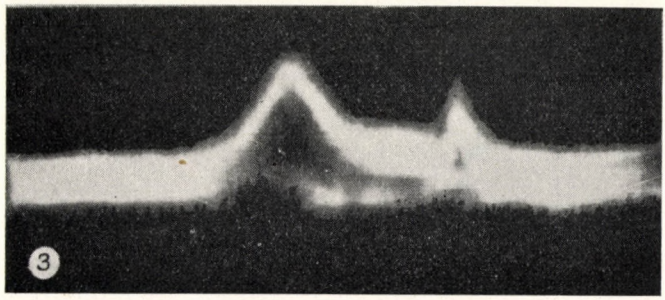


Fig. 3. Electrophoretic pattern of Fraction 1 (O + Vi) antigen from Ty_2, in pH 9,2 borate buffer

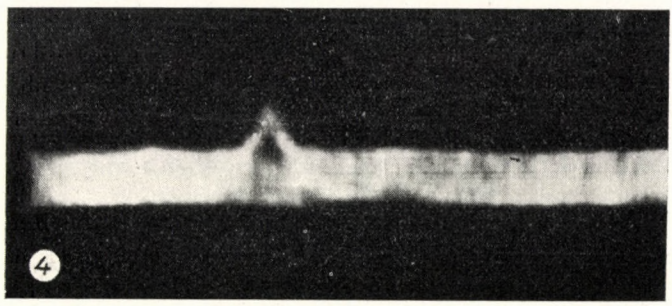


Fig. 4. Electrophoretic pattern of nitrous acid-treated O antigen from Ty_2, in pH 9,2 borate buffer

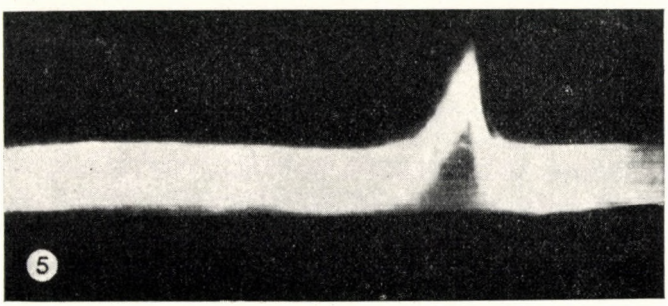


Fig. 5. Electrophoretic pattern of nitrous acid-treated Vi antigen from Ty_2, in pH 4,2 standard acetate buffer

phoretic pattern of Fraction 1 is shown in Fig. 3, and those given by the O and Vi antigens are presented in Fig. 4 and 5, respectively, as obtained with Ty_2 preparations.

In the first experiments, as a result of the insufficient treatment with trypsin, the fermentation mixture contained O antigen molecules of a relatively high protein content alongside the Vi antigen containing minimal amounts of protein. In the course of treatment with nitrous acid the acid reaction and the effect of the temperature of 40° C caused part of the high-protein O antigen to

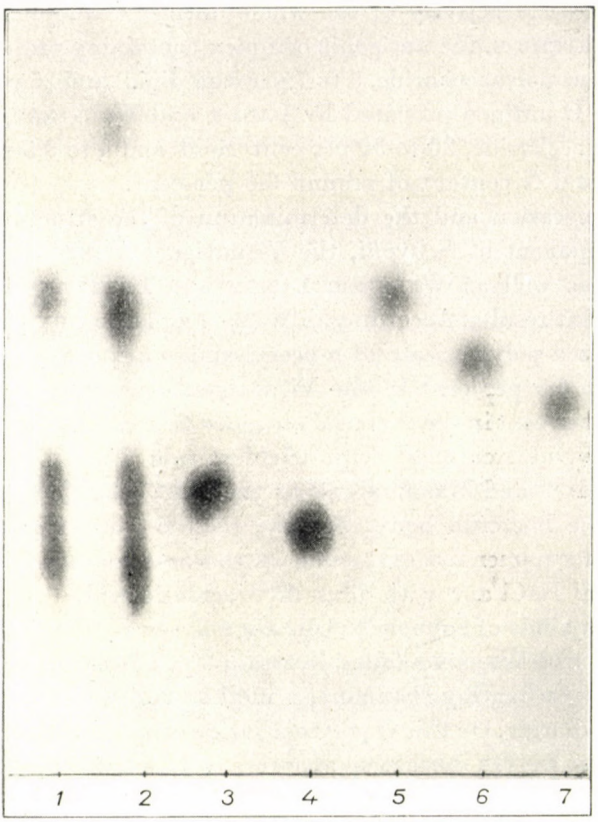


Fig. 6. Paper chromatographic pattern of the sugar mixture obtained by sulphuric acid hydrolysis from Ty_2 O antigen treated with nitrous acid

1 Ty_2 "O" a. g. 16 hours' hydrolysis
2 Ty_2 "O" a. g. 8 hours' hydrolysis
3 Glucose, 4 Galactose, 5 Rhamnose, 6 Ribose, 7 Xylose

precipitate, with the other part remaining in solution. This part then precipitated together with the low-protein O antigen on treatment with alcohol and appeared as a slowly migrating component in the electrophoretic pattern. This contamination, however, was avoided when treatment with trypsin was of sufficient intensity. Fractions 3 and 4 proved homogeneous, composed of a single substance, not only on precipitation test, but also at electrophoresis.

Discussion

BOIVIN [6], FREEMAN [7, 8], as well as MORGAN and PARTRIDGE [9] have been concerned with the purification and studies on the structure of the somatic O antigen of *S. typhi*. They found it to be a substance of polysaccharide nature, combined with lipid and protein components. More recently, WEBSTER and LANDY [10] have shown the protein component to play no significant role in the specific immunological activity of the whole antigenic complex. According to MORGAN and PARTRIDGE, the antigenic complex containing protein is composed of 50 to 60 per cent polysaccharide, 5 to 7 per cent lipid and 25 per cent protein. The protein-free O antigen prepared by LANDY and WEBSTER contained 60 to 70 per cent polysaccharide, 20 to 30 per cent lipid and 3 to 3,5 per cent glucosamine, with a total N content of around 0,6 per cent.

In the preparation and the determination of the structure of the other immunizing component of *S. typhi*, the Vi antigen, ASHIDA [3], GRABAR and CORVASIER [4], as well as WEBSTER, LANDY and FREEMAN [5, 11, 12] have achieved significant results. According to WEBSTER and LANDY [12], the protein-free Vi antigen is a polymerisate of n-acetyl-amino-hexuronic acid, with an N content of about 6,3 per cent in the Vi antigen derived from *E. coli* and *P. ballerup*, and 5,3 per cent in the material obtained from strain Ty_2 of *S. typhi*. The above authors found treatment with trichloracetic acid, the procedure first employed by BOIVIN and MESROBEANU as the most suitable for recovery of O antigens from the bacterial body. For the recovery of Vi antigen WEBSTER and LANDY [5] recommended extraction of the acetonic dry bacterial powder with 0,85 per cent NaCl and with dilute hydrochloric acid.

The various kinds of Salmonella contain polysaccharides in highly variable amounts. LANDY and WEBSTER found in strain Ty_2 4,9 per cent polysaccharide, as determined by estimating rhamnose, a method suitable for accurate estimation of O polysaccharide. On this O polysaccharide content, the O lipopolysaccharide recovered by BOIVIN extraction amounts to 1,96 to 2,4 per cent of the bacterium content. On the basis of rhamnose estimation, the O polysaccharide content of *S. typhi*, strain O 901, has been estimated at 6,2 per cent of the dry bacterium, provided that the somatic antigen prepared by the BOIVIN method contains 33 to 37 per cent polysaccharide. The about 6 per cent polysaccharide content is equal to about 18 per cent O antigen recoverable by the BOIVIN method. The aforementioned authors used the BOIVIN extract containing 40 to 50 per cent of the bacterial polysaccharide O as the starting material for the preparation of lipopolysaccharide O. In spite of this, 100 g bacterium yielded only 3,2 g BOIVIN antigen, which is about 1/6 of the amount of antigen calculated on grounds of the rhamnose content.

We have succeeded in bringing into solution almost completely the bacteria, as well as the antigenic substances of protein or polysaccharide nature contained in them by the trypsin method first employed by TOPLEY and RAISTRICK [16].

The O and Vi antigen in the solution could be precipitated quantitatively with alcohol at neutral pH. The N content of the polysaccharide mixture varied from 5 to 6 per cent. By furthering tryptic digestion by heating and by continuous readjustment of the pH (40° C, pH 8,6), the N content was reduced to around 4 per cent. The two components can be separated by making use of their different solubilities at acid reaction. According to our findings, in an aqueous solution containing 70 per cent alcohol, this difference is maximal at pH 2,6 because under such circumstances O antigen is absolutely insoluble, whereas Vi antigen in concentrations of 0,5 to 0,6 per cent remains in solution.

In our first experiments we did not apply treatment with nitrous acid and the antigens in the crude polysaccharide mixture were separated exclusively on grounds of the difference in solubility. The alcohol concentration of the 0,5 per cent solution of Fraction 1 was increased to 70 per cent, the O antigen precipitated at pH 2,4 was centrifuged off and then the Vi antigen was precipitated by adjusting the supernatant to pH 8,2. The fractions thus obtained were contaminated with each other, although only to a small extent. The N content of O antigen varied from 5,8 to 6,2, that of the Vi antigen from 5,5 to 5,8, starting out from strain Ty_2. Treatment with nitrous acid proved suitable for reducing the N content. A few hours of exposure to nitrous acid (in a solution containing 0,05 m nitrous acid) did not cause any appreciable loss of activity, whereas the nitrogen content decreased, depending on the initial concentration, by the 25 to 33 per cent in O antigen, and by 25 to 30 per cent in Vi antigen. The toxicity of the O antigen treated with nitrous acid shows an unexpected, significant decrease. A similar reduction in toxicity occurred also with the Vi antigen. The investigations dealing with these findings and the immunological properties of the O and Vi antigens obtained by the nitrous acid method will be described in a paper to follow.

The N content is reduced as a result of the exchange of free amino groups for OH groups in the presence of nitrous acid. Nitrous acid treatment at 40° C and pH 1,8 apparently splits off certain lipid and protein particles, from the antigenic complex still held together after digestion. The fact that the antigenic property is retained after treatment with nitrous acid indicates that free amino groups play no role of any significance in this respect, either with the O, or with the Vi antigen. The 4 per cent N content of the Vi antigen, that is unaffected by treatment with nitrous acid, suggests that the amino groups are in secondary linkages. This is in harmony with the statement made by WEBSTER, FREEMAN and CLARK [11] that the acetyl groups in the Vi antigen are bound to amino groups. A secondary amine nature is suggested also by the high solubility at acid reaction, as a result of the increased solubility of the given salt (hydrochloride) of the secondary amine. Even if Vi antigen is considered to be a polymeric acid as to solubility, its secondary amine nature predominates, its solubility being markedly decreased at neutral or alkaline reaction.

The steps of the preparation of O and Vi antigen

(Detoxication and Separation).

Bacterial powder. Liquid culture or distilled water washing of agar culture + 2,5 vol. acetone. Standing 20 hours at + 4° C. Centrifugation.



Supernatant discarded

About 100 g centrifugate suspended in 600 ml acetone and centrifuged. Resuspension in 800 ml dry acetone. Centrifugation. Suspension in 400 ml dry ethylether. Centrifugation. Sediment in vacuum exsiccator for 30 minutes, dries while homogenized. Keep in brown, tightly sealed flask with screw stopper.



Crude (mixed) antigen fraction. Fraction 1. Suspend 10 g bacterial powder in 1500 ml distilled water. Add 0,4 g 1 : 250 U. S. P. trypsin and digest at pH 8,4 and 37° C. Readjust pH until digestion is complete and decrease of pH ceases. Centrifuge.



Sediment discarded

Add 3,1 volumes of 96 per cent ethanol to supernatant to make an ethanol concentration of 70 vol. per cent. pH 7,2. Centrifuge. Dry sediment with aceton and ether.

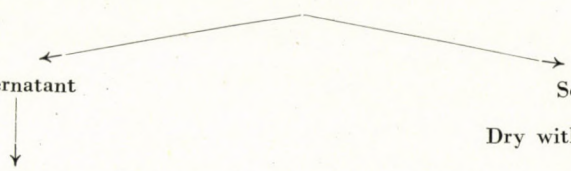


Supernatant discarded

Precipitate Fraction 1.



Treatment with nitrous acid. Dissolve 1 g fraction 1 in 150 ml distilled water. Add 20 per cent $NaNO_2$. Heat to 60° C. Add concentrated HCl to adjust pH to 1,8. Keep at 60° C for 20 minutes. Cool. Centrifuge.

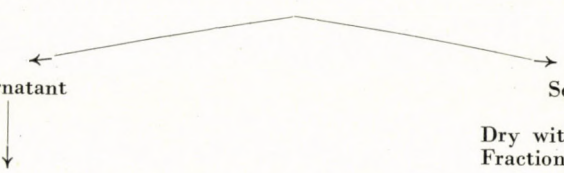


Supernatant

Sediment

Dry with acetone and ether.
Fraction 2

Add 96 per cent ethanol to make 70 vol. per cent concentration. pH 2,4. Keep at 1° C for 60 minutes. Centrifuge.



Supernatant

Sediment

Dry with acetone and ether
Fraction 3 (O antigen)

Dry in vacuo. Extract with acetone. Dissolve residue at pH 2 in 7 ml water. Clarify by centrifugation. Add 8 vol. 96 per cent ethanol. Adjust pH to 7,6. Centrifuge precipitate and dry it in acetone and ether.



Precipitate
Fraction 4 (Vi antigen)

Supernatant discarded

Summary

A method has been described for the preparation of purified Vi antigen from *S. typhi*, *P. ballerup* and *E. coli*, and for the preparation of purified O antigen from *S. typhi*.

The method involves essentially the following procedure. Acetone-killed and dried bacteria are subjected to trypsinolysis and the O and Vi antigens are separated after treatment with $NaNO_2$ by alcoholic fractionation. Further purification is effected by repeated treatment with alcohol and acetone.

The advantages of the method are :

a) The yield in both O and Vi antigens is about the double that attainable by the methods hitherto known.

b) Purity, as related to nitrogen content, of our O antigen preparation is greater than, while that of our Vi preparation is equal to, the best results published up to now.

Paper chromatography revealed the presence

a) in the O antigen of glucose, rhamnose, galactose and an unidentified sugar component ;

b) in the Vi antigen, of gluco- and galacturonic acid.

In electrophoretic studies the O and the Vi antigen appeared as a single component.

LITERATURE

1. Felix, A., Pitt, R. M.: Lancet **227**, 186 (1934).
2. Jude, A.: Biol. Med. **39**, 5 (1950).
3. Ashida, T.: Japan. J. Exp. Med. **20**, 181 (1949).
4. Grabar, P., Corvasier, P.: Ann. Inst. Pasteur **80**, 255 (1951).
5. Webster, E., Landy, M. and Freeman, M. E.: J. Immunol. **69**, 135 (1952).
6. Boivin, A. and Mesrobeanu, L.: Compt. Rend. Soc. Biol. **113**, 490 (1933).
7. Freeman, G. G. and Challinor and Wilson, J.: Biochem. J. **34**, 307 (1940).
8. Freeman, G. G. and Anderson, F. H.: Biochem. J. **35**, 564 (1941).
9. Morgan, W. T. J. and Partridge, S. M.: Brit. J. Exp. Path. **23**, 151 (1942).
10. Webster, M. E., Sagin, J. F., Landy, M., Johnson, A. G.: J. Immunol. **74**, 455 (1955).
11. Webster, M. E., Clark, W. R. and Freeman, M. E.: Arch. Biochem. **50**, 223 (1954).
12. Webster, M. E., Sagin, J. F., Anderson, P. R., Breese, S. S., Freeman, M. E. Landy, M.: J. Immunol. **73**, 16 (1954).
13. Anderson, P. W., Morgan, W. T.: Brit. J. Exp. Path. **19**, 82 (1938).
14. Palmer, J. W., Gerlough, T. D.: Science **92**, 155 (1940).
15. Westphal, O., Lüderitz, O.: Angew. Chem. **66**, 407 (1954).
16. Topley, W. W. C., Raistrick, H., Wilson, J., Stacey, M., Challinor, S. W., Clark, R.: Lancet **232**, 252 (1937).
17. Fuller, A. T.: Brit. J. Exp. Path. **19**, 130 (1938).

17/a. Walker, J.: Biochem. J. **34**, 325 (1940).

18. Landy, M.: Proc. Soc. Exp. Biol. **80**, 55 (1952).
19. Landy, M., Webster, M. E.: J. Immunol. **69**, 143 (1952).
20. Landy, M., Webster, M. E., Sagin, J. F.: J. Immunol. **73**, 23 (1954).
21. Landy, M.: Amer. J. Hyg. **60**, 52 (1954).
22. Landy, M., Gaines, S., Seal, J. R., Whiteside, J. E.: Amer. J. Pub. Health : **44**, 1572 (1954).
23. Davies, D. A. L. : Biochem. J. **59**, 4 (1955).

FUNGICIDAL EFFECT OF METHYL DERIVATIVES OF 8-HYDROXYQUINOLINE ON DERMATOPHYTES

By

J. URI, R. BOGNÁR, and I. BÉKÉSI

Institute of Pharmacology and Institute of Organic Chemistry, Medical University, Debrecen

(Received August 21, 1956)

The various effects of quinoline derivatives, particularly of the derivatives of 8-hydroxyquinoline (oxine), have been widely studied. In vitro, oxine is a compound of powerful antibacterial action. It is especially potent against Gram-positive bacteria, much less so against Gram-negative pathogenic agents. Conspicuous for their great sensitivity to oxine are *H. pertussis*, and *M. tuberculosis* [1, 2, 3, 8, 19]. Of the fungicidal property of oxine frequent use is being made in various industries and agriculture [9, 10, 11, 15]. Its capacity to inhibit the growth of dermatophytes is very marked [16]. It is also known for the anti-amoebic action of its derivatives [17]. For its further effects reference is made to the work of HOLLINGSHEAD [18].

As to the action of its mechanism, the conception was being propounded for long that what underlied its antibacterial effect was that it formed a chelate ring by combining with metals indispensable to the microorganisms [2, 3]. However, lately it has been established that several of its metallic complexes are more efficaceous than oxine itself; moreover, that in the absence of traces of metal it has no antibacterial effect at all [4, 5, 6, 7, 12, 13, 14, 20]. The problem can by no means be regarded as solved since, apart from chelate formation, there are a number of other properties (such as the ratio of oxine to metal, degree of ionisation, stability of the chelate ring, liposolubility, *etc.*) which influence the antibacterial effect in manifesting itself.

Since because of several of its properties, chiefly toxicological, oxine has little claim to be used therapeutically, we prepared many of its Derivatives and studied them for their capacity to inhibit the growth of Dermatophytes. The object of our pertaining experiments was to obtain a derivative (i) which is at least as efficaceous against fungi pathogenic for man as oxine itself, or more so; (ii) in which the conditions relating to animal toxicity are more favourable than those in oxine; (iii) which, in addition to being fungistatic, is also fungicidal in its effect. 5-Methyl-oxine being known to be half as potent against *M. tuberculosis* as oxine, but at the same time to possess a 7 to 10 times lesser mouse toxicity, we first of all prepared every possible C-methyl derivative of oxine [19, 20]. These derivatives were then examined for their fungistatic and fungicidal effect

on Dermatophytes, and for their toxicity; finally, experiments were undertaken to approach their mode of action.

A) Preparation and brief description of the compounds

In preparing the methyl derivatives of 8-hydroxyquinoline the DOEBNER — MILLER — SKRAUP reaction and BAYER synthesis were applied following, in part, prescriptions in the literature, in part, independent new procedures.

The compounds were purified by means of water-vapour distillation and recrystallization from alcohol and benzine.

2-Methyl-8-hydroxyquinoline was built up with DOEBNER–MILLER's reaction from o-aminophenol and croton aldehyde, according to the method described in WELCHER's Organic Analytical Reagents [21]. Yield: 36,5%. M. p.: 74° C. Calculated N: 8,80%; found: 8,75 %.

3-Methyl-8-hydroxyquinoline was first prepared in 1952 by PHILLIPS [22] from o-aminophenol and metacrylaldehyde. Because of the difficulties encountered in preparing the unsaturated initial aldehyde, by us this compound was built up in the reaction mixture itself with BAYER synthesis from paraformaldehyde and propionaldehyde. The yield was poor: 2,5%. M. p.: 112° C. Calculated N: 8,80%; found: 8,78%.

4-Methyl-8-hydroxyquinoline is obtainable according to BUSCH and KOENINGS [23] by sulphurating lepidine and pouring alkali. On the evidence of our own experiments a simpler method to obtain this compound, and a better yield, is to prepare it from o-aminophenol and methylvinyl ketone with the DOEBNER—MILLER reaction (27,6%), or from o-aminophenol, acetone, and paraformaldehyde, with BAYER synthesis (12,9%). M. p.: 124° C. Calculated N: 8,80%; found: 8,75%.

5-Methyl-8-hydroxyquinoline was prepared with the SKRAUP reaction following the method of NOELTING and TRAUTMAN [24]. Yield: 29,9%. M. p.: 124° C. Calculated N: 8,80%: found: 8,75%.

6-Methyl-8-hydroxyquinoline cannot be synthesized directly. It can be prepared in either of two ways. One is to carry a NH_2 group onto carbon atom 8 and obtain the phenolic hydroxyl by diazotization. This gives the lesser yield and is the more protracted procedure [25]. The other way is to exchange the sulpho group carried onto carbon atom 8 for an OH group by alkali dumping [26]. Yield: 3,9%. M. p.: 95° C. Calculated N: 8,80%; found: 8,77%.

7-Methyl-8-hydroxyquinoline was synthesized by us after NOELTING and TRAUTMAN [27] with the SKRAUP reaction from the suitable aminocresol and glycerin. Yield: 42,3%. M. p.: 72° C. Calculated N: 8,80%; found: 8,80%.

B) Fungistatic effect on Dermatophytes

In determining the static effect, liquid or solid wort was used as the nutrient medium [28]. In solid medium the examinations were carried out with the agar-plate method described in an earlier communication [29]. Spores and vegetative parts of fungi, respectively, were admixed to a measured amount of wort agar that had been melted and cooled to 45° C. When cool, holes were driven into the agar and filled up with wort agar, also of 45° C. To the agar used as a fill the various C-methyl-oxine derivatives were admixed separately in an amount of 2,5 μg in one series of experiments, and in a quantity of 25 μg in the other. In a thermostat at 30° C the fungi developed in four days. A sterile zone was seen to remain, *i. e.*, no fungi grew, where the active principle diffused from the holes into the surrounding agar. The processes and results of the two series of experiments are illustrated in Fig. 1 and Table I.

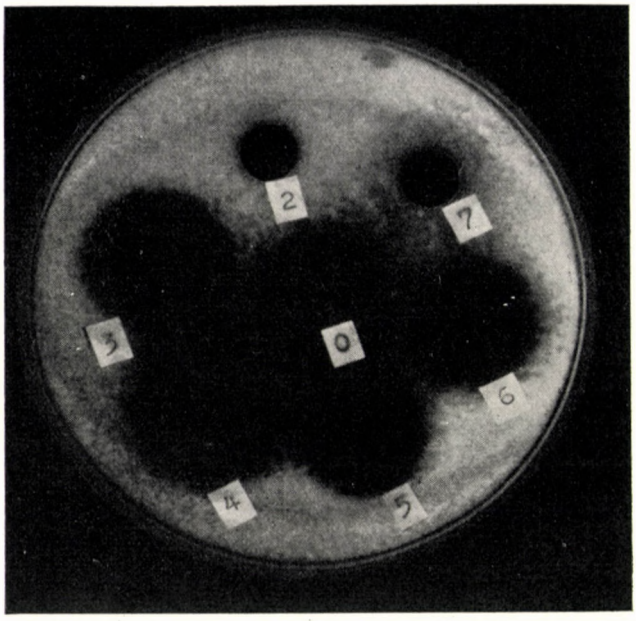


Fig. 1. Inhibition zone of oxine and its methyl derivatives (25 γ/ml), with *T. gypseum*

Table I

Inhibition zones produced by methyl derivatives of 8-hydroxyquinoline

Derivative	Inhibition zone produced by 2,5 μg in m/m			Inhibition zone produced by 25 μg in m/m		
	T. gypseum	E. floccosum	M. audouini	T. gypseum	E. floccosum	M. audouini
Oxine	13	11	14	50	45	52
2-methyl oxine	—	—	—	—	—	—
3-methyl oxine	—	—	11	48	40	50
4-methyl oxine	16	16	20	52	50	55
5-methyl oxine	12	12	16	50	48	50
6-methyl oxine	14	11	16	48	44	45
7-methyl oxine	11	11	11	20	18	22

The rates at which identical amounts of oxine and its methyl derivatives inhibited growth in solid medium were compared in *Trichophyton gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, and *Microsporon audouini*, strains. Sensitivity to the preparations was the highest in Microsporon, less in Trichophyton, and least in Epidermophyton. The rates of effect of the methyl oxines declined in the following order: 4-methyl-oxine, 5-methyl-oxine, oxine, 6-methyl-oxine, 7-methyl-oxine. 2-methyl-oxine was entirely devoid of effect.

In solid medium the preparations are to a great extent dependent for their antifungal activity on their capacity to diffuse. For this reason we evaluated the static effect in the liquid wort medium as well, using the customary serial dilution method. It was to be expected that, since in the pertaining experiments the fungus parts inoculated were completely immersed in the liquid, the preparations would act in lower concentrations. This is why we used each preparation in amounts from 0,5 μg/ml to 10 μg/ml. The results are listed in Table II.

In liquid medium the rates of effect of the methyl-oxines declined in the same order as in solid medium, merely the quantities eliciting a fungistatic effect were proportionately smaller.

Table II

Fungistatic effect of oxine and its methyl derivatives on Dermatophytes

Compound	Amount of inhibitory action in μg/ml		
	T. gypseum	E.floccosum	M. audouini
Oxine	1	0,5	0,5
2-methyl oxine	10 >	10 >	10 >
3-methyl oxine	2	1	1
4-methyl oxine	0,5	0,5	> 0,5
5-methyl oxine	0,5	0,5	0,5
6-methyl oxine	2	1	1
7-methyl oxine	4	4	2

C) Dermatophytocidal action

Of a homogeneous spore suspension of *T. gypseum* grown on slant wort agar and containing washed-off vegetative parts, 0,1 ml was admixed to 5 ml of an 0,5% solution of the oxine and the methyl-oxines. The whole procedure was carried out in sterile centrifuge tubes. The tubes were placed in the thermostat at 30° C, and one each was centrifuged in 15 minutes, 3, 6 and 24 hours, respectively. The fungus parts settled were twice washed with sterile isotonic NaCl, thereafter suspended in 2 ml of NaCl. Inoculations were made of this in slant wort agar and liquid wort medium. The readings were made with the naked eye. For control purposes *T. gypseum* was suspended in sterile NaCl. The results are presented in Table III. Oxine and its methyl derivatives exerted on *T. gypseum* not only a fungistatic but also a fungicidal effect. The most intense fungicidal action was displayed by the 4-methyl and 5-methyl derivatives. Spores and mycelia were killed in as short a time as 15 minutes. As regards effect intensity, there were no essential differences between the other derivatives.

Table III

Fungicidal effect of oxine and its methyl derivatives on Dermatophytes

Compound	Inoculated after incubation of							
	15′	3h	6h	24h	15′	3h	6h	24h
	on solid medium				in liquid medium			
Oxine	9 colonies	—	—	—	++	—	—	—
2-methyl oxine	32 colonies	3 colonies	1 colony	—	++++	++++	++	—
3-methyl oxine	8 colonies	—	—	—	+	—	—	—
4-methyl oxine	—	—	—	—	—	—	—	—
5-methyl oxine	—	—	—	—	—	—	—	—
6-methyl oxine	18 colonies	—	—	—	++++	—	—	—
7-methyl oxine	11 colonies	—	—	—	++++	—	—	—

++++ = ample growth.
— = no growth.

D) Toxicity of the compounds

Having shown that of the methyl-oxines the compounds methylated on the 4th and 5th place are intensely fungistatic and fungicidal to Dermatophytes, much more so than the basic compound itself, we examined the acute toxicity of these derivatives with a view to deciding on their value for practical use. These examinations were made in mice since it is commonly known that oxine is particularly toxic to this animal species. In a group of 15 albino mice of an average weight of 20 g each animal was injected subcutaneously with one of the preparations. The animals were kept under observation for a week, and the LD_{50} was established of each material. Most highly toxic was oxine, less so were

Table IV

Subcutaneously administered doses of methyl oxines acutely toxic to mice

Compound	Acute toxic dose LD_{50} g/kg body weight
Oxine	0,1
2-methyl oxine	0,25
3-methyl oxine	0,25
4-methyl oxine	0,25—0,5
5-methyl oxine	0,5 —1,0
6-methyl oxine	0,25—0,5
7-methyl oxine	0,5 —1,0

the 2- and 3-methyl-oxines, these were followed by the 4- and 6-methyls, while the 5- and 7-methyls showed the least toxicity. Particularly great interest attaches in this respect to 5-methyl-oxine, because it very considerably inhibited the growth of Dermatophytes (Table IV).

E) Interrelation of constitution and intensity of effect

From the fungistatic and fungicidal effects of the methyl derivatives of oxine on Dermatophytes and the results of our toxicological studies the following conclusion can be drawn concerning the relationship of effect and structure. With drugs the general experience is that a derivative which is of greater efficacy than the basic compound, is also more toxic as a rule. With the methyl derivatives of oxine the situation seems to be the reverse, for in our experience increasing efficacy goes hand in hand with decreasing toxicity. For their inhibitory action on Dermatophytes the preparations greatly depend on the position of the methyl group. If this group is substituted on carbon 2 or 7, which are near to such important functional groups as N in the nucleus or OH in position 8, the antifungal action will be lost or considerably decreased. It will be most intense, and exceeding that of the basic compound, if the methyl group is substituted in position 4 or 5, the remotest from N and OH. Substitution on carbon atom 3 or 6 will result in an effect which is between the two in intensity.

F) Experiments to study the mechanism of the mode of action

In our attempts to disclose the mechanism of the dermatophytocidal capacity of oxine and its methyl derivatives it was obvious to give thought to chelate formation. Therefore, to obtain rough information we examined in test tubes whether these compounds were forming complexes with the following bivalent metals, viz., Mn$^{\cdot\cdot}$, Fe$^{\cdot\cdot}$, Zn$^{\cdot\cdot}$, Cu$^{\cdot\cdot}$, Mg$^{\cdot\cdot}$, and Co$^{\cdot\cdot}$. The oxine, its methyl derivatives, and the metals were brought together at a ratio of 2 to 1, on the consideration that two molecules of oxine are linked by one atom of the bivalent metal [1]. A coloured, occasionally a colourless, precipitate, or opalescence, was observed in each and every case. In these experiments we refrained from determining the stability of the chelates. The rest of the experimental process was the same as that described above in connection with our investigations into the static effect in solid medium, yet with the difference that into the agar two holes were driven near to each other ; into one, the oxine or its derivatives were measured ; into the other, solutions containing equivalent amounts of the metal salts. In the incubator they were free to diffuse also in one another's direction. The fungi once developed, it was found that the Mn$^{\cdot\cdot}$, Fe$^{\cdot\cdot}$, Zn$^{\cdot\cdot}$, Cu$^{\cdot\cdot}$, and Mg$^{\cdot\cdot}$ ions, which in the amounts applied are not fungistatic, had not only

failed to decrease the antifungal action of oxine and its derivatives, but had in several instances increased it. Particularly intensified was this action in the case of Zn·· and 7-methyl-oxine. As seen in Fig. 2, a pear-shaped instead of a circular

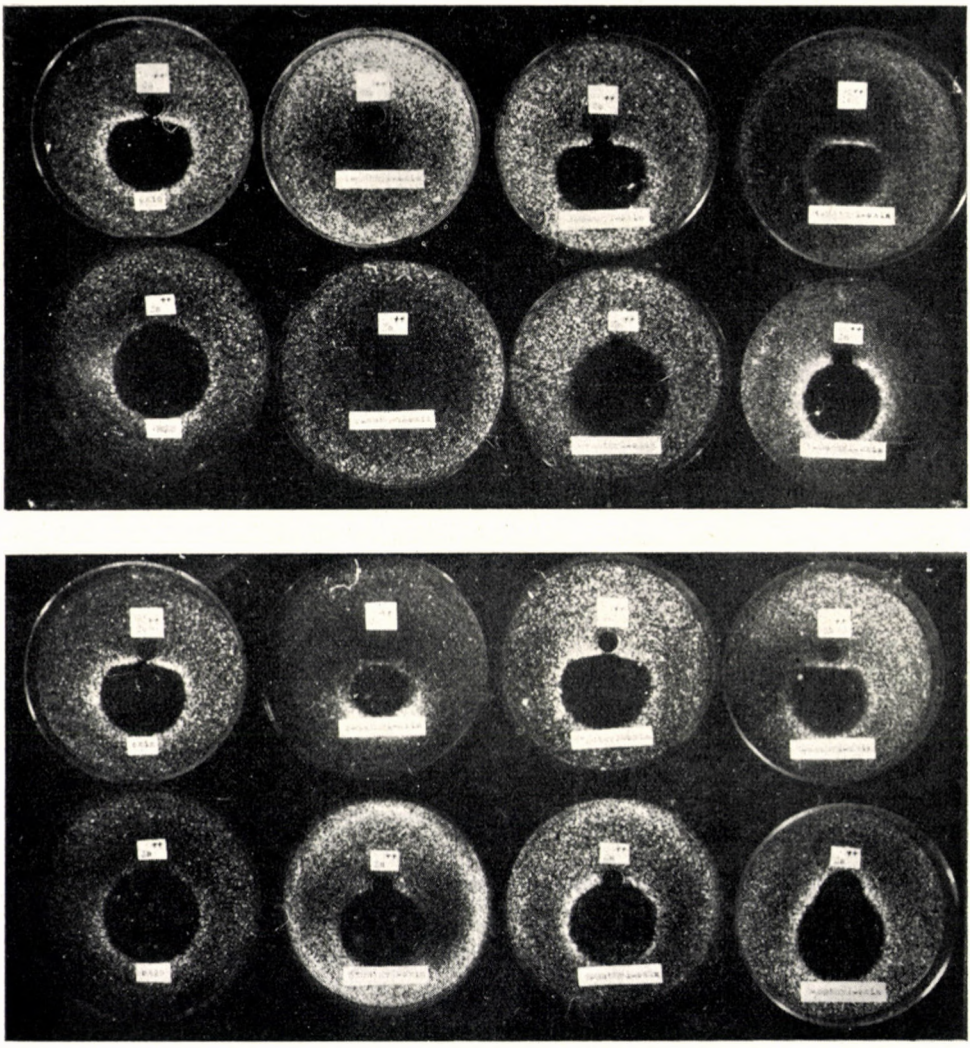


Fig. 2. Co·· inhibits, while Zn·· intensifies the inhibition zone of oxine and its methyl derivatives with *T. gypseum*

inhibition zone was obtained. It looks as if the metal were attracting the oxines. The figure at the same time shows that, unlike the other metals studied, Co·· is antagonistic to the effect of the oxines, since that part of the extinction rings which faces the hole with Co·· in it, shapes as if it were cut off by a straight.

As far as Co·· diffuses into the solid nutrient medium, it neutralises the antifungal activity of the oxines.

The assumption appears justified that, when diffusing into the agar, chelate complexes form at the points of meeting. From this, on the evidence of our experiments, it follows that the dermatophytocidal effect, too, is due to the metal chelates of the oxines, provided the excess of the metal is not too great. Experiments are in progress to verify this assumption in an exact manner.

As regards the mechanism of action, a very remarkable part is played by Co·· which inhibits the dermatophytocidal effect of oxine and its methyl derivatives. For, lately, it has been shown that Co·· is of eminent importance to the life-functions of the cell inasmuch as it protects the SH groups from oxidation [30]. On the other hand, it has been known for long that, in the presence of certain metals, oxine is a catalyst in the oxidation process [31]; it oxidizes the SH groups in the nucleoproteins obtained from liver and roe. Since in our experiments Co·· was seen to ward off the antifungal action of the oxines, we must consider the possibility that oxines and their metallic complexes, respectively, are toxic to Dermatophytes for the reason that they catalyse the oxidation of essential cellular ingredients, primarily those containing SH group, and that Co··, as an SH protector, inhibits the process. In our view, this puts forward a more plausible interpretation of the mechanism than any attempt at clarification via the inhibition of the metal-containing enzymes of the cells.

Summary

1. A previous paper dealt with the very marked capacity of 8-hydroxyquinoline to inhibit the growth of Dermatophytes. The present work studies the dermatophytocidal effect of the methyl derivatives of oxine prepared with a view to finding a derivative more potent than oxine itself, and to examining closely the relationship of mode of action and chelate formation.

2. Studied in *T. gypseum*, *E. floccosum*, and *M. audouini* strains, the static effect was practically nil in 2-methyl-oxine, slight in 7-methyl-oxine, the most marked in 4- and 5-methyl-oxines, with 3- and 6-methyl-oxines between the two extremes. The 4- and 5-methyl-oxines were fungistatic in 0,5 μg/ml concentration.

3. The fungicidal action, too, was the most intense in the 4- and 5-methyl oxines. In their solutions of 50 mg per 100 ml, *T. gypseum* spores and vegetative parts perished as early as in 15 minutes.

4. Acute toxicity of the methyl-oxines was studied in albino mice injected subcutaneously with their aqueous solution. 5-Methyl-oxine proved to be the least toxic of the preparations. LD_{50} = 0,5—1,0 g/kg.

5. A close correlation was established to exist between intensity of effect, toxicity, and position of the methyl radical.

6. The presence of Zn··, Fe··, Cu··, Mn··, and Mg·· intensifies, while that of Co·· inhibits the dermatophytocidal capacity of oxine and its methyl derivatives. The metallic complexes assumedly exert their fungistatic and fungicidal effect by catalysing oxidation in essential cellular ingredients (SH) of fungi pathogenic to man. Co··, on the other hand, protects SH groups.

LITERATURE

1. Oettingen, W.: Therapeutic agents of the quinoline group (1933).
2. Albert, A., Rubbo, S. D., Goldacre, R.J. and Balfour, G.B.: J. Exp. Path. **28**, 69 (1947).
3. Albert, A., Rubbo, S. D. and Gibson, M. J.: J. Exp. Path. **31**, 425 (1951).

4. ALBERT, A., GIBSON, M. T. and RUBBO, S. D.: J. Exp. Path. **34**, 119 (1953).
5. ALBERT, A., HAMPTON, A., SELBIE, F. R. and SIMON, R. D.: J. Exp. Path **35**, 75 (1954).
6. ALBERT, A.: Biochem. J. **47**, 531 (1950).
7. ALBERT, A.: Biochem. J. **50**, 690 (1952).
8. BORN, J., KOCZKA, I. and MARON, S.: Orv. Hetil. **28**, 878 (1950).
9. WOLLENWEBER, H. W.: Angew. Botanik. **11**, 116 (1929).
10. ZENTMYER, G.: Phytopathology **33**, 1121 (1943).
11. BLOCK, S. S.: Agr. Food Chem. **3**, 229 (1955).
12. JENEY, E. and ZSOLNAI, T.: Zblt. Bakteriol. **160**, 677 (1954); **161**, 465 (1954); **163**, 281 (1955).
13. SORKIN, E., ROTH, W. and ERLENMEYER, H.: Experientia VII/2, 64 (1951) and VII/7, 15 (1951).
14. GALE, E. F.: J. Gen. Microbiol. **3**, 369 (1949).
15. JENSEN, F. and ORNER, D.: Dansk. Takr. Farmaci. **8**, 239 (1942).
16. URI, J. and SZABÓ, G.: Acta Physiol. Hung. **3**, 425 (1952).
17. THOMPSON, P. E.: Amer. J. Trop. Med. Hyg. **4**, 224 (1955).
18. HOLLINGSHEAD, R. G. W.: Oxine and its derivatives, London (1954).
19. BORN, J. and SZABÓ, I.: Orv. Hetil. **93**, 400 (1952).
20. NÓGRÁDI, T., VARGHA, L., IVÁNOVICS, G. and KOCZKA, I.: Acta Chem. Hung. **6**, 287 (1955).
21. WELCHER, F. J.: Organic Analytical Reagents, New-York Vol. II. 330 (1948).
22. PHILLIPS, J. P.: J. Amer. Chem. Soc. **74**, 552 (1952).
23. BUSCH, A. and KOENINGS, W.: Ber. **23**, 2679 (1890).
24. NOELTING, E. and TRAUTMANN, E.: Ber. **23**, 3666 (1890).
25. NOELTING, E. and TRAUTMANN, E.: Ber. **23**, 3671 (1890).
26. FISCHER, M. and WILLMACH: Ber. **17**, 441 (1884).
27. NOELTING, E. and TRAUTMANN, E.: Ber. **23**, 3663 (1890).
28. URI, J., SZABÓ, G. and OLÁH, D.: Kísérl. Orvostud. **4**, 372 (1952).
29. URI, J.: Kísérl. Orvostud. **6**, 424 (1952).
30. ALBERT, A.: Selective Toxicity, New-York (1951).
31. BERHHEIM, F.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **7**, 174 (1939).

DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF ENTEROCOCCI

By

J. Szita

State Institute of Hygiene, Budapest

(Received August 31, 1956)

For the diagnosis of Enterococci various time consuming biological tests are required. Their microscopic morphology is not characteristic and it is not easy to differentiate them from the members of the Micrococcus group either by cultural or by biological properties. To perform routine serological identification is also complicated, though this method seems to be the most accurate.

Numerous media have been recommended for the cultivation of Enterococci. Weissenbach [1] described in 1918 an elective medium using sterile ox bile as an inhibitor. A similar medium containing 1 per cent peptone was introduced by Baggar [2] who also suggested a heating test to verify the diagnosis of Enterococci. Fleming [3] found that the Enterococci were able to grow in the presence of 1:10 000 to 1:15 000 dilutions of potassium tellurite which, on the other hand, inhibited the growth of Gram negative agents. A solid agar medium containing tellurite was prepared for the cultivation of Enterococci by Herold [4]. Hartman [5] was the first to use a medium containing sodium azide. Chapman [6] published the prescription of two media for the isolation of Streptococci. The medium contained sodium tellurite, trypan blue and crystal violet. On this medium *Streptococcus salivarius* develops blue, and Enterococcus brown colonies. Litsky *et al.* [7] observed that the growth of *B. subtilis* and Staphylococcus was inhibited by an 1:800 000 dilution of crystal violet or by an 1:1 200 000 dilution of ethyl violet, while under the same conditions Enterococci grew well. Mallman *et al.* described a medium containing ethyl violet and sodium azide for the isolation of Enterococci from water samples. A modification of this medium and its use in Hungary has been recently described by Gregács [8].

Our aim was to avoid the tedious and difficult biological tests in the identification of microscopically and culturally Enterococcus-like organisms, by preparing a new elective medium. The preparation of a medium suitable for direct isolation of Enterococci was not endeavoured, but they had to be differentiated especially from *Streptococcus haemolyticus* and the *viridans* group.

Preparation of the medium

After numerous attempts medium 67 (E67) was found to be the best. Its composition is as follows. Distilled water, 1000 ml ; agar-agar, 1,7 per cent; peptone, 1,0 per cent ; NaCl, 0,3 per cent ; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 0,4 per cent ; yeast extract, 1,0 per cent ; *N* NaOH, about 8—10 ml. The mixture is boiled in an autoclave at 1 atm. pressure for about 30 minutes. Subsequently the pH is adjusted to 7,3 and the following ingredients are added. Sodium taurocholate, 0,5 per cent ; 0,1 per cent solution of crystal violet (Grübler), 5 ml ; dextrose, 1,0 per cent. This mixture is then sterilized by steam in an Arnold apparatus for an additional 30 minutes. After cooling to 45° C, 5 ml of a 1,0 per cent potassium tellurite solution is added. The medium is now thoroughly mixed and poured into Petri dishes.

Results

The medium was tested for electivity using the LDC 1 strain of Enterococcus (obtained from the Institute of Epidemiology and Microbiology, Prague), a routinely isolated strain of *E. coli*, a *Streptococcus haemolyticus* strain and a *Staphylococcus aureus* strain. Of the above strains only the Enterococcus developed in 24 hours dew-drop-like colonies 1—2 mm wide, with a slightly reducing bluish-black central area. None of the other strains exhibited growth after 48 hours of incubation at 37° C. Results obtained by inoculating different bacteria on our medium are presented in Table I.

The practical value of the medium is not diminished by the fact that the Proteus group is able to grow on it (in the form of 2—3 mm wide convex colonies with irregular margin and of a brownish-black colour caused by reduction) as this group has no importance from the point of view of differential diagnosis. Certain problems in connection with the growth of the Micrococcus group will be discussed later.

Medium E67 is rendered elective by containing potassium tellurite, sodium taurocholate and crystal violet. The growth of Gram negative bacilli is inhibited by the potassium tellurite, that of the *Str. haemolyticus* group and the bile susceptible members of the *Str. viridans* group by the taurocholic acid, while Micrococci which have a certain differential diagnostical importance are inhibited by the crystal violet. Enterococci grew well in the presence of these substances.

Our next purpose was to compare the results obtained with those of the biological tests commonly used in the identification of Enterococci. One hundred strains isolated from different samples were tested altogether. The strains were identified by FULLER's serological methods using precipitating immune sera prepared in our laboratory with the LDD76, D39457, RDF78 and LDC1 strains

Table I

Growth of different bacteria on the E67 medium

Number of strains tested	Name of the organism	Growth
	Enterococci	
82	Streptococcus faecalis	+
12	,, liquefaciens	+
2	,, zymogenes	+
	Other bacteria	
10	Streptococcus pyogenes haemol. group	−
45	,, viridans group	−
1	,, lactis	−
1	,, cremoris	−
4	Pneumococcus	−
10	Staphylococcus aureus	−
20	Other micrococci	±
10	Corynebact. diphtheriae	−
10	Other Corynebacteria	−
10	S. typhi	−
10	Other Salmonellae	−
10	Sh. sonnei	−
10	Sh. paradysenteriae	−
20	E. coli	−
10	Proteus	+

of the type strain collection in Prague. In the precipitation tests a strain of the *Str. haemolyticus* group was used as control ; it gave invariably negative results. The commonly used biological tests were also performed with each strain. According to the results, the incidence of the different types among our strains was as follows. *Str. faecalis*, 82 ; *Str. liquefaciens*, 12 ; *Str. zymogenes* 2 ; no *Str. durans* was found.

Table II presents the growth characteristics of the Enterococci on medium E67, as compared to the results of the biological and serological tests. Out of the 98 strains, 97 exhibited typical colonies on our medium after 24 hours of incubation, while one grew only after 48 hours. All the 97 strains but two could be identified as typical Enterococci also in the biological tests. One of the non-typical strains survived 60° C only for 20 minutes and did not grow on milk medium containing 0,1 per cent methylene blue, though as it had the serological characteristics of the group D of Enterococci it had to be looked upon as an Enterococcus. The other strain, while showing typical growth characteristics

Table II

Growth of Enterococci on E67 medium as compared with the biological and serological tests

Biological tests	Serological	E67 medium		Total
		growth	no growth	
positive	positive	84	1*	85
positive	negative	11	—	11
negative	positive	1	—	1
negative	negative	1	2	3
	Total	97	3	100
total positive		95	1	96
	total positive	85	1	86

* This strain grew on E67 medium only after 48 hours of incubation.

on our medium, could neither serologically nor biologically be identified as an Enterococcus. Eleven strains could not be precipitated by our immune sera, thus they could not be regarded as members of the D group. We assume that our immune sera might not contain all the homologous antibodies, as the type specific C substance is not quite the same in all strains.

As it was proved by the above studies that organisms with Enterococcus-like microscopical and colony morphology can be identified simply by cultivating them on E67 medium, we could further omit all the different biological tests. The only problem was that some members of the Micrococcus group are able to grow on this medium too and though the development of their colonies is somewhat inhibited they do not have features sufficiently characteristic for differentiation from Enterococci. A simple method was thus needed to identify the Micrococci eventually grown on the medium. The well-known catalase test was chosen. After testing several hundred strains it was found by ISAACS and SCOULLER [9], that all the Micrococci are catalase positive while none of the Streptococci (pyogenes or viridans), Pneumococci and Enterococci gave a positive reaction. A sufficiently accurate differential diagnosis could thus be made by inoculating the suspected strain to medium E67 and broth and observing the colonies and performing the catalase test after 24 hours.

Summary

1. An elective medium was prepared for the identification of Enterococci.
2. Single members of the Micrococcus group which are able to grow on our medium, can easily be differentiated by the catalase test.
3. The use of the medium allows to omit all the biological test commonly used in the diagnosis of Enterococci.

LITERATURE

1. WEISSENBACH, R. J.: C. R. Soc. Biol. **81**, 559 (1918).
2. BAGGAR, S. V.: J. Path. & Bact. **29**, 225 (1926).
3. FLEMING, A.: J. Path. & Bact. **35**, 831 (1932).
4. HEROLD, C. H. H.: Metropolitan Water Board. London. Thirty-second Annual Report. 1937.
5. HARTMANN, G.: Milchw.-Forsch. **18**, 116 (1937).
6. CHAPMAN, G. H.: J. Bact. **48**, 113 (1944).
7. LITSKY, W., MALLMAN, W. L., FIFIELD, C. W.: Amer. J. Publ. Health **43**, 873 (1953).
8. GREGÁCS, M.: Personal communication.
9. ISAACS, A., SCOULLER, J. M.: J. Path. & Bact. **60**, 135 (1948).

CULTIVATION AND ELECTRON MICROSCOPY OF A BACTERIOCINOGENIC STRAIN OF BACILLUS MEGATERIUM

By

G. Iványovics, L. Alföldi and B. Lovas

Institute of Microbiology, Medical University, Szeged and Electron Microscopic Laboratory of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest

(Received September 6, 1956)

The known patterns of lethal biosyntheses occurring in *Bacillus megaterium* might be classed into three categories. The best studied of these classes comprises the lysogeny and the lysis of sensitive bacteria by phages. Defective lysogenic strains due to an abnormality of prophage can be considered as an another subject of lethal biosyntheses in this microorganism. Strain 91(1) described by Lwoff and Siminovitch (1952) is a well known representative of this class. As it has been described, the young culture of strain 91(1) lyses after irradiation with a light dose of UV light when it is reincubated, altough the lysis of cells is not associated with production of infective phage particles. On the other hand, in exponentially growing cultures of strain 91(1) one phage particle is found for 1000 bacteria.

Lwoff (1954) in his excellent monograph assumes that prophage is also the potential lethal factor in strain 91(1) but the lysis of cells after irradiation is due to the abortive maturation of prophage. In discussing the abortive phage developments, he writes: "Behaviour of 91(1) provides a bridge between lethal actions due to the development of a phage and the production of bacteriocins". This sentence can be regarded as a prediction of the observation (Iványovics and Alföldi, 1954, 1955) we have recently made on some particular strains of *Bacillus megaterium* (strains 216 and 119). When young, exponentially growing cultures of these strains are irradiated with UV light, the cells are lysed at reincubation after a certain period of growth, but instead of phage production a protein-like substance possessing antibacterial action on certain organisms accumulates in the lysate.

A study on the effect of irradiation and its consequence in *Bacillus megaterium* strain 216 revealed that the characteristics of growth under this condition, that is in the "induced state", is reminiscent of that of some inducible lysogenic *Bacillus megateruim* strains. The lysis of bacteria, the cytological events in cells of strain 216 are strikingly similar to those of lysogenic strains. These facts, therefore, suggest a genetical interrelation between megacinogeny and lysogeny in *Bacillus megaterium* (Iványovics and Alföldi, in the press).

Our several attempts have so far failed to demonstrate the presence of infective phage particles either in exponentially growing cultures or in lysates of strain 216. These experiments with negative results were, however, not considered to be decisive because of technical difficulties involved by the presence of megacin. This antibacterial substance might namely interfere with the demonstration of a very low phage production by preventing the growth of phage-sensitive indicator bacteria in the tests. It seemed, therefore, necessary to check our previous results under more strict experimental conditions in order either to demonstrate the lysogeny of this strain or to exclude it with absolute certainty even if phage production in this strain is extremely low. Some observations made during cultivation and electron microscopic examination of this strain are also included in this report.

Material and methods

Bacterial strains. The significant characteristics of *Bacillus megaterium* strain 216 have already been given in our earlier publications. The strain has been maintained by monthly transfer on YDC slant agar.

A number of phage sensitive *Bacillus megaterium* strains were also included in these experiments. These strains originated from DEN DOOREN DE JONG's (1931) studies. Strain 337*b* (asporogeneous) has been obtained from Prof. Welshimer's laboratory (Richmond, Virginia), a strain designated "sensitive" was sent by Prof. Cowles (New Haven, Conn.). This latter strain is a descendent of strain 338*b* isolated by DEN DOOREN DE JONG. Two further phage sensitive strains were also used; strain "mutilate" was obtained from the Institute Pasteur (Paris), and strain KM was kindly sent to us by Dr. Weibull (Uppsala). This latter strain has been extensively studied by NORTHROP (1952).

An R-variant of strain "mutilate" highly sensitive to megacin but completely resistant to megaterium phages has been used to assay megacin selectively (IVÁNOVICS, ALFÖLDI and SZÉLL: to be published). A chromogenous coccus recently isolated by us from air, identified as *Micrococcus aurantiacus* (IVÁNOVICS, ALFÖLDI and ÁBRAHÁM, 1955) was also used for this purpose. Taking advantage of the resistance of strain "coccus 9" to megaterium phages, it has been successfully applied as a selective indicator of megacin.

Megaterium phages. A paper to be published (IVÁNOVICS, ALFÖLDI and SZÉLL) will give particulars concerning the phage strains W, M_1 and M_5 included in the present studies.

Composition and preparation of media. FGG medium is a synthetic nutrient solution (IVÁNOVICS and ALFÖLDI; in the press).

YP medium (yeast extract pepton medium). One kg of baker's yeast was suspended in 5 litres of distilled water and heated in an autoclave to 120° C for 30 min. The suspension was cooled, centrifuged and filtered through an asbestos pad. Ten g of Witte pepton and 5 g of sodium chloride were dissolved in 200 ml of yeast extract, were made up to 1 litre and the pH was adjusted to 7,2. Sterilisation was made at 120° C for 30 min.

YDC medium (yeast extract and digested casein medium). This nutrient has been described as medium-9 in one of our previous paper (IVÁNOVICS and ALFÖLDI, 1955). Five g of enzymically digested casein (Proteolysate, Mead Johnson & Co.) was dissolved in 200 ml of yeast extract obtained by autoclave treatment. The volume was made up to 1 litre; the pH was adjusted to 7,2.

YC medium (yeast extract and acid hydrolysed casein medium). Hundred ml of yeast extract prepared according to LWOFF and GUTMAN was mixed with 50 ml of casein acid hydrolysate and with 20 ml of Sörensen phosphate buffer of pH 7,2 (0,07 mol). The mixture was made up to 1 litre, and its pH was adjusted to 7,2.

The casein hydrolysate used in this medium was prepared as follows. Hundred g of casein were suspended in 500 ml of 20% (w/v) hydrochloric acid and boiled on a sand bath for 24 hours. The residue of syrupous consistency obtained after evaporation of the hydrochloric acid under reduced pressure was dissolved in 200 ml of distilled water. After partial neutralization

the pH was adjusted to 3,4 and the volume made up to 1 litre. By repeated Norit treatment a water-clear filtrate was obtained which was stored under toluene.

The nutrient solutions were converted into solid media by adding 15 g of agar-agar per litre.

Cultivation of bacteria in liquid media. 15 to 20 ml of medium in an Erlenmeyer flask of 100 ml were inoculated and aerated by gentle shaking at 35° C. The growth of liquid culture or the thickness of bacterial suspensions were measured with an "Oriphot" (Budapest) microphotometer with a photoelectric vacuum cell. Measurements were carried out in a circular test tube 15 mm in diameter. Optical density was determined by the logarithmic value of the ratio between incident and transmitted light.

Cultivation of bacteria in soft agar layer has been carried out as recommended by GRATIA (1936) for assaying phages. 0,8 ml of various dilutions of the material to be tested was mixed with 0,2 ml of indicator suspension (optical density 0,4); 1 ml of melted agar was added to it and poured on the surface of an agar plate.

Irradiation of bacterial culture. Exponentially growing culture in liquid medium was poured in Petri dishes in a layer not more than 2 to 3 mm thick and irradiated with UV light while the vessel was gently swirled by hand. A "Hanau" high pressure mercury lamp served as the source of UV light. Further details are found in our earlier paper (IVÁNOVICS and ALFÖLDI, 1955).

Electron microscopic examination. Preparation of material for electron microscopic studies was made with KELLENBERGER's (1952; 1954) technique. Nitro-cellulose dissolved in amyl acetate (0,1%) was poured on the surface of agar plates in Petri dishes. The solution was drained off and the plates dried. The material under investigation was sprayed on the surface of collodion membrane (LOVAS, 1956), and fixed with formalin vapour. The preparations were shadowed with gold. A TTC electron microscope was used for examining the specimens.

Experimental

Examination of culture and lysates of Bacillus megaterium strain 216 for the presence of infective phage particles. Experiments have been carried out in two lines : either centrifugate of exponentially growing cultures or that of lysates of UV irradiated cells were the subject of these investigations. Effort was also made to assay as great an amount as possible of these materials. Megacin, being usually present in the extract of cultures or in the lysate of cells, exerted a certain antibacterial effect on the bacteria used as indicator organisms for detecting phage. To circumvent this untoward effect of megacin on assaying phages, the protein-like megacin was destroyed by trypsin treatment. An aliquot either of centrifugate or that of lysate of strain 216 was diluted with an equal volume of phosphate buffer of pH 8, then a highly purified commercial preparation of trypsin was added to it in a concentration of 0,1%, and incubated at 37° C for 7 hours. Various amounts of either trypsinized or untreated material to be tested for the presence of phage were mixed with a suspension of indicator bacteria. The volume in each tube was made up to 1 ml with saline. After adding an equal volume of melted YP agar to the tubes, their content was layered individually on YP agar plates. Thus the final concentration of agar did not exceed 0,7%. The surface of a dense lawn of bacterial growth was examined for the presence of phage plaques. No phage plaque was, however, found on plates inoculated with either extract of exponentially growing culture or lysate of irradiated cells. The results of these investigations are summarized in Table I.

Table I

Assaying of lysates and centrifugates of cultures of Bacillus megaterium strain 216 for the presence of phage

Aliquots of centrifugates of exponentially growing cultures and that of lysates obtained by induction of the strain with UV irradiation were layered with phage-sensitive indicator bacteria into soft YP agar. The amount of samples tested varied from 0,001 to 0,01 ml in the case of not treated, and from 0,25 to 0,5 ml with trypsinized material for each agar plate

Experiment	Material and its treatment	Indicator strain	Amount of material not showing phage action and the number of bacteria corresponding to it	
			Vol. of material ml	Numb. of corresp. bact.*
i	Centrifugate of broth culture	337b	0,03	$6 \cdot 10^6$
	Centrifugate of YC culture	337b	0,05	$2 \cdot 10^5$
ii	Trypsinized lysate	337b	0,7	$7 \cdot 10^7$
		KM	0,7	$7 \cdot 10^7$
		"sensitive"	0,7	$7 \cdot 10^7$
iii	Centrifugate of YDC culture after trypsinization	337b	1,25	$7{,}7 \cdot 10^8$
		KM	1,25	$7{,}7 \cdot 10^8$
		"mutilate"	1,25	$7{,}7 \cdot 10^8$

* Estimated by haemocytometer count.

Although a number of different indicator strains highly sensitive to megaterium phages were used, not even a single plaque could be observed by examining lysates or centrifugates of strain 216. We failed to detect infective phage in the centrifugate of exponentially growing culture even if an amount corresponding to $2 \cdot 10^9$ cells before sedimentation had been plated. The negative result of such magnitude makes it highly improbable that any phage production would occur in the growing culture of strain 216. In accordance with this, the lysates of cells obtained after UV induction also appeared free of any phage particle. An amount of lysate derived from $2 \cdot 10^8$ cells formed no plaque when it was cultured with a sensitive bacterial suspension.

In order to exclude an eventual deleterious effect of trypsin treatment on megaterium phages, control experiments with lysates containing M_1, M_5 or W phages were made under identical conditions. In these control tests no change whatever of phage titre appeared. This fact indicates that the negative results of assays made with material derived from strain 216 cannot be ascribed to a potential inactivation of phage.

Phenomena reminiscent of phage action occurring in cultures of Bacillus megaterium strain 216. In contrast with our unsuccessful efforts to detect lyso-

geny in strain 216, some particular phenomena highly reminiscent of phage action were several times observed when the strain was cultivated under various experimental conditions. A short account of these observations is reported below.

A striking feature of the colonies of strain 216 appeared sometimes when a young culture of it in FGG medium was irradiated with UV light and plated on YC agar. Fig. 1 demonstrates a typical appearance of the phenomenon. Apart from the colonies of normal appearance, there were also a number of irregular, partly lysed, colonies, with either the centre or the margin "nibbled". The "nibbled" appearance of colonies of various bacteria is known since long and is attributed to phage action.

The appearance of these abnormal colonies urged us to check the possible presence of phage in them although the experiments discussed above did not support this possibility. Therefore, agar cultures containing a considerable number of "nibbled" colonies were washed off with 5 ml saline each. The suspension of bacteria thus obtained was centrifuged, aliquots of its supernatant in which only few cells were left were mixed with indicator bacteria and layered into soft YP agar. Fig. 2 shows the appearance of such a culture. As seen, a number of colonies surrounded by a bacterium-free halo is appearing in the lawn of indicator bacteria. Beside these, a few plaques without central colony are also seen. The striking similarity of these bacterium-free areas to plaques caused by virulent phages was, however, not in accordance with our failure to subculture them, even if different highly phage sensitive *Bacillus megaterium* strains were used as indicators.

Since the origin of the bacterium-free areas reminiscent of phage plaques cannot be attributed to infective phage, it was supposed that these are due to the effect of megacin which is formed when the growth of microcolonies of megacinogenic bacteria is turned into lysis during their development. This assumption was supported by experiments in which indicator strains entirely resistant to megaterium phages yet highly sensitive to megacin were used. Either an R variant of *Bacillus megaterium* (strain "mutilate C") or strain "coccus 9" fulfilled this requirement.

Experiments carried out with these particular indicator strains illustrate from a different angle the conditions which are governing the formation of plaque-like areas. It was observed that the occurrence of plaque-like changes depended on the physiological state of cells of strain 216, on the composition of agar media used for cultivating megacinogenic bacteria, as well as on the way of plating the cells. Only a small percentage of cells of strain 216 are capable of forming colonies when they are plated on the surface of YP agar. Generally, some factors unfavourable for colony formation are promoting the appearance of plaque-like changes. Tables II and III are giving some idea about these factors.

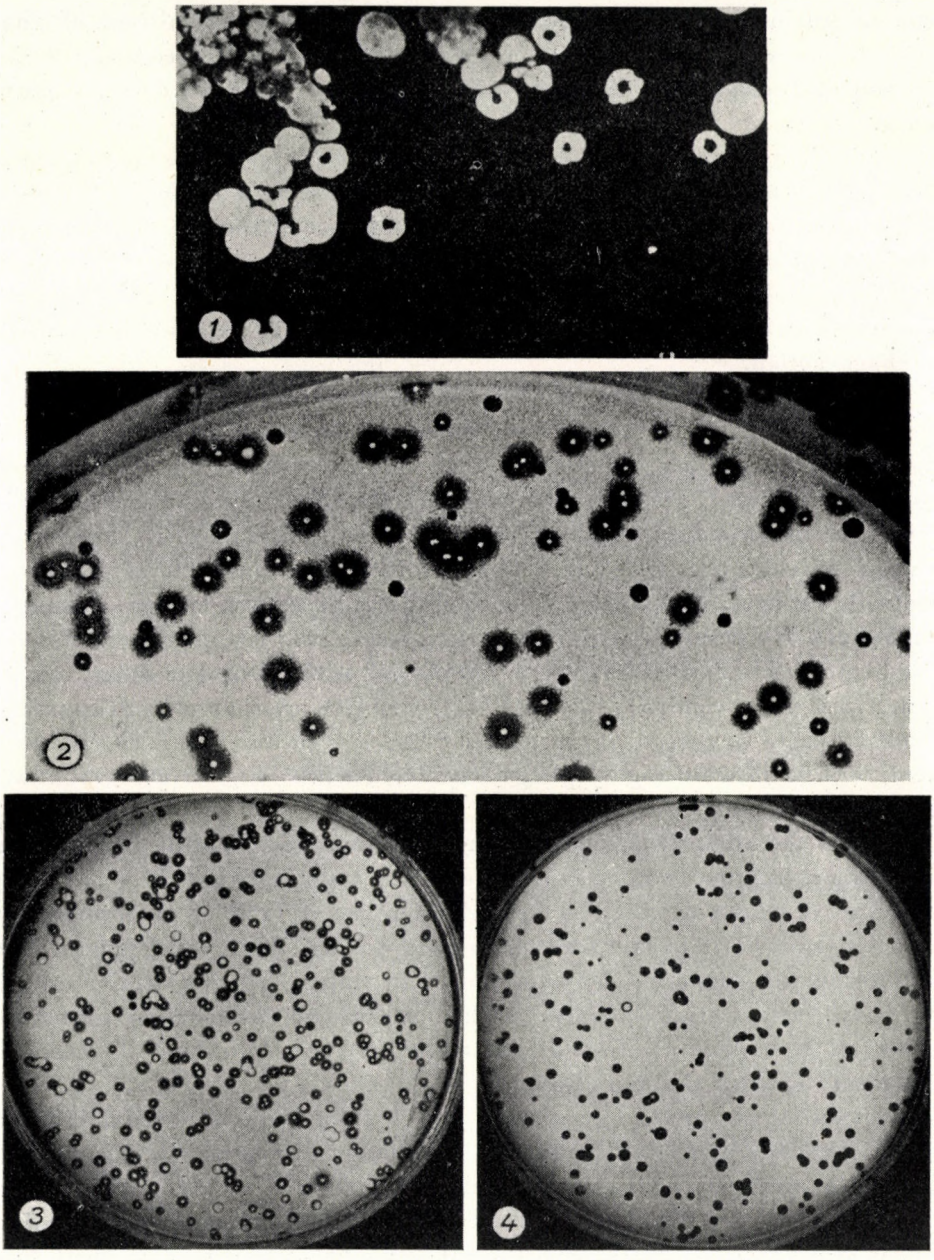


Fig. 1. "Nibbled" colonies of Bacillus megaterium strain 216 on YC agar. Fig. 2. Centrifugate of suspension of "nibbled" colonies after explanting with phage sensitive bacteria into soft YP agar Figs. 3 and *4. Colonies and plaque-like area of Bacillus megaterium strain 216.* A young culture of strain 216 grown in YDC medium was exposed to UV light for 25 sec. A 10^{-4} dilution of this culture was explanted in the presence of phage resistant bacteria (R variant of *Bacillus megaterium)* into YP agar layer. Fig. 3: Explantation immediately after irradiation. Fig. 4: Explantation after 60 minutes reincubation

Table II shows that only about 0,01% of the cells of strain 216 plated on the surface of YP agar is capable of forming colonies. Furthermore, the number of colony-forming units on the other two agar media are nearly identical with the haemocytometer count of bacterial chains. The haemocytometer count is also approximated by the number of colony formers even in YP medium when the cells are not plated on the surface of medium but are poured in soft agar layer. In addition, there is no significant difference in the number of colony formers when the cells are either plated or layered in both YC and YDC agar.

As already stated, an approximately equal number of colonies was found in different media, even in YP agar, when instead of plating a layering of cells was made. This fact suggests either a sparing effect of the semi-anaerobic condition existing in the top agar layer on the cells of strain 216 which at the time of explantation are already in an induced state, or the cells of megacinogenic bacteria are becoming liable to lysis when they are plated on the surface of YP agar.

Table II

Explanting of cells of Bacillus megaterium strain 216 either on the surface of agar plates or into top agar layer

A young culture of strain 216 obtained in FGG synthetic medium (optical density, 0,2 ; haemocytometer count, $3 \cdot 10^7$/ml), was diluted and 0,1 ml of each dilution plated on agar. Simultaneously, 1 ml of each dilution was incorporated into soft agar either with or without indicator bacteria. The indicator strain used in this experiment was a phage resistant *Bacillus megaterium* strain ("mutilate-C"). The counting of colonies with a bacterium free halo and that of plaque-like area, was made after incubation for 20 hours.

Way of explantation	Total number of colony formers and plaque-like areas in various agar media (pro ml)		
	YP	YC	YDC
Plating on surface	$5{,}12 \cdot 10^4$	$3{,}71 \cdot 10^7$	$3{,}76 \cdot 10^7$
In top agar layer	$2{,}86 \cdot 10^7$	$4{,}04 \cdot 10^7$	$4{,}78 \cdot 10^7$
In top agar with indicator bacteria.....	$2{,}62 \cdot 10^7$ (32%)	$4{,}54 \cdot 10^7$ (3%)	$4{,}33 \cdot 10^7$ (0,0%)

Numbers in brackets show percentage of plaque-like formers.

The particular physiological effect of YP agar on megacinogenic bacteria is indicated by the considerable percentage of plaque-like formers. This "spontaneous" induction of cells in the other two kinds of agar, that is, in the YC and YDC media, appears to be negligible.

The ratio of colony and plaque formersof megacinogenic cells at explantation in the top agar layer is variable at will by the extent of reincubation after exposure to UV light. This is demonstrated with the results of an experiment summarized in Table III.

Table III

Colony and plaque-like area formation of cells of Bacillus megaterium strain 216 after irradiation with UV light

Exponentially growing culture of strain 216 in YDC medium was exposed to UV light for 25 sec. and reincubated. At times, various dilutions were made of the culture and explanted in YP agar layer at the presence of megacin indicator bacteria ("mutilate-C").

Reincubation of irradiated culture (minutes)	Optical density of culture	Number of chains/ml*	Number of colony and plaque-like area formers/ml		
			Colonies	Plaque-l. area	Total
0**	0,230	$1{,}75 \cdot 10^6$	$3{,}50 \cdot 10^6$	$0{,}45 \cdot 10^6$	$3{,}95 \cdot 10^6$
30	0,425	$6{,}73 \cdot 10^6$	$7{,}60 \cdot 10^6$	$1{,}19 \cdot 10^7$:	$1{,}95 \cdot 10^7$
60	0,575	$1{,}14 \cdot 10^7$	$0{,}60 \cdot 10^6$	$2{,}41 \cdot 10^7$	$2{,}47 \cdot 10^7$
90	0,625	$1{,}54 \cdot 10^7$	$0{,}50 \cdot 10^6$	$2{,}00 \cdot 10^7$	$2{,}05 \cdot 10^7$
120	0,400	$2{,}21 \cdot 10^7$	$< 1{,}00 \cdot 10^4$***	$2{,}00 \cdot 10^7$	$2{,}00 \cdot 10^7$
150	0,100	$4{,}05 \cdot 10^6$	$< 1{,}00 \cdot 10^4$	$4{,}50 \cdot 10^6$	$4{,}50 \cdot 10^6$
180	0,050	$1{,}45 \cdot 10^6$	$< 1{,}10 \cdot 10^4$	$2{,}50 \cdot 10^6$	$2{,}50 \cdot 10^6$

* Haemocytometer count.

** This time (immediately after irradiation), chains comprising 8 to 10 bacteria each were seen. The number of colony formers found after plating on YDC agar was $3{,}83 \cdot 10^6$/ml.

*** 1 ml of 10^{-4} dilution did not yield colony.

Table III shows that the lysis of irradiated cells proceeds as time passes. In the first half of the experiment (0 to 90 min.) the total number of colony and plaque-like formers exceeded the haemocytometer count. This discrepancy was probable due to a breaking up of chains by manipulations when performing the test. The difference, however, disappeared by the second half of the experiment. During reincubation the number of units capable of forming colonies was gradually decreasing. At the same time, the percentage of plaque-like area formers was increasing. By the end of the experiment no colonies but only plaque-like areas developed on the plates. Figures 3 and 4 are illustrating the conditions prevailing in experiments similar to the one reported.

Electron microscopic studies. Electron microscopic investigations, in agreement with the negative results of our experiments, also failed to detect phage in cultures of strain 216. Neither mature phage particles nor granules reminiscent of some incomplete form of phage were found around the cells in different stages of lysis. Figs. 6 to 11 show cells grown in YDC medium, irradiated with UV and sprayed on collodion membrane after various reincubation periods. Figs. 12 and 13 show an exponentially growing culture which was sprayed on collodion membrane, placed on YP agar, and was incubated after irradiation of the cells *in situ*.

A microcolony consisting of cells in different stages of lysis is seen on Fig. 6. Elongated, already partially lysed cells are also demonstrated in Figs. 9 and 10. The disintegrated cell shown in Fig. 10 still possesses remnants of cell wall on both ends. Some of the pictures fairly well demonstrate the far advanced disintegration of the cells.

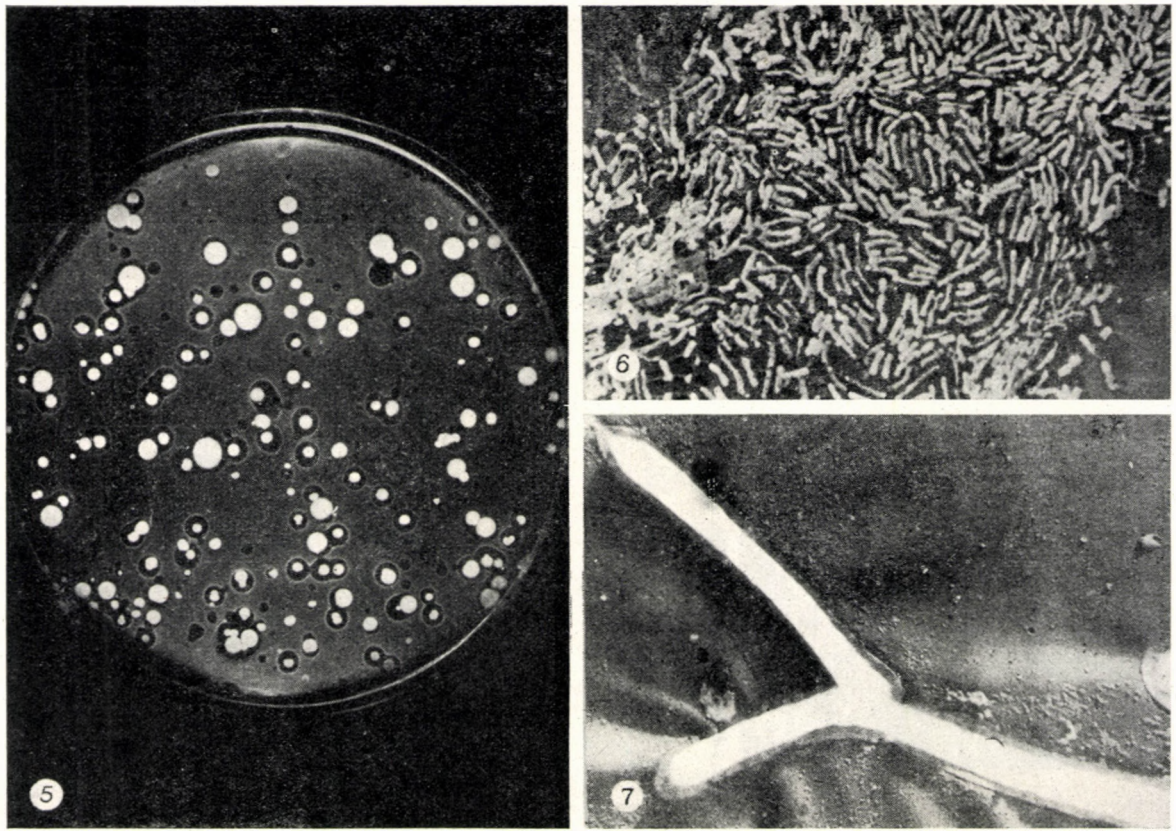


Fig. 5. Colonies and plaque-like area formed by *Bacillus megaterium* strain 216 explanted with "coccus 9" in soft YP agar layer. *Fig. 6.* Induced cells of *Bacillus megaterium* strain *216*. Young culture in YDC medium irradiated with UV, reincubated for 90 min, and sprayed on collodion membrane. Magn.: ×600. *Fig. 7.* Elongated cells of strain 216. after UV irradiation and reincubation for 60 min. Magn.: ×4860

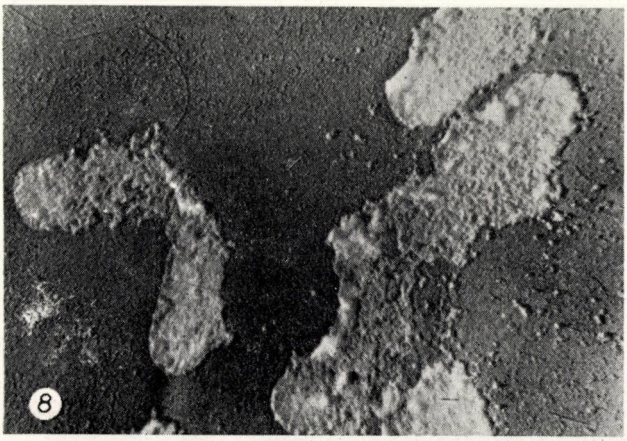




Fig. 8. Heavily lysed cells of strain 216 (reincubation for 90 min after UV irradiation). Magn.: × 10 800
Fig. 9. Elongated and partially lysed cells of strain 216 (reincubation for 90 min). Magn.: × 5400



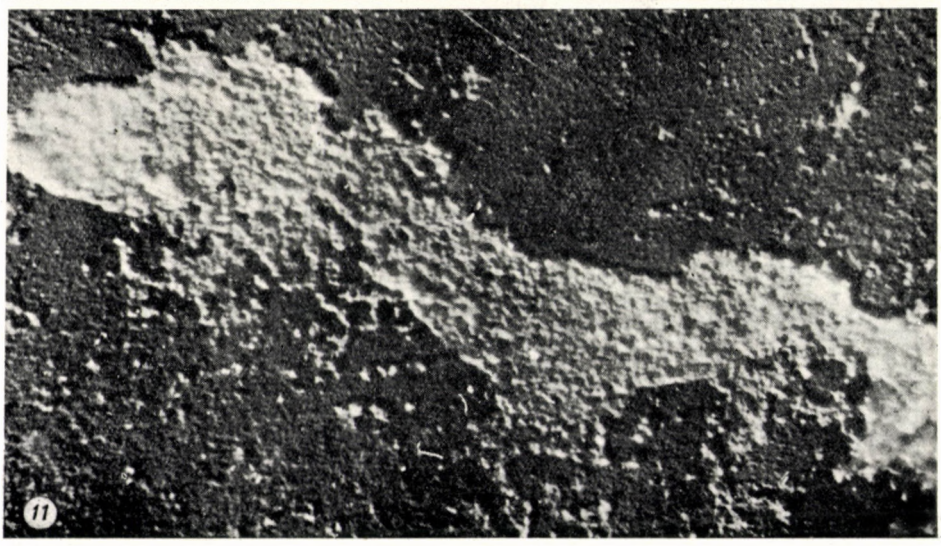
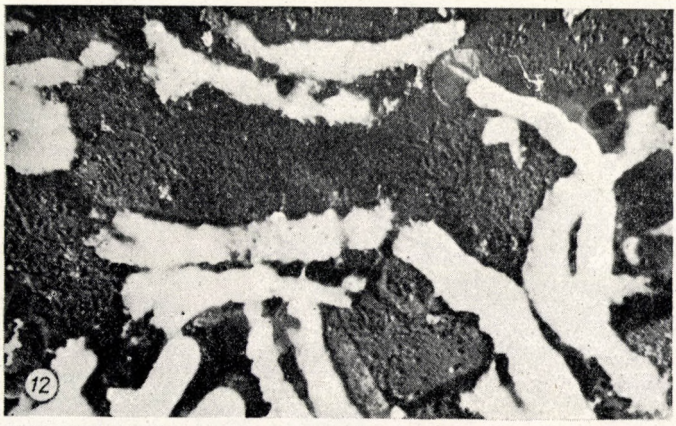


Fig. 10. Same material as in *Fig. 8.* Magn.: ×12 420. *Fig. 11.* Heavily lysed cells of strain 216 (reincubation for 90 min). Magn.: ×9860



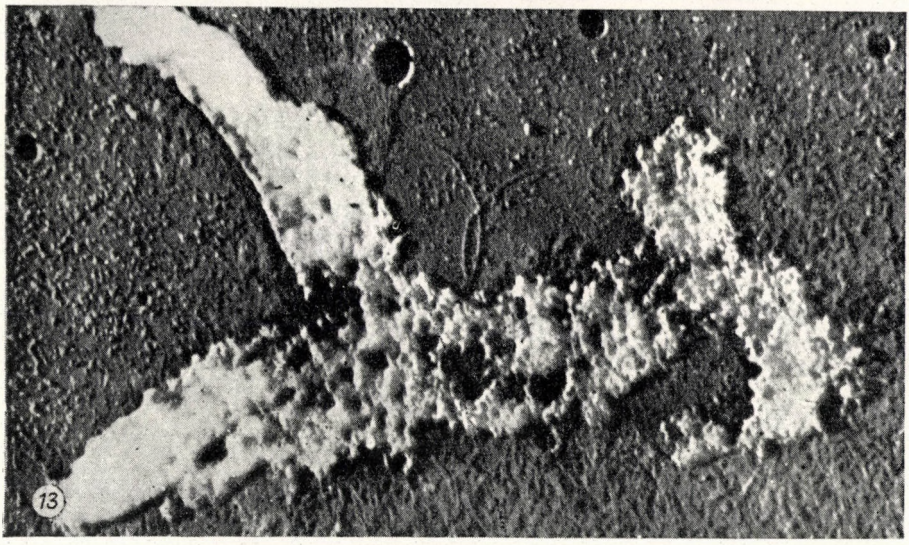


Fig. 12. Heavily lysed cells of strain 216. Bacteria grown in YDC medium were sprayed on collodion membrane placed on YP agar irradiated (15 sec) and reincubated for 120 min. Magn.: ×5400 *Fig. 13.* Heavily lysed cells of strain 216 (prepared as in Fig. 12). Magn.: ×12150

Discussion

The similarity between phages and bacteriocins has been stressed by various investigators (LWOFF, 1953; FRÉDÉRICQ, 1953). LATARJET and FRÉDÉRICQ (1955) produced experimental evidence supporting the hypothesis that bacteriocinogenic bacteria were genetically capable of forming a protein which corresponds to the protein part of phage. The biochemical investigations carried out by GOEBEL et al (1955) on a colicinogenic strain, however, do not corroborate this view. In addition, FRÉDÉRICQ (1954, 1955) was not able to produce evidences of the inducibility of colicinogenic strains by UV irradiation; only a slight enhancement of colicin production, but no lysis was brought about by UV treatment. His strains were, beyond question, not lysogenic. The colicinogenic strain ML inducible by irradiation (JACOB, SIMINOVITCH and WOLLMAN, 1952) is producing both colicin and phage particles during its lysis after exposure to UV light and reincubation (KELLENBERGER, personal communication). The above-mentioned experimental facts are suggesting that the lysis of inducible *Escherichia coli* strains is due to lysogeny rather than to bacteriocinogeny.

JACOB (1954) studied a particular *Pseudomonas pyocyanea* strain, the cells of which display lysis on UV irradiation. Mass lysis ensued with liberation of an antibacterial principle termed pyocin. This strain, however, has not been thoroughly studied as to a potential abortive lysogeny, so that it is still questionable whether its lysis was not due to a defective lysogenic behaviour with an extremely low rate of phage production. Lysogeny is very common among *Pseudomonas pyocyanea* strains, although for its detection sometimes special precautions are necessary ALFÖLDI (1954) has recently reported that 48 out of 50 *Pseudomonas pyocyanea* strains proved to be lysogenic when a great number of indicator strains were employed for establishing their lysogenic character. The marked host specificity of temperate pyocyaneous phages deserves serious consideration when testing *Pseudomonas pyocyanea* strains for lysogeny.

The bacteriocinogenic strain 216 of *Bacillus megaterium* is inducible by UV light, and the factors playing roles in its inducibility are very similar to those of the characteristically lysogenic strain of this species, strain 899 (1) (IVÁNOVICS and ALFÖLDI; to be published). On the other hand, our present investigations have clearly shown that the bacteriocinogenic character of this strain is not associated even with the slightest degree of phage production. The question therefore arises whether some abnormal prophage might be responsible for the inducibility and for megacin production in this strain. When it is realized that the answer to this question is yet premature, it is of interest to speculate about some facts which are already known. First of all, it is striking that the antibacterial spectrum of megacin does not run parallel with the host range of temperate megaterium phages (IVÁNOVICS, ALFÖLDI and SZÉLL; to be published); R mutants of *Bacillus megaterium* strains are entierely resistant

to phages, but they are sensitive to megacin. Similarly, a number of strains belonging to different bacterial species, including different chromogenous coccus species, appeared also to be sensitive to this bacteriocin. The differences in range of action between megacin and megaterium phages make it very improbable that the bacteriocin produced by strain 216 would be the protein part of a hypothetic phage which might be capable of acting as a "killer" (HERRIOT, 1951) on the host of phage (BONIFAS and KELLENBERGER, 1955). It is supposed that the inducible lysis and bacteriocinogeny are due to an abnormality of a hypothetic prophage carried by the cells of strain 216. The protein-like megacin which is produced in consequence of induction of this abnormal prophage could hardly be accepted as a normal protein component of this hypothetic temperate phage. It might be rather either a product of an abnormal synthesis of the phage protein or a by-product of phage synthesis, which is also somehow governed by the hereditary character of the hypothetic prophage.

Summary

A particular strain of *Bacillus megaterium* (strain 216) capable of liberating a bacteriocin-like agent which has been termed megacin was studied. This strain reminiscent of inducible lysogenic *Bacillus megaterium* strains did not yield phage particles when lysing after UV irradiation. Similary, no phage was found in its exponentially growing culture. Electron microscopic observations were in accordance with these results. Neither typical phage particles, nor granules which might be regarded as an incomplete form of phage, were seen around the lysing cells. The investigations clearly showed that the bacteriocinogenic property of the strain is not associated even with the slightest degree of phage production. In contrast with the non-lysogenic character of strain 216, some particular phenomena highly reminiscent of phage action were observed when the strain was cultivated under various experimental conditions. These phenomena, however, can be interpreted as a consequence of megacin formation of young colonies of *Bacillus megaterium* strain 216. The significance of these observations has been discussed.

LITERATURE

ALFÖLDI, L.: Thesis, 1954.
BONIFAS, V. and KELLENBERGER, E.: Bioch. Biophys. Acta **16**, 330 (1955).
DEN DOOREN DE JONG, L. E.: Zbl. Bakt. Orig. I. **120**, 15 (1931).
FRÉDÉRICQ, P.. Ann. Inst. Pasteur **84**, 294 (1953).
FRÉDÉRICQ, P.: C. R. Soc. Biol. **148**, 1276 (1954).
FRÉDÉRICQ, P.: C. R. Soc. Biol. **149**, 2028 (1955).
GOEBEL, W. F., BARRY, G. T., JESAITIS, M. A. and MILLER, E. M.: Nature **176**, 700 (1955).
GRATIA, A.: C. R. Soc. Biol. **123**, 322 (1936).
IVÁNOVICS, G. and ALFÖLDI, L.: Nature **174**, 465 (1954).
IVÁNOVICS, G. and ALFÖLDI, L.: Acta Microbiol. Hung. **2**, 275 (1955).
IVÁNOVICS, G., ALFÖLDI, L. and ÁBRAHÁM, E.: Zbl. Bakt. Orig. I. **163**, 274 (1955).
JACOB, F.: Ann. Inst. Pasteur **86**, 149 (1954).
JACOB, F., SIMINOVITCH, L. and WOLLMAN, E.: Ann. Inst. Pasteur **83**, 315 (1952).
KELLENBERGER, E.: Ztschr. Mikroskopie **6/7**, 412 (1952).
KELLENBERGER, E.: Rapp. Europ. Congr. Electr. Micr. Gent (1954).
LATARJET, R. and FRÉDÉRICQ, P.: Virology **1**, 100 (1955).
LOVAS, B.: Acta Microbiol. Hung., in press.
LWOFF, A.: Ann. Inst. Pasteur **84**, 225 (1953).
LWOFF, A.: Bacteriol. Rev. **17**, 269 (1954).
LWOFF, A. and GUTMAN, A.: Ann. Inst. Pasteur **79**, 815 (1950).
LWOFF, A. and SIMINOVITCH, L.: Ann. Inst. Pasteur **82**, 676 (1952).
NORTHROP, J. H.: J. Gen. Physiol. **35**, 471 (1952).

STREPTOMYCIN RESISTANCE OF SERRATIA MARCESCENS

By

B. GYŐRFFY and I. KÁLLAY

Institute of Genetics, Budapest

(Received September 14, 1956)

The origin and mechanism of microbial resistance to drugs has aroused exceptional interest. Innumerable experiments were made, different interpretations were developed, several reviews and general articles were issued [3, 6, 11, 13, 34] and the problem of drug-resistance was discussed in the symposia held in London, 1953, and Washington, 1954 [14, 27].

The controversy referred to the problem whether drug resistance is acquired by the individual cells as a result of their exposure to the drug, or whether, instead, resistance arises by a mutation in a relatively small proportion of the cell population and the drug is only a selective agent killing off the normal sensitive cells and thus favouring the survival and selective proliferation of the resistant mutants.

The categorical and exclusive views of the past, the theories of mutation and selection versus phenotypic adaptation have already lost their rigidity, and the current trends to consider the complementary rather than mutually exclusive interpretations are obvious in our days.

The development of streptomycin resistance is considered by several investigators to be of mutational origin [9, 18, 25, 34]. There are, however, some observations which could be interpreted by assuming a direct physiological adaptation [15, 20, 28], and it was suggested that in some cases both processes may be at work [2].

In the course of our investigation a study was made of the action of streptomycin on *Serratia marcescens* and of the way in which resistance develops.

This microorganism has already been genetically investigated in some detail [*e. g.* 4, 17], but there are only some few data concerning its streptomycin resistance [21, 35].

This paper examines the resistance to streptomycin in *S. marcescens* in general and a following paper will consider in greater detail the origin of resistant organisms.

Material and methods

The strain of *Serratia marcescens* BIZIO (*Bacterium prodigiosum* LEHMANN and NEUMANN) used in the experiments was obtained through the courtesy of Prof. Z. ALFÖLDY (Institute of Microbiology, University Medical School, Budapest).

The synthetic nutrient medium consisted of: $(NH_4)HPO_4$, 4,0 g; ferriammonium citrate, 0,3 g; NaCl, 0,3 g; $MgSO_4$, 0,3 g; K_2HPO_4, 0,6 g; KH_2PO_4, 1,1 g; sodiumcitrate, 2,0 g; saccharose, 30,0 g; dist. water 1000 ml; pH 6,4; when necessary, 2% agar.

Working stocks were carried on nutrient agar slopes and stored at 4° C. The liquid cultures were made in test tubes with 3 ml nutrient medium. Inocula were prepared from an overnight (18—22 hours) culture grown in synthetic medium usually containing 10^9 bacteria per ml. Decimal dilutions were made in saline with spiral loops giving standard 0,2 ml (30). Streptomycin stock solution (100 μg per ml) was made from streptomycin sulphate of commercial samples (Chinoin, Budapest) in phosphate buffer of pH 6,2, and stored in refrigerator for 3—4 months. Preparing the streptomycin agar, the streptomycin was added just before pouring.

The plating technique consisted of pipetting 0,1 ml of the appropriately diluted cell suspension on to the solidified agar and spreading it over the entire surface with a sterile bent glass rod. The endeavour was made mostly with success, to use an inoculum which would give colony counts of 50—300 colonies on the plates. The counts were made after incubation at 30° C. Most colonies became visible after 24 hours of incubation on plates with low concentration of streptomycin, and after 48 or 72 hours at higher concentrations. On plates with few colonies the probable error, arising from the small counts, is considerable. However, all platings were performed in duplicate or triplicate, and every type of experiment was put up repeatedly. In some cases the velvet pad replicate technique for serial transfers was used. The experiments were performed from November, 1954, to August, 1956.

Experimental results

The degree of sensitivity of S. marcescens

As a measure of the streptomycin sensitivity of the original population the threshold concentration of the streptomycin was determined in liquid cultures and in platings on nutrient agar respectively. At threshold concentration a large proportion of the cells is capable of growing out, and this proportion falls off considerably with the increase of concentration.

Test cultures were inoculated to an initial count of 10^2—10^5 bacteria per tube with 3 ml nutrient medium to which streptomycin in concentration ranging from 0 to 24 μg per ml was added, and incubated 24, 48 and 72 hours at 30° C.

As it was expected, the concentration of streptomycin markedly inhibiting the growth of a culture depends on the size of the inoculum and the time of incubation. With small inocula and/or with short incubation, the limit of the proliferation of cells as established by the visible turbidity of the culture, is obtained at a lower concentration than with large inocula and/or with longer incubation. The apparent number of resistant cells in a sample diminishes with the dilution of the inoculum.

The growth of *S. marcescens* is inhibited in liquid cultures by 6 μg streptomycin per ml when the test cultures were inoculated with 10^2 cells and incubated 24 hours. Visible turbidity developed in the presence of 6,5 μg streptomycin per ml only after 72 hours incubation.

In further experiments the threshold concentration was determined on series of plates with the replica technique and with direct platings.

About 150 cells were spread on the surface of an agar plate and incubated 6 hours. Serial replicas were then transferred with velveteen to nutrient agar plates containing streptomycin (series R). In another experiment 10^2 and 10^3 cells were directly plated on streptomycin agar.

In one series (A) the inoculum was from an overnight culture as usual, in the other one (B) it was prepared from a 5-day culture. Colony counts were made after 24 hours incubation and the proportion of survivors were plotted logarithmically (Fig. 1).

The threshold concentration are indicated on the curves by sharp breaks, the number of survivors decreasing very rapidly with the increase of concentration. On the replica plates containing streptomycin above 4 μg per ml the decrease of survivors was considerable ; their proportion was approximately $1 \cdot 10^{-1}$ on the plates with 8 μg streptomycin per ml, followed by a sharp break of the survival curves above this concentration (curves R). In the series with

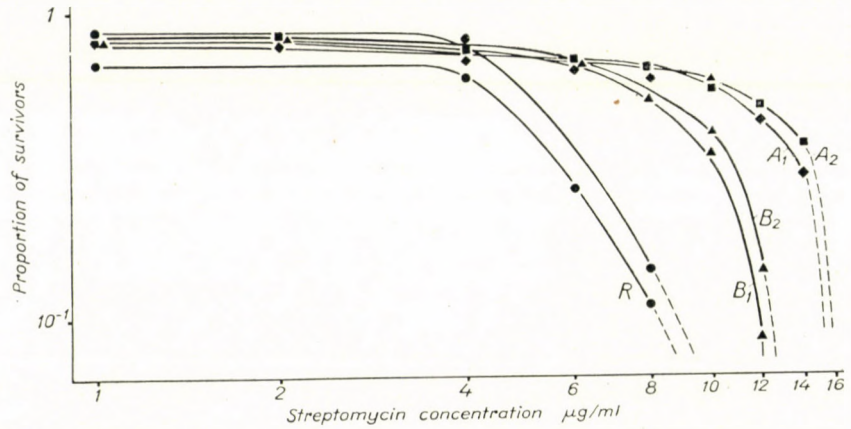


Fig. 1. Survival curves for suspensions of *Serratia marcescens* plated in the presence of increasing concentrations of streptomycin. The number of cells plated was 10^2 (A_1, B_1) and 10^3 (A_2, B_2), originating from a usual overnight culture (A) and from a 5 days old culture (B). Curves R represent the survival on replica plates

direct spreading of the cells the decline of the survival curves was at 10—12 μg per ml and the $1 \cdot 10^{-1}$ survival at 12—14 μg per ml was followed by a further sharp break. The curves were slightly shifted when the number of cells plated was increased from 10^2 to 10^3 within an experiment (see curves A_1, B_1, and A_2, B_2, respectively).

The differences in the shift of the survival curves between the experiments may be due to the different physiological state of the cells used as inocula in replica platings and direct platings. The cells were in active growth on the parent master plate when imprinted on the replica plates. These cells proved to be more sensitive to streptomycin than the cells orginating from liquid cultures in exponential growth (A) or from non-growing, old cultures (B). These cells were plated after serial dilution in saline and they attained a non-proliferating state.

The streptomycin sensitivity of a bacterial population can be measured either by the 50 per cent lethal dose, or by the threshold concentration. WELSCH [34] has taken the "concentration maximale tolérée", the concentration in the presence of which the number of viable cells decreases by 10 per cent. Recently,

MAYR-HARTING [22] has proposed for practical purposes the concentration allowing 10 per cent survival. Therefore, we also attempted to standardize the establishment of streptomycin sensitivity, to be able to compare also the determinations performed in liquid cultures with those on agar plates. A sharp decline of the curves was found approximately at the $1 \cdot 10^{-1}$ survival proportion, *i. e.* when 10 surviving cells among 10^2 cells plated were forming colonies. Furthermore, in a liquid culture about 10 cells are giving a visible turbidity, which equals about 10^7 cells after an overnight growth. The higher sensitivity of the cells in liquid cultures in comparison to solid media is obvious.

Accordingly, we used as a measure of the sensitivity to streptomycin (I) in liquid test cultures that concentration of streptomycin in the presence of which an inoculum of 10^2 cells produced visible growth after 24 hours incubation, or (II) on serial plates that concentration in the presence of which the proportion of survivors forming colonies was about $1 \cdot 10^{-1}$ after 24 hours incubation when 10^2 cells had been plated.

The streptomycin sensitivity of *S. marcescens* may be characterized also by the minimum inhibiting concentration of streptomycin. This is the concentration in the presence of which the number of colony-forming cells is approximately equal to that in the control [32].

When $1—2 \cdot 10^2$ cells were plated on nutrient agar containing streptomycin ranging from 0 to 0,6 μg per ml, the colony counts were the same after 24 hours on each plate within the experimental error. When test-cultures containing streptomycin in increasing concentration were inoculated with 10^2 cells, and after 24 hours incubation the number of survivors was established by plating 700 cells per plate on plain nutrient agar, a slight decrease of the number of cells was found in the culture with 0,5 μg streptomycin per ml. However, when only 50 cells were spread the minimum inhibiting concentration was about 0,15 μg streptomycin per ml (Table I.) These results indicate that the number of cells plated on the agar surface affects considerably the number of survivors [33].

Table I

The minimum inhibiting concentration of streptomycin for S. marcescens taken from a typical experiment

Concentration of streptomycin μg per ml	Number of colonies on plates	
0	49	49
0,1	50	66
0,2	41	39
0,3	27	32
0,4	34	25

The threshold concentration, as well as the minimum inhibiting concentration, could be established only approximately owing to the range of experimental errors occurring in the single experiments performed at different intervals.

Survival of S. marcescens after short exposure to streptomycin

Recently, BRYSON and SZYBALSKI [3] have emphasized the necessity of a distinction between bactericidal and bacteriostatic effects of the antibiotics, since the failure to recognize it may lead to spurious illusions of differences in resistance levels. Therefore, *S. marcescens* cells were exposed to streptomycin for a limited time, and the proportion of the cells surviving the bactericidal action was measured by plating on plain nutrient agar.

In these experiments $5 \cdot 10^5$ cells were inoculated per ml in liquid cultures to which streptomycin from 0 to 1000 μg per ml was added. After incubation at 30° C, 0,1 ml of these cultures or appropriate dilutions were removed at intervals and plated immediately. Growth curves were constructed from viable counts. The joint effects of concentration and time of exposure on proportion of survivors of *S. marcescens* exposed to streptomycin, based on data of five ndependent experiments are summarized in Figs. 2 and 3.

Multiplication of the cells started in the cultures containing streptomycin in low concentration after a 120—150 min. lag phase. The per cent of survivors in the populations of non-proliferating cells decreased slightly under the action of 2—16 μg streptomycin per ml, approximately without any further change during the lag phase (Table II).

Table II

Per cent of surviving cells of S. marcescens after a short exposure to low concentrations of streptomycin

Time of exposure min	Percentage of colony-forming cells on agar plates with streptomycin (μg per ml)													
	0	2	4	6	8	12	16	24	50	80	100	250	500	1000
30	100	91	77	75	71	72	54	51	50	40	40	6	0,9	—
60	100	91	77	75	56	72	69	64	25	20	7,5	0,4	0,2	0,1
90	100	91	77	75	79	72	72	73	40	15	6,9	0,2	0,1	—
120	100	89	80	80	79	86	89	74	15	7,3	1,4	0,2	—	—
150	133	91	85	83	91	91	97	64	8,7	1,6	0,2	—	—	—
180	190	96	98	100	100	110	65	82	2	0,2	0,7	—	—	—
360	—	190	178	198	158	166	158	12	—	—	0,2	—	—	—

In other words, *S. marcescens* cells in the non-proliferating state are proportionately sensitive to the increase of streptomycin concentration below the threshold concentration, and within 120 minutes the degree of sensitivity seems to be independent of the time of exposure. However, it must be taken into account

that the plate counting technique is not sufficiently accurate to establish with certainty an 80 per cent survival [12]. Beyond the threshold concentration the number of survivors decreased proportionally with the time of exposure.

In the cultures containing streptomycin from 2 to 16 μg per ml, the growth of the cells observed was lower than in the drug-free cultures. It is suggested from the slight increase of the curves that growth and partial death of the cells occurred simultaneously. The shape of decline of the 20 μg streptomycin curve indicates also some growth of the surviving cells.

Similar results were obtained by DEMEREC [10] with *E. coli*.

Resistance of surviving cells exposed to streptomycin for a limited time

It was not expected that the cells surviving a limited exposure to streptomycin became relatively resistant in comparison with the cells of the original parent population.

Ten colonies out of 300 formed on the nutrient agar by the surviving cells after 30 minutes exposure to 16 and 24 μg streptomycin per ml, respectively, were picked off at random. $2—10 \cdot 10^2$ cells from the suspension of the colonies were plated immediately on agar medium incorporated with 16 and 24 μg streptomycin per ml.

There were in no case any surviving of cells capable of forming colony on the plates containing streptomycin in the same or in slightly higher concentration than that prevailing in the plate from which they had been taken.

In another experiment samples of single colonies developed from cells surviving the bactericidal action of 80, 100, 250, 500 and 1000 μg streptomycin per ml for 6, 3 and 1 hour, respectively, were re-tested for their degree of resistance. None of these samples originating from cells surviving the bactericidal action of streptomycin in a proportion of $2—4 \cdot 10^3$ attained resistance during an exposure for some hours, and formed colonies on plates containing 50 μg streptomycin per ml.

Survival of S. marcescens on the bacteriostatic action of streptomycin

The proportion of cells surviving the bacteriostatic action of streptomycin was estimated by counting cells selected on the basis of their ability to form colonies in streptomycin containing media [3].

Determination of the survival was made by platings on nutrient agar containing streptomycin from 2 to 1000 μg per ml. The size of the inoculum was adjusted so that there should be 50 to 500 surviving cells forming colonies on the plates with different levels of streptomycin. The proportions of survival determined by counting the colonies formed on streptomycin agar from several sets of experiments are represented by survival curves plotted in logarithmical scale in Fig. 4. The average proportion of survivors is given in Table III.

A picture of the distribution of the ability among the individual cells of the original population of *S. marcescens* to survive the action of streptomycin was obtained in the experiments.

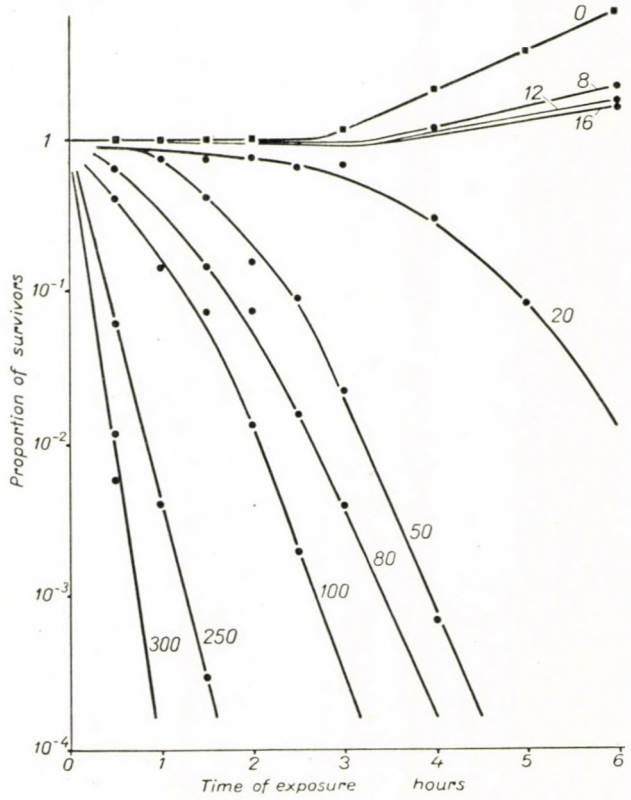


Fig. 2. Comparison of survivors of *S. marcescens* exposed to streptomycin for a limited time. Numbers on curves indicate concentration of streptomycin in μg per ml in the cultures of series of tests

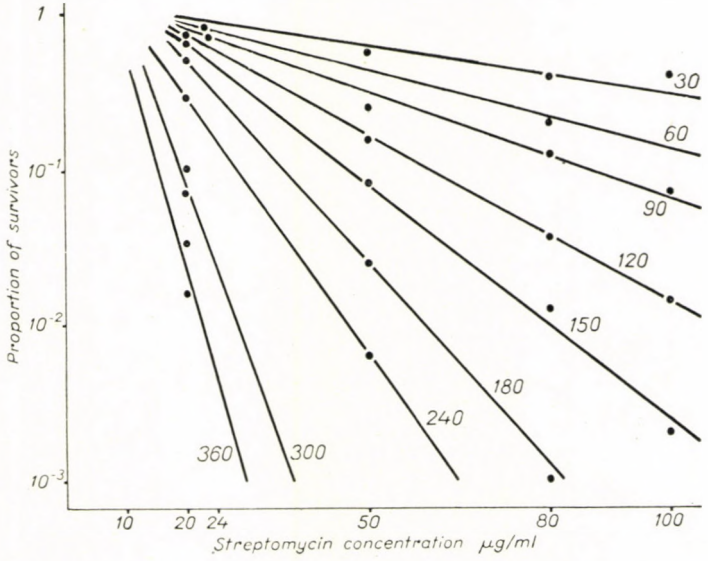


Fig. 3. The joint effect of concentration and time of exposure on proportion of survivors of *S. marcescens* exposed to streptomycin. The curves represented are statistical abstractions by averaging several sets of data. Numbers on curve indicate time of exposure in minutes

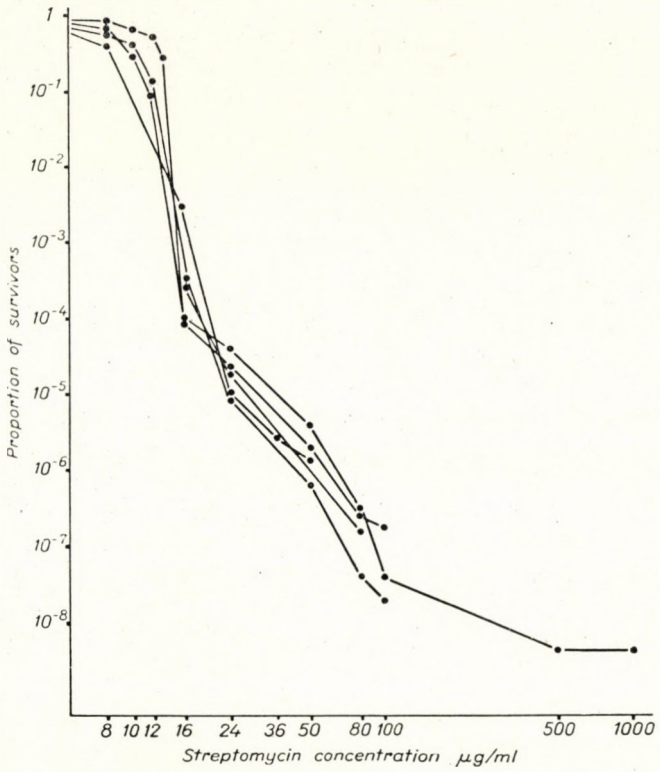


Fig. 4. Survival curves for *S. marcescens* plated on nutrient agar containing various concentrations of streptomycin

Table III

Fraction of survivors in the presence of streptomycin. The values are averages of several sets of data in actual experiments

Conc. µg/ml	Survival fraction	Conc. µg/ml	Survival fraction
2	$8{,}2 \cdot 10^{-1}$	16	$1{,}5 \cdot 10^{-4}$
4	$7{,}4 \cdot 10^{-1}$	24	$1{,}5 \cdot 10^{-5}$
6	$7{,}0 \cdot 10^{-1}$	36	$4{,}0 \cdot 10^{-6}$
8	$6{,}5 \cdot 10^{-1}$	50	$1{,}2 \cdot 10^{-6}$
10	$5{,}5 \cdot 10^{-1}$	80	$2{,}2 \cdot 10^{-7}$
12	$2{,}0 \cdot 10^{-1}$	100	$8{,}8 \cdot 10^{-8}$

It was found that at low streptomycin concentration nearly all bacteria survived and formed colonies. There is a sharp break of the survival curve near the threshold concentration. Beyond this the slope of the curve is very steep and the number of survivors decreases rapidly, but slowly levels out with the con-

centration increasing to the critical concentration, *i. e.* approximately 80—100 μg per ml. Beyond this point the proportion of viable cells then remains nearly constant, in the order of 1 per 10^8 plated cells. Survivors continued to appear occasionally even at 1000 μg per ml, at the highest concentration used in these experiments.

Survival proportions were greatly deviating in the sets of experiments made at different times, owing to the unavoidable differences in the experimental conditions. This range of the experimental values amounted among the experiments to 1—2 decimals.

A similar form of distribution of the survival to streptomycin was observed by DEMEREC [9] with *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, although the sensitivity of *Micrococcus* is higher than that of *Serratia* found in our experiments. Recently, WELSCH [34] has established the same heterogeneity of the populations of several bacterial species.

Resistance of cells surviving the bacteriostatic action of streptomycin

The *S. marcescens* cells surviving on plates with lower streptomycin concentrations formed colonies in 24 hours, however, on the plates containing streptomycin above 36 μg per ml, visible colonies appeared only after 48 or 72 hours incubation. It was therefore reasonable to assume that these clonal surviving cells are resistant to the streptomycin concentration isolating the colonies [12].

In these experiments to establish the degree of resistance, single colonies were picked at random from plates containing streptomycin between the minimum inhibiting concentration and the critical concentration. In each case the suspensions of the colonies were plated with samples of about 10^3 cells, mostly immediately, without subculturing on agar plates with gradually increasing concentrations.

Four out of ten colonies formed in the presence of 4 μg streptomycin per ml possessed the same sensitivity as the original population. Six, however, showed some tendency to a slightly higher survival. Similarly, four colonies out of eight from 8 μg streptomycin plates were also found slightly more resistant to the same concentration in re-test than the parent population.

Ten colonies from plates containing streptomycin 16 and 24 μg per ml, respectively, and re-tested with high size of inocula (0,6—1 $\cdot$ 10^3), on plates containing the same concentration of streptomycin were found fully resistant to these concentrations.

The distribution of resistant cells in the clonal populations of the colonies formed on streptomycin plates were also compared in relation to the concentration from which they had been isolated, in re-test (Fig. 5).

Some of the colonies on the plates with 12 μg streptomycin per ml contained cells resistant to 12—14 μg streptomycin, but sensitive to 16 μg streptomycin. However, a fraction of some other colonies survived 36 μg streptomycin

per ml. The cells of the colonies were not homogeneously "adjusted" to this low concentration isolating the colonies. The colonies of the 50 μg streptomycin plates were resistant to 16 μg streptomycin, although some of them were sensitive to 24 μg while the others contained cells surviving on the plates containing 24 and 50 μg streptomycin per ml. Similarly, the colonies of the plates with

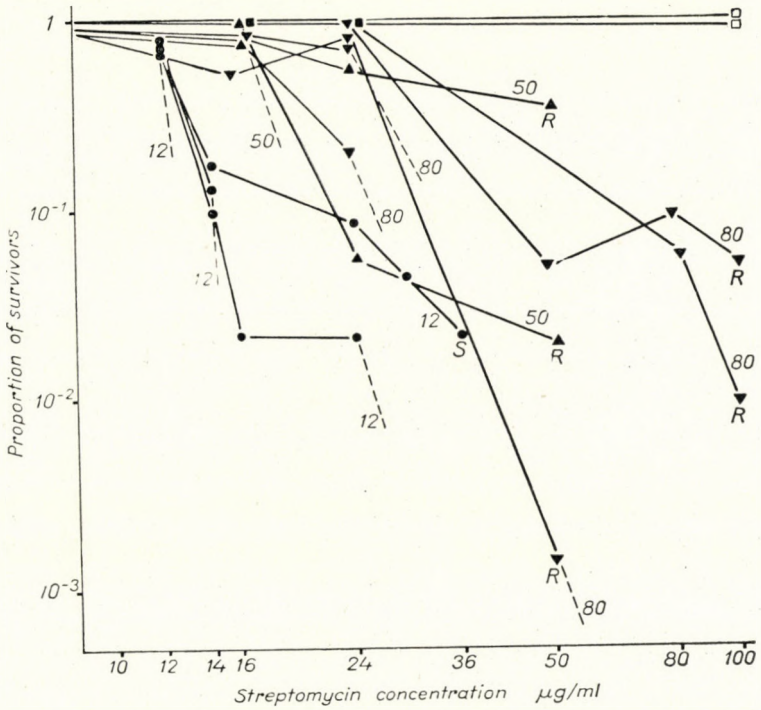


Fig. 5. Survival curves for the clonal populations of colonies of *S. marcescens* formed on streptomycin plates. Numbers on curves indicate the streptomycin concentration of the plates from which the colonies had been isolated. The letters S and R indicate colonies which were found sensitive and resistant, respectively, to the same streptomycin concentration in a subsequent re-test

80 μg streptomycin were heterogeneous, only some of them were resistant to 24 μg and containing also cells forming colonies in the presence of 80 and 100 μg streptomycin. At the same time, some others did not survive even on 50 μg streptomycin plates. All the colonies surviving 100 μg streptomycin were totally resistant in the re-test.

In some instances the proportion of cells capable of growing again on the same streptomycin plates was low. Thus it seems probable that these colonies had developed from first step variants with a lower degree of resistance, and they were only "overlaps" at the higher concentrations isolating the colonies. That fraction of cells surviving a higher concentration of streptomycin in the re-test

The stability of resistance to streptomycin of the variants selected has been frequently observed with other bacteria [*e. g.* 3, 12, 19, 34]. On the plates containing 100 μg streptomycin per ml the proportion of survivors is of the order 10^{-7} to 10^{-8}. The colonies become visible in 2—3 days, their size is smaller than that of the controls, and faintly pigmented. Occasionally, however, some deep red and normal sized colonies appear on the 100 μg streptomycin plates. These colonies are fully resistant to 100 μg streptomycin and their full resistance is retained through a large number of transfers in streptomycin-free medium. In a few instances there were found variants resistant to 1000 μg streptomycin per ml, and there was no loss of resistance after many subcultures since two years. Their growth was normal and the pigment production intensive in the presence of streptomycin. The cells resistant to 100 μg streptomycin, and more pronouncedly those of the 1000 μg resistant variant, tend to grow more slowly than the normal sensitive cells when first subcultured in streptomycin-free liquid medium or on drug-free agar. Serial subculture in the absence of streptomycin, however, restores the growth rate approximately to normal.

Development of streptomycin resistance in S. marcescens by serial transfers

The classical method for isolation of resistant variants in the bacterial populations is the cultivation in liquid nutrient containing increasing amounts of the antibiotic, followed by subculture of surviving organisms obtained at the level of partial inhibition. The process is then repeated using higher drug concentrations.

10^2, 10^3 and 10^4 cells of the sensitive population of *S. marcescens* were inoculated in test cultures containing streptomycin in a graded series, and then transferred successively in tubes containing increasing amounts of streptomycin. A typical experiment with serial transfers is illustrated in Fig. 7. For comparison, the "training" of the *HY-strain* of *S. marcescens*, obtained from. MRS. M. BUNTING, is also given [5].

In the first series of cultures inoculated with the cells of the original population, visible growth was observed in the cultures with up to 6,5 and 12 μg streptomycin, depending on the size of inocula. In the first passage growth occurred uniformly up to 24 μg streptomycin, after 24 and 48 hours, respectively. In the successive second passage variable growth was observed in the cultures with 50 or 80 μg streptomycin per ml. In this experiment we obtained a further increase in resistance, *i. e.* to 100 μg, in the third passage only in the series inoculated with the largest inocula. In the first two passages the *HY-strain* behaved similarly.

The discrete stepwise sequence in the growth of survival cells in the presence of gradually increasing amounts of streptomycin is obvious. As the populations of the single cultures of the serial transfers have not been re-tested, we can only suppose that the surviving cells in the cultures with visible growth

were streptomycin resistant. Owing to the small size of the inocula used, it is unlikely that resistant variants of the original population were also involved. However, the population size of the cultures may attain the level of the mutational frequency during the 24 or 48 hours growth. Therefore, from these discrete steps leading to progressively higher grades of survival it is conceivable that the stepwise progress could be developed by successive single mutational

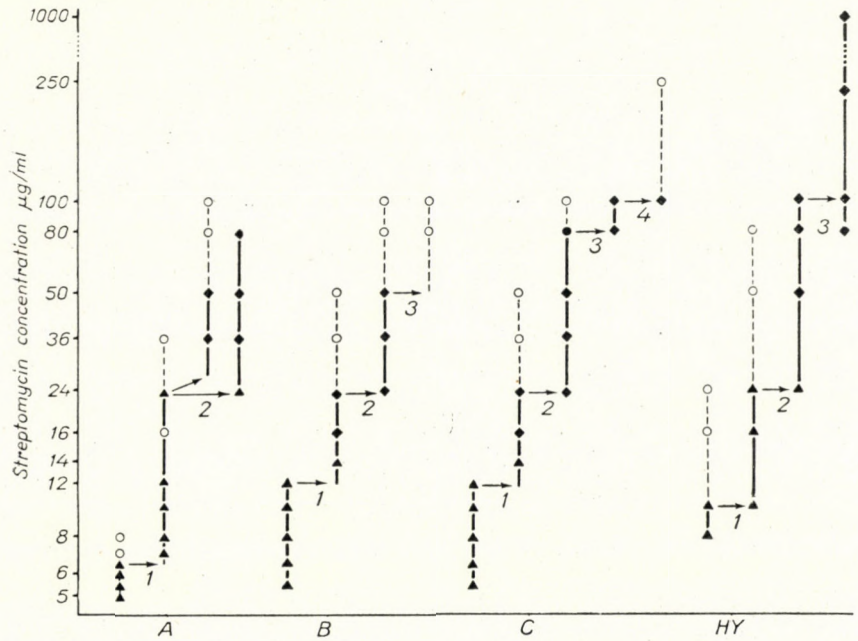


Fig. 7. Stepwise selection of clones resistant to streptomycin in serial subcultures of *S. marcescens*. The size of inoculum was 10^2 (A), 10^3 (B), and 10^4 (C), respectively. The number of transfers is indicated (1,2). *HY* is the strain of BUNTING. Growth was visible in the cultures after an incubation of 24 hours ▲, 48 hours ◆, or 72 hours ● ; no growth occurred in the cultures, ○

steps. The three experimental steps required for *S. marcescens* to develop resistance to 100 μg streptomycin per ml correspond approximately to the three supposed mutations necessary to produce the equivalent phenotype to survive 100 μg streptomycin.

A stepwise development of resistance is also apparent when surviving populations are re-tested on agar media. Experiments in which the colonies of cells surviving the increasing concentration of streptomycin are re-tested by the replica technique, or by plating, either directly or after subculture, can be considered as serial transfers in which the clonal populations are repeatedly exposed to streptomycin on agar medium.

In a typical experiment four parent master plates were made by spreading $4 \cdot 10^2$ cells taken from four cultures on nutrient agar. The replica plates con-

perhaps had originated from second step variants developed in the period of the first plating in the presence of streptomycin.

In an experiment with 8, 16, 24, 36 and 50 μg streptomycin per ml, plates on which only few colonies of different size appeared, a comparison was made between the degree of resistance of normal and of late-appearing small colonies

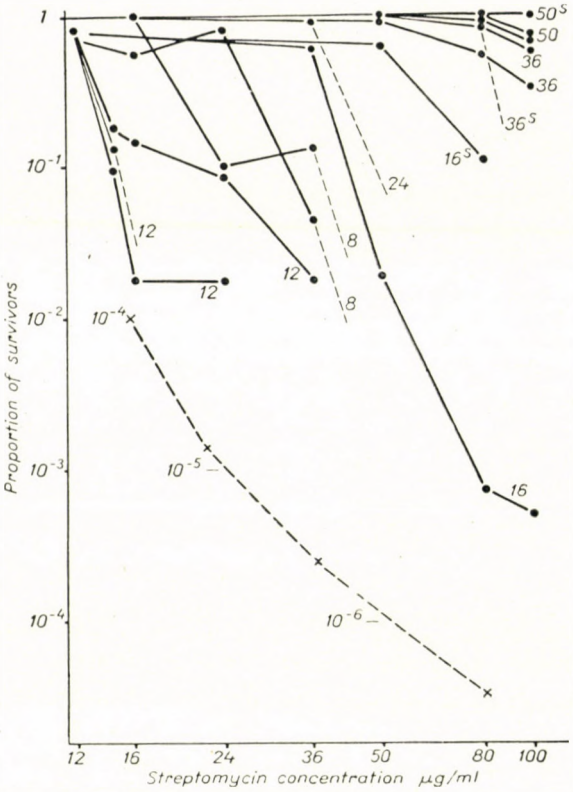


Fig. 6. Comparison of survival curves for clonal populations of normal and small (S) colonies of *S. marcescens*. Numbers on curves indicate the streptomycin concentration of the plates from which the colonies had been isolated. For comparison, the average survival curve of the original population is given (broken line)

selected at random. It was expected that, in accordance with the observations of others, small colonies are less resistant than those developing normally [39].

In this experiment the majority of the clones tested possessed an increased resistance as compared to the concentration prevailing in the plates from which they had been taken (Fig. 6). Some of the clones taken from plates with 36 μg per ml streptomycin proved to be resistant up to 100 μg per ml, and most of the 50 μg clones were fully resistant to 100 μg streptomycin per ml also in the second re-test. However. some of the clones tested were sensitive in re-test and

there was no correlation between the size of the parent colony and the degree of resistance of the colony-cells.

Summing up : the resistance of the cell population in the colonies isolated was variable and not necessarily adjusted to the concentration on which the growth had taken place. In most cases the colonies were not homogeneous, they did not entirely consisted of cells of uniform level of resistance. The proportion of the resistants was usually higher in the colonies isolated than in the parent culture, and sometimes equal to the total count, especially at lower concentrations, but occasionally even at higher concentrations. However, we could also isolate "normal overlaps", *i. e.* colonies giving cultures no more resistant than the parent population. These findings are in agreement with the observations of others [2, 13, 34].

Stability of streptomycin resistance of S. marcescens variants

From the preceding experiments it has been concluded that a survival curve represents only that proportion of the cells of the population tested which is tolerating the streptomycin concentration and that these viable cells are able to form colonies on agar in the presence of streptomycin. Nevertheless, this does not mean that all of these survivors are at the same time resistant to the streptomycin concentration prevailing in the plate. Many of these colonies proved in the re-test, depending from the streptomycin concentration at which the survivors had been selected, to possess a sensitivity equal to that of the original population or proved to be resistant to concentrations much lower than the parent colony.

It is therefore concluded, that the so-called "survivors" at a given concentration could have 1. either proper resistance, 2. only tolerance having a lower level of resistance or 3. the original sensitivity, *i. e.* they are the so-called "persisters" of BIGGER [cit. 33].

This heterogeneity of the colonies formed on the same plate was observed in the direct re-tests illustrated above. However, these differences in the degree of resistance between the single colonies become more obvious, when resistance is tested after many subcultures in the absence of streptomycin.

Subcultures of colonies taken at random from plates containing 8 μg streptomycin per ml proved that four colonies out of eight retained their resistance after four subcultures, the other four became once again as sensitive to streptomycin as the original population was. Some of the resistant clones subcultured for three months were unchanged and their resistance ranged up to 12 μg streptomycin per ml. Similarly, colonies taken from plates with 12, 50 and 80 μg streptomycin per ml remained resistant through 6—7 subcultures without streptomycin and the degree of resistance was not affected by the transfers.

resistant class, forming colonies in the presence of 100 μg streptomycin per ml (B_1). In a successive second passage these colonies selected at 100 μg proved to survive also 500 μg streptomycin per ml (B_3).

Variants resistant to streptomycin concentrations higher than 100 μg per ml developed in successive serial platings only in some instances. In one experiment performed with serial replica plates, one clone on the plates with 16 μg

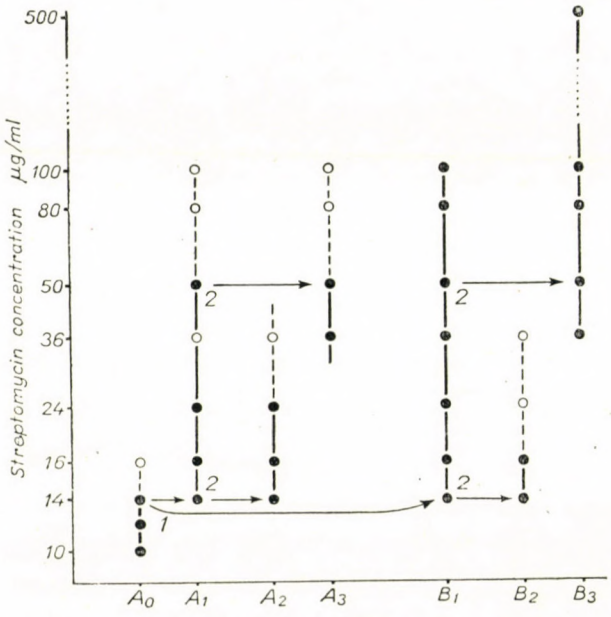


Fig. 9. Stepwise selection of clones of *S. marcescens* resistant to streptomycin by serial transfer on agar medium. (For explanation see text)

or without streptomycin developed poorly, but it grew heavily on the plates containing 250, 500 and 1000 μg streptomycin per ml. Colonies formed at the highest concentration survived in the following transfer up to 500 μg streptomycin per ml, and in the next transfer 1000 μg streptomycin. In another experiment the proportion of survivors on the plate with 50 μg streptomycin per ml was $3 \cdot 10^{-6}$. In the second serial replica transfer two colonies out of 50 taken from the 50 μg plates formed deeply pigmented colonies in the presence of 500 μg streptomycin per ml, and they proved in the re-test resistant to 1000 μg.

These instances support the idea of the stepwise development of resistance. In the presence of lower concentrations of streptomycin the possibility of survival and of colony-formation by physiological adaptation is very likely. In the experiments described above, a distinction between the "persisters" *i. e.* sensitives to streptomycin on the one hand, and the stabile variants with a low

degree of resistance on the other hand was achieved on the basis of re-test of subcultures. In the presence of higher streptomycin concentrations, where the proportion of survivors decreases sharply, the possibility of a primary selection of the first step resistant variants is given, and it is very plausible that the resistance developed by a mutational step and not by direct adaptation. The number of experimental steps required to attain stepwise higher levels of resistance corresponds approximately to the number of mutations assumed necessary to produce the equivalent phenotype.

Streptomycin resistance and the production of prodigiosin in S. marcescens

The production of prodigiosin is strongly influenced by the cultural conditions [5, 31]. The pigment production of the strains of *S. marcescens* used in these experiments was in the nutrient medium in general very excellent. In the presence of streptomycin the formation of prodigiosin decreased proportionally with the increase of the drug concentration. Sometimes the colonies were pink already on agar medium containing 12 μg streptomycin per ml, and pigmentless ("white") at 16—24 μg.

A correlation was observed also between the intensity of pigment production and the sensitivity to streptomycin.

In an experiment the stability of clones taken from plates with 8 μg streptomycin per ml was re-tested after transfers in drug-free subcultures by plating 10^3 cells. Five subcultures formed the same number of dark red pigmented colonies after 24 hours incubation on streptomycin plates and on drug-free control. However, visible colonies appeared on streptomycin plates of three other clones only after 48 hours incubation, they were pink-pigmented, and had a survival proportion of $6—7 \cdot 10^{-1}$.

In an other typical experiment eight red and eight pink colonies were picked from 8 μg streptomycin and from control plates, and their populations grown in liquid cultures were re-tested. All the clones of the red pigmented colonies but one formed an equal number of normal colonies on control and streptomycin plates with 8 μg per ml after 24 hours. However, on plates spread with cells of the pink-pigmented clones no visible colonies were found in 24 hours, and on the third day after plating colony counts were 20 to 30 per cent less than on drug-free plates, and the colonies were faintly pink. In a successive re-test by direct plating of the suspension of the colonies, only 30 to 45 per cent of the cells survived on plates with 8 μg streptomycin per ml and their colonies formed were "white". Similarly, when a comparison was made between the normal, red-pigmented colonies and the smaller sized "white" colonies developed on 50 μg streptomycin plates in re-test by replica plating a higher sensitivity of the pigmentless colonies was observed.

taining streptomycin from 4 to 100 μg per ml were performed with the velveteen pad. The colonies developed on the 16 μg streptomycin plates were smaller and less pigmented than those on the plain nutrient agar and gradually smaller colonies appeared on the plates containing increasing streptomycin concentrations. The pigment deficient "microcolonies" formed in the presence of 50—100 μg streptomycin per ml amounted to a small percentage of the population

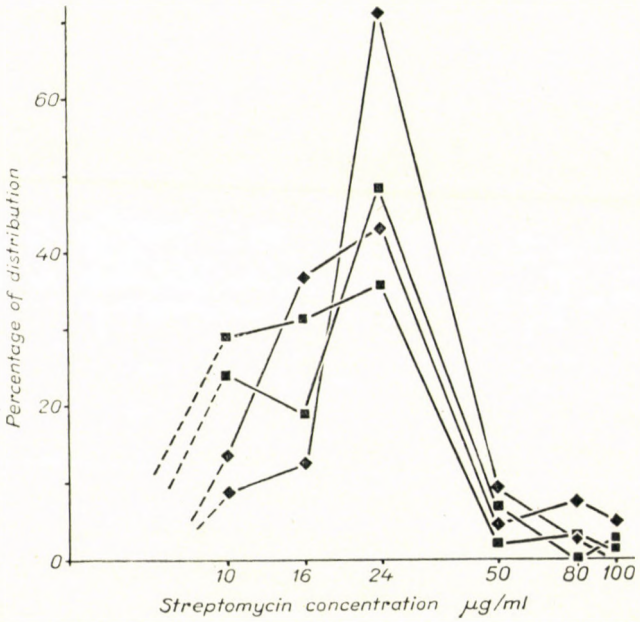


Fig. 8. Percentage distribution of the variably graded resistants in colonies of *S. marcescens* formed in the presence of 16 μg streptomycin per ml

distributed (Fig. 8), and it is very plausible to consider them not as extreme variants of populations distributed normally, but as the result of selection of the second step variants.

In further experiments, when colonies selected on streptomycin plates were subsequently plated in the presence of increasing concentrations of streptomycin, isolation of successively more resistant variants was possible in these "second passages". The results of such an experiment are presented in Table IV. The cell population of the colonies selected at 50, 80 and 100 μg streptomycin per ml in the first series of plating proved in the subsequent re-test heterogeneous as to their degree of resistance. The colonies formed at 50 and 80 μg streptomycin consisted in majority of cells surviving 16 and 24 μg streptomycin, respectively, while a small fraction proved resistant to 50 and 80—100 μg streptomycin. It is supposed, therefore, that the first plating selected only the first step variants and the second plating permitted the accumulation of a few second step variants

with a higher degree of resistance. There is a sharp limit between the ranges of resistance of the first step and second step variants and there is also proportional shift to the higher resistance when the colonies picked from 50 and 80 μg streptomycin plates are compared with each other. On basis of these observation a stepwise increase in degree of resistance can be brought about by successive selection. The second step variants arose by mutations already in the first

Table IV

Resistance of colonies from streptomycin plates

Primary plating			Resistance on re-test			Resistance after 7 subcultures		
no. of cells plated	conc. μg/ml	fraction surviving	no. of cells plated	conc. μg/ml	fraction surviving	no. of cells plated	conc. μg/ml	fraction surviving
10^7	50	$7{,}5 \cdot 10^{-6}$	$1{,}5 \cdot 10^2$	50	$3{,}5 \cdot 10^{-1}$	$4{,}2 \cdot 10^2$	50	$9{,}5 \cdot 10^{-1}$
							80	$9{,}0 \cdot 10^{-1}$
			$1{,}2 \cdot 10^3$	50	$2{,}0 \cdot 10^{-2}$	$3{,}0 \cdot 10^2$	50	$1{,}0 \cdot 10^0$
							80	$9{,}3 \cdot 10^{-1}$
10^8	80	$5{,}0 \cdot 10^{-7}$	$1{,}0 \cdot 10^3$	50	$5{,}0 \cdot 10^{-2}$	$3{,}5 \cdot 10^2$	80	$9{,}0 \cdot 10^{-1}$
			$1{,}0 \cdot 10^3$	100	$5{,}0 \cdot 10^{-2}$	$5{,}3 \cdot 10^2$	100	$9{,}0 \cdot 10^{-1}$
			$1{,}4 \cdot 10^3$	50	$1{,}5 \cdot 10^{-2}$	$4{,}7 \cdot 10^2$	80	$8{,}0 \cdot 10^{-1}$
			$6{,}0 \cdot 10^2$	80	$5{,}9 \cdot 10^{-2}$	$4{,}8 \cdot 10^2$	100	$1{,}0 \cdot 10^0$
			$6{,}0 \cdot 10^2$	100	$9{,}0 \cdot 10^{-1}$	$3{,}0 \cdot 10^2$	100	$1{,}0 \cdot 10^0$
10^8	100	$3{,}3 \cdot 10^{-7}$	$6{,}0 \cdot 10^2$	100	$9{,}0 \cdot 10^{-1}$	$4{,}0 \cdot 10^2$	100	$1{,}0 \cdot 10^0$
			$1{,}0 \cdot 10^2$	100	$1{,}0 \cdot 10^0$	$3{,}2 \cdot 10^2$	100	$1{,}0 \cdot 10^0$

plating series. However, for their isolation the second plating step was necessary. As it is seen from Table IV, the colonies taken from 100 μg streptomycin plates consisted of fully resistant cells. This can be explained by the assumption that a high degree of resistance was developed also in a single mutational step. The development of a high degree of streptomycin resistance by a single mutational step was observed in *E. coli* by GIBSON and GIBSON [19].

In another experiment successive transfers were made on agar plates (Fig. 9). When single colonies were taken from plates containing 14 μg streptomycin per ml on which colony formation still occurred (A_0) and spread directly again, a fraction formed colonies at 50 μg streptomycin per ml (A_1). When again exposed to increasing concentrations of streptomycin the single colonies taken at random from the 50 μg streptomycin, plates contained no survivors producing colonies at higher concentrations in this second passage (A_2, A_3). However, when a mixture of the colonies formed on the plates with 14 μg streptomycin per ml was transferred, a small fraction of the survivors represented a more

Discussion

Some of the controversies in the problem of streptomycin resistance seem to be due to the fact we employ the term "resistance" in the discussion of bacterial populations, although in many a case the use of the term "sensitivity" would be more adequate. In a test we can determine the number of survivors only in the presence of streptomycin, and thus survival expresses the sensitivity of the bacterial population to the antibiotic, which is not necessarily equal with its "resistance".

The chance of a bacterium to survive a given concentration of streptomycin may be controlled either physiologically, *i. e.* by a favourable microenvironment or by temporary changes at the cell level, and in this case there is a possibility that sensitive cells also survive ("persisters" [33]) ; or the survival may be controlled genetically by a heritable resistance. The persisters possess an adaptive advantage to "resist" the action of the drug especially at lower concentrations, but this "resistance" is transitory and not retained after subculture. In the proportion of survivors the persisters and proper resistants are considered together, and therefore the survival curve obtained cannot illustrate the distribution of the resistant cells in the population tested.

In the course of our studies with *Serratia marcescens* we found that the individual cells composing a colony were very often not alike in their degree of resistance. In other words, the finding that a cell has survived exposure to certain concentration is no guarantee that single cells picked from its progeny will give a population of the same resistance. The biochemical, *i. e.* physiological heterogeneity of a population of cells within a colony starting from a single cell has been recently emphasized by SEVAG [26]. A similar heterogeneity of the colonies of *S. marcescens* developed on streptomycin plates was obvious in the re-test. Not even an immediate and direct re-test of the population of a colony could give an unequivocal picture of the proportion of the sensitive, and resistant cells. The distribution of the resistant cells might have been overlapped in the re-test by sensitive cells which again possess a transitory "resistance" owing to their biological ages and physiological and metabolic state according the site within the colony where they had originated from.

However, a "genetical" heterogeneity apart from the "phenotypic" one was also revealed in our experiments. Some of the colonies contained a mixture of persisters and real resistant variants. This means that a fraction of the colony might consist of clonal descendents of mutants. Subcultures (populations) derived from these were completely resistant on re-test.

All these facts complicate evaluation of the survival curves or survival proportions even when re-tests are performed, and the validity of conclusion drawn from the determination of the number of "resistants" in a given population on basis of colony counts may be questionable.

The theory of physiological adaptation assumes that an alteration in metabolism initiated by the medium containing the drug causes the adjustment and the resistance of the cells to the antibiotic. According to this theory, not all of the cells must be adapted, and deadaptation is often rapid in subcultures; a stabilization of resistance occurs only after complete training [8]. One must, however, take into consideration that in some instances of streptomycin resistance a qualitative adjustment of the cells to the concentration to which they had been exposed, was observed [2, 12], but not in others [34, present authors].

It has been emphasized that the extreme contrasts between the theories of adaptation versus mutation are only apparent since it is very probable that frequently both mechanisms simultaneously play a part in the development of resistance [2, 8, 29, 34]. The instance of adaptive origin of resistance to low streptomycin concentration reported by GIBSON and GIBSON [15], as well as the other examples are not satisfactory convincing to accept physiological adaptation for the control of the development of resistance, and evidence that a high degree of resistance to streptomycin can be reached by adaptation is lacking [6, 13, 24]. Physiological adaptation certainly has an important role in the complex phenomena leading to resistance. Direct modification of survivors takes place in the presence of streptomycin and this physiological adaptation provides favourable conditions, because the colonies have an increased opportunity for mutational alterations by attaining an appropriate size of population which already has a chance to undergo mutation resulting in genetical resistance. Physiological adaptation favours also the phenotypic manifestation of the genetically controlled resistance of the resistant mutants in the case of a phenomic delay.

On the whole our observations seem to support the mutational origin of streptomycin resistance in *S. marcescens* suggesting, however, a complementary role of physiological adaptation. The surviving colonies were variable in resistance. The rapid loss of resistance in some of them indicates that they possessed only an induced apadtive phenotypic modification. A fraction of the population of some colonies, however, retained the resistance after subcultures, suggesting the possibility that these cells owe their stable resistance to mutation.

The stepwise development of streptomycin is supported by numerous data [3, 6, 9, 23, 28, 29, 34]. It is difficult to establish the exact correlation between number of experimental steps and graded degree of resistance of the variants since the range of phenotypic variability within the population of a single genetically controlled variant as well as the occurrence of persisters, always tends to obscure the discontinuity thus simulating a continuous spectrum [3, 12]. Some of the objections raised against the discontinuity of resistance explicable by mutational steps were based on the apparent continuous scale of resistance of the bacterial population. However, the statement that the explanation of a continuous resistance scale would require many types of mutants

closely corresponding to each concentration [1, 2, 8, 12, 16] cannot be taken as one strengthening the adaptation theory.

It has to be taken into account that the distribution of the survivors in the presence of increasing concentrations of streptomycin simulates only a selection of a continuous variation scale with a normal probability distribution. When single colonies of the survivors of *S. marcescens* were picked from the plates and re-tested, it was possible to obtain from the original exposure to streptomycin first step variants that provided different grades of resistance not necessarily with sharp dividing lines. The ranges of the phenotypic manifestation of the different variants with graded resistance may overlap each other and are not necessarily adjusted or sharply limited to the given streptomycin concentration. The degree of resistance of the variants isolated, and especially the serial transfers performed in our experiments, seem to indicate a stepwise development of streptomycin resistance in *S. marcescens*. A higher level of resistance could be attained by a series of steps, although a high degree of resistance may be developed occasionally in few (or in one single?) step. It is very plausible that in an average culture of *S. marcescens* the resistants are first step mutants.

The possibility of the streptomycin induced mutation to resistance has also been considered [19, 20, 24]. Recently, some experimental results have been published which strongly support the possibility of a proper acquired and heritable resistance [3, 29]. Our experiments in progress, however, do not seem to substantiate the direct induction of resistance in *S. marcescens* by streptomycin.

Many of the controversies in the problem of drug resistance originated from certain oversimplifications of the genetic theory and from incorrect interpretations (and applications) of genetic terms. Some confusion could perhaps be avoided in the future, if the term "resistance" will be used in a somewhat limited sense when genetic aspects are involved in the experiments. As long as the phenomena of "tolerance" and "resistance" are regarded as equal [26] or resistance is taken to be concerned with "the temporary or permanent" capacity of a cell [3], further controversies will hardly be avoided. It would perhaps be appropriate to use the terms resistance, tolerance and persistence in genetic implications with sharp distinction. Resistance should be used to indicate a conditional property of an organism originating from a genotypic alteration which is stable and retained through a large number of transfers [3, 7]. The phenotypic manifestation of the resistance, however, may have a variable range of expression. Persistence should be used for the phenotypical modification of genetically sensitive cells, which are able to "persist" the action of a drug. Finally the term tolerance should be appropriate, as a "neutral" term, in those instances where the genotypical or phenotypical character of the survival to antibiotics is not yet known. We are convinced that a common and properly defined terminology would be of great value in the understanding and for

"take 'leave of absence' from one's devotion to an orthodox belief or point of view" [26, see also 3] in the future discussions.

Summary

A study was made on the development of resistance to streptomycin in *Serratia marcescens*. The sensitivity to streptomycin was characterized by the threshold concentration determined under standardized conditions. No resistant variants were obtained from populations exposed to streptomycin for a limited time, 1—6 hours, in liquid cultures. In many cases a heterogeneity was found in the cell population of the colonies grown on agar medium containing lower concentrations of streptomycin, the colonies did not entirely consist of cells with uniform resistance. The level of resistance of the single colonies formed on the same plate was also variable, they were not necessarily adjusted to the concentration on which the growth of the colony had taken place. Many of the colonies, depending on the lower concentration of streptomycin at which the survivors had been selected were either normal "overlaps", *i. e.* they possessed a sensitivity equal to that of the original population, or resistant to concentrations much lower than the parental population. Variants isolated from colonies of plates with higher streptomycin concentrations proved to be more resistant, and grew at concentrations at least as high as those of the plates from which they had been isolated. The colonies selected at 100 μg streptomycin per ml were homogeneous and fully resistant to this concentration. A correlation was also observed between the intensity of pigment production, and the sensitivity to streptomycin. The degree of resistance of the variants isolated was retained through a large number of subcultures without streptomycin. Stable variants with a low degree of resistance were also achieved.

An indication of discrete steps leading to progressively higher grades of resistance was obtained by serial transfers in which the clonal population was repeatedly exposed to streptomycin in liquid cultures or on agar medium. The findings suggest that the range of the resistance levels in the single steps is not uniform and the same level of high resistance can be attained in one instance by more, in another by fewer, steps.

Acknowledgements : The courtesy of Prof. Z. ALFÖLDY (Institute of Microbiology Medical School, Budapest) in supplying the strain of *Serratia marcescens* is gratefully acknowledged. We wish to thank K. SZENDE (Institute of Genetics, Budapest) for useful comments on the manuscript. Finally, thanks are due to Miss M. JÓNA for skillful technical assistance throughout this work.

LITERATURE

1. ABRAHAM, E. P.: Symp. Soc. Gen. Microbiol. **3**, 201 (1953).
2. BARER, G. R.: J. Gen. Microbiol. **5**, 1 (1951).
3. BRYSON, V., SZYBALSKI, W.: Advances in Genet. **7**, 1 (1955).
4. BUNTING, M. I.: Cold Spring Harbor Symp. **11**, 25 (1947).
5. BUNTING, M. I., LABRUM, E. L., HEMMERLY, J.: Amer. Naturalist **85**, 331 (1951).
6. CAVALLI-SFORZA, L. L., LEDERBERG, J.: Symp. on Growth Inhibition and Chemotherapy, Rome, p. 108 (1953).
7. CAVALLI-SFORZA, L. L. LEDERBERG, J.: Genetics **41**, 367 (1956).
8. DEAN, A. C. R.: Sevag, Reid and Reynolds [27] pp. 42—60. (1955).
9. DEMEREC, M.: J. Bacteriol. **56**, 63 (1948).
10. DEMEREC, M.: Genetics **36**, 585 (1951).
11. EAGLE, H.: Ann. Acad. Sci. **59**, 243 (1954).
12. EAGLE, H., FLEISCHMAN, R., LEVY, M.: J. Bacteriol. **63**, 623 (1952).
13. EAGLE, H., SAZ, V.: Ann. Rev. Microbiol. **9**, 173 (1955).
14. GALE, E. F., DAVIES, R.: Symp. Soc. Gen. Microbiol. (London) 1953. Cambridge Univ. Press, pp. 339.
15. GIBSON, M. I., GIBSON, F.: Nature **168**, 113 (1951).
16. HINSHELWOOD, C. N.: Ann. Acad. Sci. Fenn. Ser. A. **II.** 55 (1955).
17. KAPLAN, R.: Z. Naturforschg. **2b**, 308 (1947).
18. KLEIN, M.: J. Bact. **53**, 463 (1947).
19. LAM, G. T., SEVAG, M. G.: J. Bacteriol. **69**, 184 (1955).
20. LINZ, R.: C. R. Soc. Biol. Paris **142**, 1066 (1948).

21. MATHEWS, M.: J. Hered. **47**, 85 (1956).
22. MAYR-HARTING, A.: J. Gen. Microbiol. **13**, 9 (1955).
23. MITCHISON, D. A.: Symp. Soc. Gen. Microbiol. (London), **3**, 253 (1953).
24. NEWCOMBE, H. B.: Sevag, Reid, and Reynolds [27] pp. 4—19.
25. NEWCOMBE, H. B., NYHOLM, M. H.: Genetics **35**, 603 (1950).
26. SEVAG, M. G.: Sevag, Reid, and Reynolds [27] pp. 370—408.
27. SEVAG, M. G., REID, R. D., REYNOLDS, O. E.: Origin of resistance to toxic agents. Symposium, Washington, 1954, Academic Press, New York, p. 471. Edit. 1955.
28. SEVAG, M. G., ROSANOFF, E. I.: J. Bacteriol. **63**, 242 (1952).
29. SZYBALSKI, W., BRYSON, V.: Sevag, Reid, and Reynolds (1955) pp. 20—41.
30. TAKÁTSY, GY.: Acta Microbiol. Hung. **3**, 191 (1955).
31. WEINBERGER, E. D.: J. Bacteriol. **62**, 785 (1951).
32. WELSCH, M.: Bull. World Health Organ. **6**, 173 (1952).
33. WELSCH, M.: C. R. Soc. Biol. **148**, 1280 (1954).
34. WELSCH, M.: Antibiotica et Chemotherapia, Progr. **2**, 34 (1955).
35. YEGIAN, D., VANDERLINE, R. J.: Amer. Rev. Tbc. **61**, 483 (1950).

SEROLOGICAL TYPES OF BACILLUS MEGATERIUM AND THEIR SENSITIVITY TO PHAGES

By

G. Ivánovics, L. Alföldi and Á. Széll

Institute of Microbiology, Medical University, Szeged

(Received September 25, 1956)

Although devoid of pathogenic properties, *Bacillus megaterium* nevertheless stands in the centre of microbiological research in more than one respect. Because of its considerable size it has been for decades a much favoured object in cytological studies. To its finer morphological structure particular attention has been devoted in recent years by Robinov (1953, 1956) and DeLamater (1951, 1956). Even in its bearings on genetics it has become a microorganism of interest to several authors (Szybalski, 1954 ; Bergersen, 1954 ; DeLamater and Hunter 1953), and it certainly occupies a distinguished place in the study of lysogeny. The material of den Dooren de Jong (1931), his lysogenic and phage-sensitive strains, as standard strains, are encountered today in most of the laboratories engaged in phage research. The study of these strains first by Gratia (1936), Wahl (1946), and others, and later by Lwoff et al. (1950), Clarke and Cowles (1952), and Welshimer (1951) led to observations of fundamental significance concerning the nature of lysogeny. A number of properties of the phages of *Bacillus megaterium*, such as their reversible inactivation, their behaviour towards enzymes, etc., are known in the first line from quite recent studies made by Northrop (1955), and by Northrop and Murphy (1956). Very notable are also the reports published lately by Murphy (1952, 1953, 1954) on the genetic aspects of the phages of *Bacillus megaterium*.

In characterising a few megaterium phages, Friedman and Cowles (1953) and Friedman (1954) have in recent years described the so-called M-phage system, but have failed in furnishing details concerning the host range of these temperate phages. Our knowledge about the host range of *Bacillus megaterium* is still very limited. Smith et al. (1952) tested 14 *Bacillus megaterium* strains for their sensitivity to 3 different phages. They found that differences were possible between the individual phage strains. One of their phages acted upon upon all the *Bacillus megaterium* strains, independently of whether their colonies were "smooth" or "rough" in appearance. The host range of two others of their strains was found to be slightly narrower. The said authors omitted to give a detailed description of their phages and failed to consider the quantitative conditions when they determined the sensitivity of their bacillus strains.

There are also considerable gaps in our knowledge of the cultural properties of *Bacillus megaterium*. Numerous publications describe the variability of the colonies of this bacillus, but they only give a very poor characterization of its variation. As has recently been established by one of us (IVÁNOVICS, 1955), the variability of *Bacillus megaterium* colonies usually appears to be of a phenotypic character. Our knowledge of its mutants of stable characteristics is of quite recent date (IVÁNOVICS, 1955, and further reports under publication). Studies extending to the antigenic structure of this microorganism are very few in number. So far there is only one work to point out the diversity in surface antigens of this organism (IVÁNOVICS, 1955). Previously, it was reported by TOMCSIK (1951) that some part of the capsule, respectively the cell wall, of *Bacillus megaterium* becomes visible in the presence of homologous antibody under the phase contrast microscope. In this organism the capsule consists of D-glutamic acid-polypeptide, the group-specific hapten of aerobic spore bearing bacilli (IVÁNOVICS, 1937; TOMCSIK and GUEX-HOLZER, 1951; IVÁNOVICS, 1953). On the evidence of a study of one of its strains, TOMCSIK and GUEX-HOLZER (1954) established the presence in *Bacillus megaterium* of heat-resistant and heat-sensitive antigenic substances the latter of which are of a protein nature. With the homologous serum of one of the strains of this microorganism, PESTI (1954) subjected to precipitation tests extracts obtained with diluted hydrochloric acid from five different strains. The extracts of all five strains gave equally good reactions with the immune serum.

The present paper embodies the results of our investigations which were carried out to establish if, and to what extent, the properties of the *Bacillus megaterium* strains originating from DEN DOOREN DE JONG'S experiments and maintained in laboratories, agree with the properties of the "wild" strains isolated and closely studied by us. A further aim of the present work was to investigate into the variability of the antigenic structure of *Bacillus megaterium* strains and their sensitivity to a number of adequately defined phage strains.

Methods

Isolation, identification, and maintenance of the bacterial strains. Suspensions of faeces and soil samples, heated to 80° C for 5 minutes, were plated on synthetic agar (nutrient medium *A*; GARIBALDI et al., 1953). Repeated subculturing was applied to purify the strain. Apart from morphological characteristics, identification was based upon behaviour on synthetic medium (KNIGHT and PROOM, 1950), sensitivity to lysozyme, and investigation of indole and acetylmethyl carbinol production. Twelve strains had been isolated as early as the first half of 1952; up to the middle of 1953 they were being maintained in broth agar. Thereafter the spores of these strains were kept in the frozen state, and furnished the material required for our experiments.

A similar procedure was adopted in maintaining the strains obtained from various laboratories. Asporogenous strains were transferred weekly on YC agar.

Microscopic observation. In addition to GRAM's staining, cell-wall staining as recommended by GUTSTEIN (1926) was invariably performed. Cultures obtained in broth at 35° C for a few hours, were used for studying chain formation and motility. Several motility tests were made while the work was in progress.

Cultivation in liquid nutrient media. Aeration was applied in every case. The bacteria were inoculated into 20 ml of nutrient solution, in Erlenmeyer flasks of 100 ml capacity and incubated at 35° C with gentle shaking (oscillations per minute, 96 ; amplitude, 2 cm).

Density of bacterial suspensions. In measuring this, an ORIFOT-type photoelectric cell photometer was used. The extinction value found in a tube 16 mm in diameter was understood to be the optical density.

Antibacterial sera. Suspensions of bacteria grown in horse meat broth killed with formalin and washed by centrifugation were injected intravenously into rabbits. Bleedings made after 10 or 12 injections guided us in respect of how to proceed further. The suspensions of some strains proved to be too toxic, therefore no sera of a sufficiently high titre could be obtained against them. Even repeated injections of some individual strains, for instance of KM and 337a, failed to yield appropriate agglutinating sera, but they proved useful in immobilisation tests to demonstrate the presence of flagellar antigen. Because of the difficulties encountered in the course of immunisation, the sera of only a limited number of strains were prepared.

The antibody to D-glutamic acid-polypeptide was produced in rabbits injected with suspensions of heat-killed encapsulated *Bacillus anthracis.*

Agglutination. To 0,5 ml amounts of serial dilutions of the sera, equal volumes of suspensions of 0,3 optical density were added, and the racks holding the test tubes were vigorously shaken 4 or 5 times for 1 to 2 minutes at intervals of 2 to 3 minutes. The test tubes were then allowed to stand at room temperature for 4 to 5 hours before readings were made.

Immobilisation reactions. From a broth culture of the strain a droplet was placed on a slide and a drop of immune serum diluted 1 to 50 was added to it. About a minute later the result was read under the microscope.

Cell-wall and capsular swelling reaction. As a rule, suspensions of 0,4 to 0,7 optical density were prepared from colonies of 14 to 16-hour cultures obtained in YC agar medium. A droplet of the suspension was placed on a slide, a loopful of immune serum was admixed, and sealed with a glass cover. Inspection was under a phase contrast immersion lens.

Phage material. In the case of the lysogenic strains 56 and 899 [1], phage material was obtained from a single plaque. With these strains, and also with strains M_1, M_2, and M_5, the indicator strain designated "Sensitive" was used. In obtaining phage suspensions and in titrating them, YP nutrient medium was invariably employed.

The Mi, Mii, and Miii, strains were isolated from garden soil samples, using strain 216 of *Bacillus megaterium.* In growing and titrating these phage strains, strain 216 was employed.

Phage material passed through a Seitz filter was used in the experiments. The preparations contained from 10^8 to 10^{10} particles per ml.

Titration of the phage effect. The particles were usually counted in plexiglass dishes following HORVÁTH and ALFÖLDI's (1954) semi-micromethod. Amounts of 2 ml of YP medium containing 1 per cent agar were measured into the grooves of the plexiglass plates and, after solidifying, were overlayered with 2 ml of a mixture of phage dilution and indicator bacillus. This mixture was prepared by measuring into test tubes 0,8 ml quantities of the varying dilutions of phage material and adding to them 0,2 ml of bacterial suspension of 0,4 optical density.

When counting the phage particles in Petri dishes, GRATIA's (1936) method was essentially followed. In Petri dishes 10 cm in diameter YP agar plates were prepared and these were overlayered with 2 ml amounts of phage and bacterium suspensions in soft agar.

Determination of the strains' sensitivity to phages. To 1 ml of bacterial suspension (of 0,1 optical density) 1 ml of YP agar was added and the mixture was poured on the surface of a YP agar plate.

From the stock lysates, resp. their 10^{-1} to 10^{-7} dilutions, a drop each (0,02 ml) was placed with the aid of a platinum loop on the surface of the inoculated plates and incubated at 37° C for 20 hours, whereafter the readings were made.

Antigenic structure of the phage strains. From the phage material 5 ml each were injected intraperitoneally into rabbits twice a week. After 7 to 12 injections the animals were bled to death, and their sera heated to 56° C for 30 minutes. To the phage preparations the immune serum was added in dilutions from 1 : 500 to 1 : 1000. The mixture was kept in the water bath at 37° C, and the number of plaque formers were counted at 5-minute intervals.

Sensitivity to citrate. The diluting liquid as well as the agar nutrient medium contained 0,1 per cent sodium citrate.

Heat inactivation. To 9,5 ml amounts of nutrient medium, heated to 60° or 65° C, 0,5 ml amounts of the phage preparations were added. Samples taken from time to time from the heated substance were immediately diluted with ice-cold medium, and the number of infective phage particles was determined.

Latency period. Cultivation was carried out under shaking, in Erlenmeyer flasks placed in a water bath at 35° C. Shaking was made with 95 oscillations per minute, amplitude

3 cm. The nutrient medium in the flasks was inoculated with the indicator bacterium and was allowed to grow until the optical density of the culture was 0,15. Thereafter as many phages were added to the suspension as were required to have one particle for each individual bacterial cell. From the mixture a 10^{-2} dilution was prepared with the aid of the nutrient medium and, under shaking, was made to continue growing. The changes in the number of plaque formers were followed up in samples taken at intervals of 5 minutes.

Lysogenization. From the phage preparation 0,1 ml amounts were dried onto the surface of YP agar plates, and these were inoculated with dilute bacterial suspension. The developing colonies were washed with a moderate amount of saline, and a few drops of the dense bacterial suspension were plated on the surface of the agar medium recommended by TARR (1932). Two days later the intensely sporulating culture was washed, and 1 ml amounts of the suspension were measured into test tubes which were then placed for 5 minutes into a water bath at 90° C. From 10 to 20 of the colonies obtained from the spore suspension were checked in the usual manner for their lysogenic character.

Preparation and titration of megacin. The *Bacillus megaterium* strain 216 was utilised to obtain megacin. After the complete dissolution of its culture irradiated with UV light, the substance was filtered through an asbestos pad (IVÁNOVICS and ALFÖLDI, 1955). Sensitivity to megacin was determined in exactly the same manner as sensitivity to phages.

Nutrient media. By broth is meant horse-meat extract containing 1 per cent peptone. The yeast extract peptone (YP), yeast extract casein hydrolysate (YC), and yeast extract with enzymatically digested casein (YDC) nutrient media have been described elsewhere (IVÁNOVICS and ALFÖLDI, 1955). In preparing TARR's agar, 0,1 per cent enzymatically hydrolysed casein was used. The solid media contained 1,5 per cent agar-agar.

Experimental

The Bacillus megaterium strains studied, and their essential properties

Subjected to detailed studies were the 24 *Bacillus megaterium* strains listed in Table I. Of them 14 were isolated by us and kept under observation for a number of years. From some of these "wild" strains it proved possible to dissociate a mutant, which may be regarded as the *R* variant of *Bacillus megaterium* (IVÁNOVICS, 1955). Of the strains isolated by us one was lysogenic, and two (216 and 119) were megacinogenic inducible with UV light. Concerning the morphology of the "wild" strains, the following points merit mentioning. In respect of their shape, size, and staining properties, the cells corresponded well to those described by SMITH et al. (1952). Tests made in February, 1954, and thereafter, showed four of the strains to be non-motile. Prior to that date systematic tests for motility had not been undertaken. Two strains (208 and 209) were originally motile. Later, they have lost this property. It should be noted that in a liquid medium the non-motile strains usually developed extremely long threads.

The strain denoted 938 likewise consisted of chain-forming non-motile rods.

In broth agar containing 10 per cent saccharose, strain 938 and the 14 strains of our own isolation gave rise to extremely soft mucoid colonies necrotising in the centre. These colonies measured at least 5 to 6 mm in diameter. Slightly different from the cultural properties of these "wild" strains were those of the strains originating from DEN DOOREN DE JONG'S (1931) experiments and maintained now for over a quarter of a century under laboratory conditions. Subtle differences also manifested themselves in dependence on the laboratory the strain had come from. This particularly refers to the lysogenic strain 899(1).

Table I

List of Bacillus megaterium strains used, and their source of origin

Designation applied	Source of origin	Obtained wherefrom and when	Lysogenic quality	Motility	Notes*
207	rabbit faeces	Isolated by us in February, 1952	absent	vigorous	
208	rabbit faeces	Isolated by us in February, 1952	absent	none	Motility was observable immediately after isolation
209	cow faeces	Isolated by us in February, 1952	absent	none	Motility was observable immediately after isolation
119	guinea pig faeces	Isolated by us in February, 1952	absent	vigourous	Megacinogenic
213	hen faeces	Isolated by us in February, 1952	absent	slight	
216	mouce faeces	Isolated by us in February, 1952	absent	slight	Megacinogenic
296	soil sample	Isolated by us in June, 1952	absent	none	
297	soil sample	Isolated by us in June, 1952	absent	vigorous	
298	soil sample	Isolated by us in June, 1952	absent	none	
299	soil sample	Isolated by us in June, 1952	absent	vigorous	
300	soil sample	Isolated by us in June, 1952	absent	moderate	
301	soil sample	Isolated by us in June, 1952	absent	moderate	
56	air	Isolated by us in April, 1954	present	vigorous	
60	air	Isolated by us in April, 1954	absent	slight	
938	unknown	Bureau of Agr. and Chem. Peoria, NRL-B-938. In June, 1953	absent	none	
P-899	soil samples Isolated by DEN DOOREN DE JONG	Inst. Pasteur, Paris,	present	vigorous	Asporogenous
W—899	soil samples Isolated by DEN DOOREN DE JONG	Prof. Welshimer, Richmond March, 1954	present	vigorous	
W 899 II d	soil samples Isolated by DEN DOOREN DE JONG	Prof. Welshimer, Richmond March, 1954	present	vigorous	

Table I (continued)

Designation applied	Source of origin	Obtained wherefrom and when	Lysogenic quality	Motility	Notes*
W 337a	soil samples Isolated by DEN DOOREN DE JONG	Prof. WELSHIMER, Richmond March, 1954	absent	vigorous	
W 337b	soil samples Isolated by DEN DOOREN DE JONG	Prof. WELSHIMER, Richmond March, 1954	absent	vigorous	Asporogenous
W 7—0—11	soil samples Isolated by DEN DOOREN DE JONG	Obtained by Prof. WELSHIMER from strain 337a with the phage of 899	present	vigorous	
"Sensitive"	soil samples Isolated by DEN DOOREN DE JONG (?)	Prof. COWLES, New Haven	absent	undecided**	Asporogenous
"Mutilate"	soil samples Isolated by DEN DOOREN DE JONG	Inst. Pasteur, Paris July, 1953	absent	moderate	Asporogenous
KM	?	Dr. WEIBULL, Uppsala March, 1954	absent	vigorous	Asporogenous

* All strains were sporeforming, against which no remark to the contrary is made.
** The filamentous forms visible in the broth culture of this strain were sporadically observed to display signs of motility. Motility tests made on other occasions yielded negative results.

In agar containing 10 per cent saccharose the non-sporous strain P-899 grew very poorly and developed colonies of 1,5 to 2 mm in diameter and a glistening surface, but was not mucoid in appearance. In saccharose agar the colonies of W-899 and W-899 IId were 5 to 6 mm in diameter and markedly mucoid.

Characteristic of the "Mutilate" strain was that on saccharose agar its original subculture produced small (1 to 1,5 mm) colonies not reminiscent in appearance of the colonies of "wild" strains. The cultural properties of this strain will be dealt with under an independent heading because in the culture of it maintained in YC medium we have observed a dissociation which we think merits to be discussed in detail. When discussing this strain in general, we always have in mind its original material maintained in the frozen dried state.

Plated on saccharose agar, the strains 337a, 337b, and that designated "Sensitive", yielded non-mucoid colonies of a dull lustre from 0,5 to 1,5 mm in diameter. On YC agar, where the conditions are the most favourable for a mucoid growth of the "wild" ones, the said three strains gave rise to a large number of colonies dull in appearance, but along with them mucoid colonies were also encountered. From the strain designated KM no colonies of mucoid character were

obtained in YC agar, but some did appear in saccharose agar. Strain W-7-O-11 transformed into a lysogenic one from strain 337, gave mucoid colonies as well, when the conditions were favourable for this.

Flagellar antigen of the strains

On the evidence of immobilisation tests there exists serological similarity or identity between the individual strains (*e. g.*, strains 207 and 300) ; agglutination tests performed in test tubes failed to disclose this relationship. The results obtained with immobilisation tests are presented in Table II.

According to the immobilisation tests, the strains studied can be divided into five groups. The results of immobilisation tests suggest the following statements. 1. The 899 strains of different origin display an identical behaviour and their flagellar antigen corresponds to that of one of our own strains (213). 2. There exists a relationship between the flagella of the KM strain and those of several other strains (*e. g.* strains 337). 3. Between the members of the individual groups there may be overlapping reaction indicating common antigenic components ; *e. g.* strains 216 and 56.

Table II

The flagellar-antigenic structure of the studied strains on the evidence of immobilisation tests

Strain	Intensity of strain motility	Immobilisation (+) with immune sera									Group
		207	119	213	216	297	299	300	KM	337a	
207	+++	+	+	−	−	−	−	+	−	−	I
119	+++	+	+	−	−	−	−	+	−	−	
300	++	+	+	−	−	−	−	+	−	−	
301	++	+	+	−	−	−	−	+	−	−	
213	+	−	−	+	+	+	+	−	−	−	II
P 899	++	−	−	+	+	+	+	−	−	−	
W 899	++	−	−	+	+	+	+	−	−	−	
W 899 IId	++	−	−	+	+	+	+	−	−	−	
216	+	−	−	−	+	+	+	−	+	+	III
297	++	−	−	−	+	+	+	−	+	−	
299	+++	−	−	−	+	+	+	−	+	−	
KM	+++	−	−	−	+	+	+	−	+	+	
56	+++	−	−	−	−	−	−	−	+	+	IV
W 7−0−11	+++	−	−	−	−	−	−	−	+	+	
W 337a	++	−	−	−	−	−	−	−	+	+	
W 337b	+++	−	−	−	−	−	−	−	+	+	
60	+++	−	−	−	−	−	−	−	−	−	V

On the basis of flagellar specificity, the serological relationship among strains is more frequent than can be established by means of agglutination tests (compare the strains 216, 297, 299, and *KM*). This justifies us to divide *Bacillus megaterium* strains into groups according to their flagellar specificity.

Agglutination of the strains

The figures in Table III represent the agglutination values of the live or heat-treated suspensions of the bacterial strains, and show that the agglutinabi-

Table III

Agglutination of live and heat-treated suspensions of various Bacillus megaterium strains

Strain	Results of agglutination with different sera								
	207	209	119	213	216	297	899	938	300
207	8/8	—	8/8	—	—	—	—	—	—
208	—	—	—	—	—	—	—	—	—
209	—	2/2	—	—	—	—	—	16/2	—
119	16/16	—	32/32	—	—	—	—	—	—
213	—	—	—	16/16	—	—	1/1	—	—
216	—	—	—	—	8/8	—	—	—	—
296	—	—	—	—	—	—	—	—	—
297	—	—	—	—	—	4/4	—	—	—
298	—	—	—	—	—	—	—	16/8	—
299	—	—	—	—	—	—	—	—	—
300	—	—	—	—	—	—	—	—	2/2
301	8/4	—	16/16	—	—	—	—	—	—
56	—	—	—	—	—	—	—	—	—
60	—	—	—	—	—	—	—	—	—
938	—	—	—	—	—	—	—	8/8	—
P 899	—	—	—	4/2	—	—	8/2	—	—
W 899	—	—	—	4/2	—	—	8/2	—	—
W 899 IId	—	—	—	4/2	—	—	8/2	—	—
W 7—0—11	—	—	—	—	—	—	—	—	—
W 337a	—	—	—	—	—	—	—	—	—
W 337b	—	—	—	—	—	—	—	—	—
"Sensitive"	—	—	—	—	—	—	—	—	—
"Mutilate"	—	—	—	—	—	—	—	—	—
KM	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Note : The numerators indicate the results of agglutinations carried out with the living, and the denominators those with the heat-treated bacterial suspensions. The figures represent the 1/100th part of the reciprocal values of the titre (*e. g.*, 16/2 equals the 1 : 1600 titre of the living and the 1 : 200 titre of the heat-treated suspension. Sign — means that even in a dilution of 1 : 50 there was no agglutination. Heat treatment of the suspension consisted of placing the bacterial culture poured into a test tube in a water bath at 80° C for 7 minutes.)

lity of the suspensions exposed to moderate heat effect has generally undergone no, or only insignificant, changes. In the case of a few strains (*e. g.*, strains 899 and 209), however, the difference was more marked.

The *Bacillus megaterium* strains are conspicuous for the exceedingly marked specificity of their agglutinations, suggesting a wide variability of antigenic structure in this species. Eight strains out of 24 failed to agglutinate with 9 of the immune sera used ; in other words, a great part of the strains showed no antigenic relationship whatever with the others. On the evidence of their serological behaviour, the reacting 10 strains of different origin could be divided into 8 independent types. As has recently been demonstrated by one of us (IVÁNOVICS, 1955), the results of agglutination under conditions applied in these experiments lead us to conclude to specificity of the cell wall. Accordingly, on the basis of their cell-wall antigen, it is possible that *Bacillus megaterium* to be classed into numerous independent serological types which differ very sharply from one another.

The specificity of capsule of strains

It was emphasized by us (IVÁNOVICS, 1953) that *Bacillus megaterium* is to be regarded as a capsular microorganism, the capsule consisting in our view of D-glutamic acid-polypeptide. In our opinion the complex structure which was first described by TOMCSIK and GUEX-HOLZER (1951), and has been closely studied ever since, is but an apparent one. It is due to the polyglutamic-acid molecules which, in breaking to the surface, snatch off and carry away specific particles from the cell wall and, mixing with them, make the capsular substance heterogeneous. Agglutination tests carried out with bacterial suspensions killed with heat and digested with lysozyme confirmed that the cell wall of *Bacillus megaterium* strains is specific. Bacteria treated with lysozyme and stripped of their cell wall did not agglutinate with their homologous sera (IVÁNOVICS, 1955).

On YC agar plates or horse meat extract agar containing saccharose most of the strains studied by us gave mucoid colonies ; their cells had capsules of different developmental stages. Up to the time of writing it was only the "Mutilate" strain originating from DEN DOOREN DE JONG's material from which we could not isolate mucoid, *i. e.*, such colonies as consist of encapsulated cells.

In the cells of the mucoid colonies the presence of D-glutamic acid-polypeptide was demonstrated in every instance. The "capsular swelling reaction" (TOMCSIK, 1951) was found to be the simplest method of demonstration. The specificity of the cell wall which was made visible under phase contrast microscope by adding megaterium sera to samples of bacterial suspension (TOMCSIK and GUEX-HOLZER, 1954) agreed fully with the results yielded by the agglutination tests ; however, the said reactions were not seen except where the agglutination tests yielded positive results. This observation affords support for

earlier statements that the difference in immunobiological specificity between the individual *Bacillus megaterium* strains can be traced back to the antigenic structure of the cell wall.

Strains of bacteriophages studied, and their characteristics

For the strains M_1, M_2, and M_5, we are indebted to Professor COWLES. The phage marked 56 was isolated from the lysogenic *Bacillus megaterium* strain 56, and the phage strain W from the lysogenic strain W 899 ; both were propagated on the phage-sensitive strain designated as "Sensitive". Strain M_1,

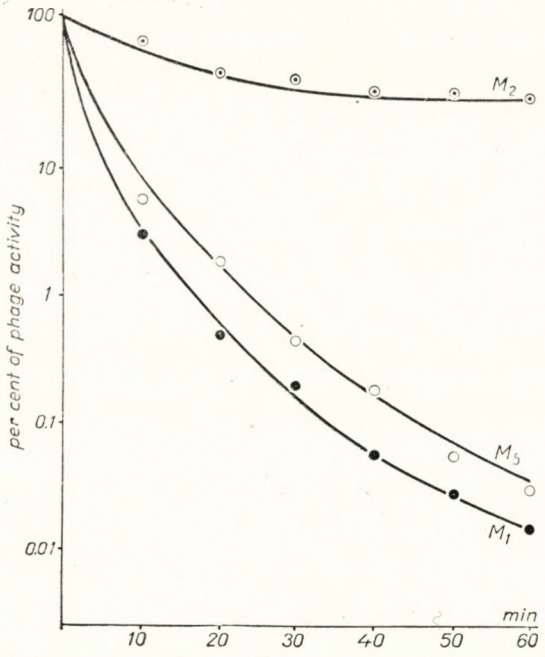


Fig. 1. Heat inactivation of M_1, M_2, and M_3 phages, at 60° C. (In semilogarithmic coordinate)

isolated by FRIEDMAN and COWLES (1955), was also derived from the lysogenic strain 899, so it was identical in origin with our phage strain marked W.

Our strains Mi, Mii, and Miii, were isolated with the aid of *Bacillus megaterium* strain 216, and grown on it. With phages Mi and Miii it was found possible to transform *Bacillus megaterium* cells into lysogenic ones, but similar attempts made with Mii failed to yield results.

In the following we summarize the findings of our experiments undertaken to identify the phage strains and to describe their significant characteristics. Figures 1, 2, and 3, furnish insight into the heat-inactivation conditions of the phage strains.

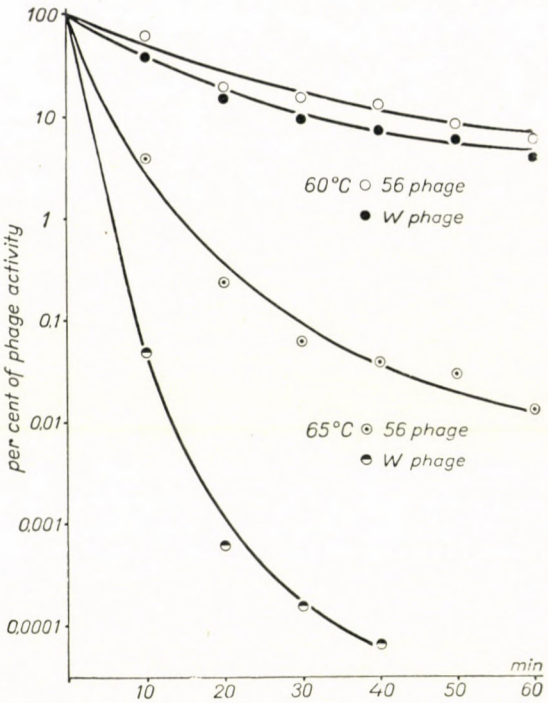


Fig. 2. Heat inactivation of 56 and W phages at 60° and 65° C

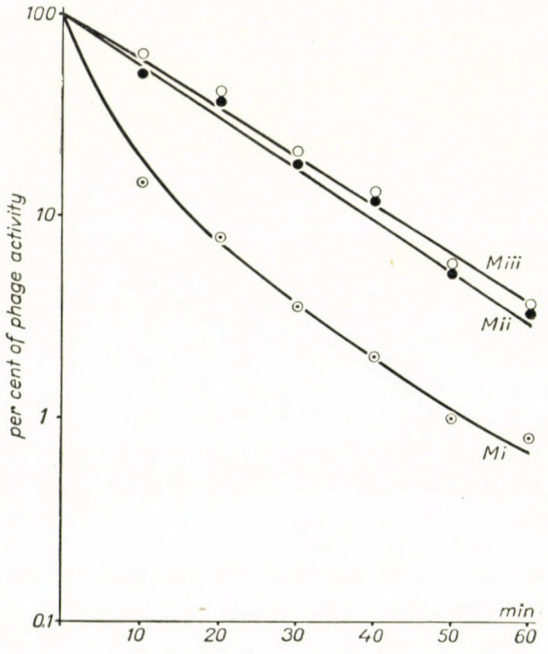


Fig. 3. Heat inactivation of Mi, Mii, and Miii phages at 60° C. (In semilogarithmic coordinate)

It is remarkable that phage W, which we ourselves had isolated from a subculture of *Bacillus megaterium* strain 899, was less sensitive to heat than strain M_1 of the same origin. Mii and Miii displayed the same behaviour, while Mi was slightly more sensitive to heat. It not is a straight, but a curve, which represents the inactivation of phage preparations ; this phenomenon indicates that with advancing inactivation the rate of inactivation gradually decreases. This observation is not in agreement with the data obtained by other workers (POLLARD and REAUME, 1951 ; FRIEDMAN and COWLES, 1953), who in the course of their heat-inactivation experiments established the existence of a linear correlation. We do not propose to deal here with the peculiar nature of this finding.

It can be seen from Table IV that in its antigenic structure phage 56 differs sharply from all the others. Curiously, a distinct difference was also seen between strain M_1 and W. Unfortunately, for the lack of anti-W antibody the reciprocal test could not be carried out. An essential difference exists between the group of the Mi and Miii phages and the other phages. On the other hand, a partial affinity can be established among the strains M_1, M_2, and M_5.

Concerning various other properties of the phage strains (latency period, sensitivity to citrate), information is supplied in Table V.

Sensitivity to phages of Bacillus megaterium strains

The sensitivity of 24 *Bacillus megaterium* strains to 8 different phages and to megacin, respectively, is illustrated in Table VI. The individual strains differ in their sensitivity to phages, which is conspicuously slight in strains 208, 297, 300, and limited to one or two phages. Among the strains studied none was found to be absolutely phage resistant. Strains like 208 proved to be sensitive to but a single phage (M_2); this does not necessarily mean, however, the absence of phage receptor capable of binding the particles of other phages. This seems to be borne out by a number of lysogenization experiments. For instance, with phage M_1 the lysogenic variant of strain 208, and with M_2 that of strain 297 was prepared ; but all experiment failed that aimed at turning lysogenic the strains 297 and 300 with M_1, and strain 301, with phage M_2. The M_2 phage, nevertheless moderately acting upon strains 119 and 300, was not capable of lysogenizing these strains in a limited number of trials.

Strains displaying a considerable phage effect in dilutions of 10^{-5} and higher were regarded as greatly sensitive to phages, and on this basis a significant difference in sensitivity was established to exist between the individual strains. The phage strains Mi, Mii, and Miii, were propagated in cells of the *Bacillus megaterium* strain 216 and, accordingly, bore signs of adaptation to that strain ; consequently, Mi and Miii barely acted upon the other megaterium strains, excepting those of the original material of DEN DOOREN DE JONG. The other phage strains possessed a considerably wider host range. Very sensitive

Table IV

Neutralising capacity of various anti-phage sera (percentage inactivation in 10 minutes)

Serum and its applied dilution	Neutralisation results obtained with various phage strains							
	Mi	Mii	Miii	M_1	M_2	M_5	W	56
Mi 1 : 100	98,6	98,8	98,0	0	0	0	0	0
Mii 1 : 500	99,0	97,5	99,0	0	0	0	0	0
Miii 1 : 1000	99,7	96,9	99,5	0	0	0	0	0
M_1 1 : 1000	0	0	0	100	88	0	0	0
M_2 1 : 100	0	0	0	74	99,5	35	0	0
M_5 1 : 1000	0	0	0	94,3	80	97	0	0
56 1 : 500	0	0	0	0	0	0	0	100

Table V

Sensitivity to citrate and latency period of phage strains

Property	Phage strains involved							
	M_1	M_2	M_5	W	56	Mi	Mii	Miii
Sensitivity to citrate in per cent	99,2	98,2	79,0	80,0	95,2	66,3	63,7	62,0
Latency period in minutes	75—80	75—80	75—80	65—70	N. t.	40—45	40—45	35—40

Citrate-sensitivity tested in the presence of 0,1 per cent sodium citrate. The values shown express the extent of inactivation in per cent. N. t. = not tested. Latency period determined by phage counts carried out at 5-minute intervals.

to almost every phage were those standard "indicator strains" which derive from the work of DEN DOOREN DE JONG, *viz.* strains 337, "Sensitive", "Mutilate" and KM. Spore formation proved to be inessential as far as sensitivity is concerned; the sporogenous and asporogenous variants of strain 337 showed the same behaviour towards the phages.

No parallelism could be established between the sensitivity of the strains to phages and megacin. For instance, the strain "Sensitive", which is very responsive to phages, was only sensitive to megacin in dilutions of 1 to 10 or, at the utmost, up to 1 to 100. On the other hand, strains barely sensitive to phages, as for instance strain 208, were exceptionally responsive to megacin.

No correlation was demonstrable between the phage sensitivity of the strains and the antigenic structure of their cell wall. No attempts were made to differentiate all the types within the material studied, since part of our strains gave no agglutination with either of the sera involved. Our experiments therefore furnish no information concerning possible differences between the members

of the latter group. Nor was any correlation found to exist between phage sensitivity and the flagellar antigen.

Table VI reveals that the phages M_1 and W, both derived from the lysogenic strain 899, acted upon their own strain in dilutions up to from 10^{-2} to 10^{-4}. They likewise acted upon the lysogenic strain designated W-7-0-11. The plaques forming at the sites of drippings were sharply distinct whenever the cultures were kept at room temperature for 1 or 2 days after incubation at 37° C for 24 hours. GRATIA (1936) described a similar phenomenon in connection with strain

Table VI

Sensitivity of Bacillus megaterium strains to phages and megacin

Bacillus megaterium strain	Rate of sensitivity of the individual phage strains								Sensitivity to megacin
	M_1	M_2	M_5	W	56	Mi	Mii	Miii	
207	6	2	7	6	4	0	2	—	4
208	—	2	—	—	—	—	—	—	4
209	5	3	4	4	—	1	5	—	4
119	4	4	4	6	2	1	3	—	4
213	0	5	3	2	—	—	2	—	3
216	0	—	0	0	5	8	7	7	2
296	6	3	6	4	0	0	3	0	4
297	—	—	—	—	—	—	2	—	4
298	6	4	6	6	3	—	4	—	4
299	6	0	6	6	4	—	3	—	4
300	—	4	—	—	—	—	4	—	4
301	6	—	4	5	—	0	0	—	4
56	4	5	4	4	0	2	6	3	4
60	5	0	6	5	—	—	0	—	4
938	6	4	7	6	0	—	4	—	4
P 899	2	—	4	4	—	—	—	—	3
W 899	4	5	2	2	—	—	5	—	4
W 899 IId	4	6	4	2	—	—	5	0	4
W 7—0—11	4	6	5	4	0	2	5	2	4
W 337a	6	6	7	7	5	4	7	6	4
W 337b	7	7	7	6	5	4	6	6	4
"Sensitive"	6	0	7	7	5	—	3	4	2
"Mutilate"	6	6	6	7	5	—	4	—	4
KM	6	3	7	6	4	7	7	6	2

Note: The figures represent the reciprocal values of the logarithm of the dilution (*e. g.* 6 = 10^{-6} titre); 0 indicates that the stock lysate suspension was found to be efficaceous; — indicates that even stock phage preparations failed to be effective.

899 and its phage ; analogous observations are known to have been made with other lysogenic systems.

If materials from the plaques of phage M_1 or W appearing on growth of strain 899 were inoculated into an exponentially growing culture of strain 899, this increased the virulence of these phages. The filtrate of the lysate obtained in this manner yielded $4{,}6 \cdot 10^6$ plaques per ml on strain 899. With the aid of indicator 337b the same phage preparation gave $1{,}38 \cdot 10^8$ plaques. Thus the efficiency of plating was about thirty times greater in the latter case.

It still needs to be mentioned that the composition of the nutrient medium was found to be of considerable influence upon the phage effect. In YC and YDC media it asserted itself but slightly, whereas in YP the plaque count was maximal. In the two first-mentioned media the bacteria were observed to be growing encapsulated, whereas in YP medium only a very slight capsule formation occurred.

Mutation of phage sensitivity in Bacillus megaterium

A short time ago we have reported (IVANOVICS, 1955) that from certain "wild" strains of *Bacillus megaterium* mutants can be isolated which differ sharply from the original strains in respect of their cultural properties, and particularly in regard to the changes that occur in the antigenic structure of their cells. This "mutant" may be conceived of as the R variant of *Bacillus megaterium*.

From a subculture isolated from a single cell of one of the "wild" strains (labelled 207) we likewise succeeded in dissociating the mutant (IVÁNOVICS, under publication). Study of this strain showed that concurrent with the variation is not only a change in the antigenic structure of the cell wall, but also a complete cessation of the strain's sensitivity to phages. The "mutant" strain does not adsorb phages and cannot be made to transform into a lysogenic one.

It was possible to confirm that observation with the aid of the mutants isolated from strains 208 and 209, as also with the mutant of a strain obtained earlier and labelled 111. The cultural and serological characteristics of these mutants have been described in an earlier work (IVÁNOVICS, 1955). All these strains proved to be resistant to the phages studied. It is, remarkable however, that their sensitivity to megacin differed in no way from that of the original "wild" forms. It would appear to be a conception of general validity that the mutation of *Bacillus megaterium*, which can be regarded as a peculiar example of the S—R variation, involves the complete loss of sensitivity to phages. This also manifests itself in the fact that we have failed in transforming the mutant strains into lysogenic ones, while no difficulties were encountered in lysogenization of their "wild" forms.

An interesting supplement to the question at issue is presented by certain observations we made on the "Mutilate" strain originating from the experiments of DEN DOOREN DE JONG. For that strain, which is highly sensitive to phages,

we are indebted to Professor LWOFF, from whom we received it in July, 1953. It was being maintained on YC agar by serial passages, but some material of it was kept in a frozen and dried state. The properties of the original culture of this strain have been described in a previous item of this paper. The strain serially passaged on YC medium was found to be very sensitive to various megaterium phages, up to the middle of 1954. Much to our surprise, by the beginning of 1955 it proved unsuitable to be used as an indicator for the demonstration of the lysogenic properties of strain 899(1). This failure prompted us to plate onto YC agar from the material maintained by serial transfer on agar medium. The colonies developed in the isolates could be classed according to their appearence into four variants. The characteristic features of these variants are as follows.

"*Mutilate*"-A. About two-thirds of the colonies consisted of this variant. The colonies were 1,5 to 2 mm in diameter, round, slightly flattened, of a dully lustrous surface, and an essentially "smooth" appearance, but conspicuous for their dry consistency. The colonies cannot be homogeneously emulsified in saline. In broth culture, idependent short chains were visible, made up each of a few motionless cells.

"*Mutilate*"-B. This variant formed colonies somewhat larger than the former, of lustrous surface and regular shape, slightly diaphanous, and readily emulsifiable. Subcultures on YC agar produced a limited number of mucoid colonies. In broth culture, there appeared vigorously moving rods.

"*Mutilate*"-C. The colonies were 3 to 4 mm in diameter, with margins slightly irregular and a flat uneven surface. Despite their characteristically "rough" appearance they were readily emulsifiable in saline. In broth culture motionless long threads were visible.

"*Mutilate*"-D. The colonies were slightly convex, finely granulated, 2 to 4 mm in diameter. The not mucoid colonies can be best described as dull variants. Motionless long threads were seen in broth culture.

The serological properties of the individual variants and their sensitivity to phages are summarized in Tables VII and VIII.

Table VII

Serological behaviour in the agglutination test displayed by the variants of strain "Mutilate" and by some mutants of Bacillus megaterium

Serum	Individual strains and their agglutination (reciprocal value of titre)							
	A	B	C	D	207m*	208m*	209m*	111m*
Anti—C	100	0	400	0	400	0	0	0
Anti—D	0	0	0	200	0	0	0	0
Anti—207m	400	0	800	0	800	0	0	0

Note : The letters indicate individual variants of the "Mutilate" strain.
* The mutant of strains 207, 208, etc., resp.

Table VIII

Sensitivity to phages of the variants of the Bacillus megaterium strain marked "Mutilate"

Variant of strain "Mutilate"	Grade of sensitivity to the individual phages								Sensitivity to megacin
	M_1	M_2	M_5	W	56	Mi	Mii	Miii	
A	—	—	—	—	—	—	—	—	$1 : 4 \cdot 10^4$
B	7	0	7	7	5	3	3	5	$1 : 4 \cdot 10^4$
C	—	—	—	—	—	—	—	—	$1 : 4 \cdot 10^4$
D	6	6	7	6	5	0	5	5	$1 : 5 \cdot 10^2$

See Table VI.

On the evidence of these data we have obviously succeeded in disclosing that a standard laboratory strain of *Bacillus megaterium*, commonly known to be highly phage sensitive, gives rise to a variant which is completely resistant to phages.

Nearest to the "wild" form of *Bacillus megaterium* stands "*Mutilate*"-B (capsule formation, motile rods, phage sensitivity). On the strength of its outward appearance "*Mutilate*"-C might be regarded as an R variant, and is conspicuous for its complete resistance to phages. "*Mutilate*"-A counts for an intermediate form, although in appearance its colony does not answer the "rough" type. Its inferior emulsifiability and complete resistance to phages make it appear to be a form intermediate between the S and R variants.

As regards the antigenic structure of the variants, it is remarkable that serologically "*Mutilate*"-D and "*Mutilate*"-C differed sharply from each other. The homologous sera of these variants failed to agglutinate either of the strains listed in Table I. It is noteworthy, on the other hand, that agglutination tests showed mutant 207 and "*Mutilate*"-C to be serologically identical, for they mutually adsorbed their respective antibodies. The antigenic structure observed in "*Mutilate*"-C indicates that in the course of mutation the "wild" strains (S variants) lose their type-specific property and assume an antigenic structure which is the same as that of the R variants originating from other types (Ivánovics, 1955).

Conclusions and summary of results

We can safely do without a discussion of further details. The statements made, and the conclusions that can be drawn from them, we would summarize as follows.

1. The cultural properties of recently isolated "wild" strains of *Bacillus megaterium* can readily be characterised by cultivation on a few various agar

media. The cultural properties of strains originating from various laboratories and derived from the experimental material of DEN DOOREN DE JONG, isolated some 25 years ago, differ somewhat from those of the lately isolated "wild" strains. In cultures of these laboratory strains, even under the most favourable cultural conditions, colonies of a mucoid character are seldom seen. But they do not altogether lose their capacity to produce mucoid dissociant colonies, consisting of encapsulated cells.

2. Applying the immobilisation test, it is possible on the basis of the flagellar antigens to distinguish serological groups of *Bacillus megaterium*. The agglutination test carried out in test tubes proved unsuitable for the demonstration of the group-specific flagellar antigens.

3. *Bacillus megaterium* strains can be classed in distinctly demarcated types on the strength of the thermostable specific substances in the cell wall. The great variability of types is demonstrated by the fact that in our 19 strains of different origin 8 serological types could be distinguished.

4. The serological structure of *Bacillus megaterium* strains usually appears to be stable. No differences were seen to prevail in the antigenic structure of standard laboratory strains of the same origin. Wherever there is a change in the serological structure, it is the consequence of mutation, and consists in some profound alteration in the antigenic structure of the cell wall.

5. In all the studied strains of *Bacillus megaterium* and their mutants the formation of D-glutamic acid-polypeptide could be demonstrated in varying amounts, but sometimes in traces only. This is the material of which the capsules of the cells are made up.

6. The strains studied were found to be sensitive in a widely varying degree to 8 different phage strains. Phage sensitivity showed no correlation with the antigenic structure of the strains. The phage sensitivity of the strains was influenced neither by the group-specific antigens distinguishable on the basis of the flagellar antigen, nor by the type-specific antigens of the cell wall.

7. On the other hand, alterations in the cell wall due to mutation led to a complete cessation of the sensitivity to phages. A change in the antigenic structure of the cell wall brought about the loss of type specificity and, along with it, phage sensitivity. Such mutants do not adsorb phages and cannot be made lysogenic. This phenomenon, namely the rise of a phage-resistant mutant and the concomitant change in the antigenic structure, was also observed in a standard "Mutilate" strain highly sensitive to phages.

8. In *Bacillus megaterium* strains the sensitivity to phages and the sensitivity to megacin are not parallel. Completely phage-resistant mutants remain unchanged in their sensitivity to megacin.

Acknowledgement. We wish to express our sincere thanks to all those who were kind enough to put some of the experimental material, such as bacterial and phage strains, at our disposal.

Summary

Bacillus megaterium strains can be divided into serological groups according to their flagellar antigens, and into types according to the thermostable antigen in the cell walls. No correlation appears to exist between the division of the strains on a serological basis and their sensitivity to phages. Phage-resistant mutants are formed "spontaneously", without the action of phages. Resistance to phages is the result of the loss of the type-specific antigen.

LITERATURE

BERGERSEN, F. J.: J. Gen. Microbiol. **11**, 175 (1954).
CLARKE, N. H. and COWLES, P. B.: J. Bact. **63**, 177 (1952).
DELAMATER, E. D.: Cold Spring Harbor Symposia, **16**, 381 (1951).
DELAMATER, E. D.: 6th Symposium of Soc. Gen. Microbiol., Bacterial Anatomy, Cambridge Univ. Press, 1956.
DELAMATER, E. D. and HUNTER, M. E.: J. Bact. **65**, 739 (1953).
DEN DOOREN DE JONG, L. E.: Zbl. Bakt. Orig. I. **120**, 1 (1931).
FRIEDMAN, M.: J. Bact. **68**, 274 (1954).
FRIEDMAN, M. and COWLES, P. B.: J. Bact. **66**, 379 (1953).
GARIBALDI, J. A., IJICHI, K., SNELL, N. S. and LEWIS, J. C.: Ind. Eng. Chem. **45**, 838 (1953).
GRATIA, A.: C. R. Soc. Biol. **123**, 322, 506, 1018 (1936).
GRATIA, A.: Ann. Inst. Pasteur, **57**, 652 (1936).
GUTSTEIN, M.: Zbl. Bakt. Orig. I. **100**, 1 (1926).
HORVÁTH, S. and ALFÖLDI, L.: Acta Microbiol. Hung. **1**, 495 (1954).
IVÁNOVICS, G.: Zbl. Bakt. Orig. I, **138**, 211 (1937).
IVÁNOVICS, G.: Zbl. Bakt. Orig. I, **159**, 178 (1953).
IVÁNOVICS, G.: Acta Microbiol. Hung. **3**, 135 (1955).
IVÁNOVICS, G. and ALFÖLDI, L.: Acta Microbiol. Hung. **2**, 275 (1955).
KNIGHT, B. C. J. G. and PROOM, H.: J. Gen. Microbiol. **4**, (1950).
LWOFF, A., SIMINOVITCH, L. and KJELDGAARD, N.: Ann. Inst. Pasteur **79**, 815 (1950).
MURPHY, J. S.: J. Exp. Med. **96**, 581 (1952).
MURPHY, J. S.: J. Exp. Med. **98**, 657 (1953).
MURPHY, J. S.: J. Exp. Med. **100**, 657 (1954).
NORTHROP, J. H.: J. Gen. Physiol. **39**, 225, 251 (1955).
NORTHROP, J. H. and MURPHY, J. S.: J. Gen. Physiol. **39**, 607 (1956).
PESTI, L.: Thesis, Budapest (1954).
POLLARD, E. C. and REAUME, M.: Arch. Bioch. Biophys. **32**, 278 (1951).
ROBINOW, C. R.: J. Bact. **65**, 378 (1953).
ROBINOW, C. R.: 6th Symposium of Soc. Gen. Microbiol., Bacterial Anatomy, Cambridge Univ. Press 1956.
SMITH, N. R., GORDON, R. E. and CLARK, F. E.: Sporeforming Bacteria, Agriculture Monograph No. 16, Washington, 1952.
SZYBALSKY, W.: Ann. Rep. Biol. Lab. Long Island Biol. Ass. **64**, 27 (1953—54).
SZYBALSKY, W.: Applied Microbiology **2**, 57 (1954).
TARR, H. L. A.: J. Hyg. **32**, 535 (1932).
TOMCSIK, J.: Experientia **7**, 459 (1951).
TOMCSIK, J. and GUEX-HOLZER, S.: Schweiz. Ztschr. Path. Bakt. **14**, 515 (1951).
TOMCSIK, J. and GUEX-HOLZER, S.: Experientia **10**, 484 (1954).
TOMCSIK, J. and GUEX-HOLZER, S.: J. Gen. Microbiol. **10**, 317 (1954).
WAHL, R.: Ann. Inst. Pasteur **72**, 473 (1946).
WELSHIMER, H. J.: Bact. **61**, 153 (1951).

AETIOLOGIC STUDY OF POLIOMYELITIS CASES OCCURRED IN THE SECOND HALF OF 1955 IN HUNGARY

By

E. MOLNÁR and F. FORNOSI

State Institute of Hygiene, Budapest

(Received October 6, 1956)

In Hungary, the aetiologic study of poliomyelitis by the method of ENDERS *et al.* [1] has been made since 1954 in the State Institute of Hygiene, Budapest, and in the Institute of Microbiology, University Medical School, Szeged. In each institute 10 poliomyelitis virus strains were isolated from faeces or spinal cord, in 1954 [2, 3].

The present paper resumes the experience obtained at the Virus Department of the State Institute of Hygiene, Budapest, during working up of the material derived from poliomyelitis cases admitted to hospital in the second half of 1955.

Materials and methods

Virus isolation experiments were always performed in cultures of human skin-muscle tissue derived from artificial abruptions. Tissue fragments were stored in SIMMS X_6 solution at +2—4° C until used. Explantation was made in normal test tubes on cock-plasma layers coagulated by chicken embryo extract. After explantation 1 ml of nutrient fluid was given to each tube. The tubes were kept vertically in an incubator of 37° C overnight, then they were laid down (stationary cultures). As starting nutrient fluid, the mixture of balanced salt solution (SIMMS X_6) and an equal volume of bovine amniotic fluid with 5 per cent chicken embryo extract was used. The fluid was changed every 3 or 4 days. The second and further nutrient fluids contained no more chicken embryo extract. To each ml of the nutrient fluid 100 units of penicillin and 50 μg of streptomycin were added.

From faecal material or spinal cord fragment an about 10 per cent suspension was made in saline containing penicillin and streptomycin, or, if necessary, also aureomycin. The suspension was centrifuged at 9000 r. p. m. for 30 minutes. The supernatant and, later, the passage materials were stored at +2—4° C, or at —20° C until used.

Inoculation was carried out into tissue cultures after 3 or 4 days of preliminary incubation. The nutrient fluid was replaced by 0,1 ml of the experimental material in each of 4 test tubes. After about 20 minutes of contact, 0,9 ml of nutrient fluid was added and the cultures were returned to the incubator.

The result was read on the 4th day after inoculation. Three subpassages were performed with pooled nutrient fluids harvested on the 4th day from each material, regardless of the cytopathogenic lesions. Final results were considered always after the third subpassage.

The Brunhilde, Lansing and Leon type-specific antisera used were kindly supplied by Professor H. PETTE, Hamburg.

Neutralization tests were carried out with a 1 : 50 final dilution of type serum against the 1 : 100 final dilution of the isolated cytopathogenic strains. The serum-virus mixture was kept in the incubator for an hour. Subsequent inoculation, incubation and reading were accomplished as described above. Neutralization was considered positive when the immune serum containing tissue culture, remained intact, while in the control tubes the degeneration was complete.

Results

In the interval between July 1 and December 31, 1955, we obtained altogether 215 samples. Most of these were faecal specimens from 178 suspected cases, of which 40 on subsequent clinical examination did not prove to be poliomyelitis. Five samples were spinal cord fragments from fatal cases.

23 faecal samples out of a total of 138 were found contaminated with bacteria, in spite of the addition of streptomycin, penicillin and aureomycin.

From clinically positive 115 faecal specimens appropriate for virus isolation experiments 32 cytopathogenic agents, from those 40 cases not diagnosed as poliomyelitis 2 cytopathogenic agents, were isolated. On the basis of the history related by the mothers, these later 2 cases seem to have been abortive poliomyelitis.

In the evaluation of the results the fact must be taken into account that. poliomyelitis virus is present in the faeces only in the acute phase of illnesse We isolated 7 strains in the first two weeks of the illness from patients whose faecal samples in the 4th—6th week of the illness were also examined. From the later samples no virus strain was isolated. All in all we isolated only 2 strains from faecal samples obtained on the 20th or 21st day after beginning of the fever, *i. e.* on the 15th—16th day after the appearence of paresis. From the other 31 faecal samples taken 3 weeks or more after the onset of the illness we could not isolate any strain. From a total of 84 faecal samples obtained within the first 3 weeks of illness there were isolated 32 cytopathogenic strains (38 per cent). Isolation from faeces of the first week of illness was more frequently successfull than from those of the second, or third weeks (see Table I).

Table I

Results of virus isolation experiments

Week after the onset of illness	Cases	Positive	
		Number	P. c.
1.	34	15	44
2.	30	11	37
3.	20	6	30
1—3 total	84	32	38
More than 3	31	—	—
Total	115	32	28

From the 34 cytopathogenic strains 32 have been identified in neutralization tests by standard type specific sera. Identification of 2 strains is still in progress ; both of these were isolated from cases diagnosed clinically as polio-

myelitis. Strains grouped according to type and month of occurrence are presented in Table II.

Table II

Isolated poliomyelitis virus strains and their types, monthly

Month of illness	Cases	Strains	Type		
			1	2	3
VII.	20	9	1	5	3
VIII.	27	10	4	3	3
IX.	24	7	—	1	6
X.	7	2	2	—	—
XI.	6	4	—	1	3
Total	84	32	7	10	15

In Table III the data are summarized according to the domicile (Budapest or Country) of the patients arranged in groups. Each of the three types of virus occurred in Budapest and in the country equally, but type 3 was more frequent in Budapest than in the country.

Table III

Number of cases examined and the types of the isolated strains in Budapest and in the country

Domicile	Budapest	Country	Total
Number of cases	54	32	86
Type of strains isolated			
1	4	2	6
2	5	5	10
3	12	3	15
Total	21	10	31

We studied also the districtional distribution of the virus strains isolated from cases in Budapest. It is remarkable that in one of the districts there occurred 4 caused by type 3 each near to the other, as well to time as to domicile.

Regarding the age of the patients, most of the cases occurred among children below 3 years, strictly speaking among those of 1 and 2 years. All the three types occurred in the various age groups. Isolation of virus seems to have succeeded with equal probability in the different age groups.

Discussion

Our work was made for informatory purposes. We endeavoured to clear our virus diagnostic possibilities and to get a rough image from the aetiology of a poliomyelitis epidemic in Hungary.

In the tissue culture and virus isolation experiments we used a widely current method with some little modifications, more conform to our circumstances. We succeeded in isolating the aetiologic agent in 38 per cent of the poliomyelitis cases in the first 3 weeks of illness. Our results correspond with those of KIBRICK *et al.* (38 per cent) [4], or with those of VOROSHILOVA *et al.* (36 per cent) [5]. It seems that by this method one cannot obtain better results. It was only after completion of this work that we understood that KIBRICK *et al.* were able to isolate virus in 96 per cent from faeces of patients with poliomyelitis, negative by common virus isolation method, by inoculating a large, one or more ml volume of faecal suspension into the tissue culture [4]. When working up material from 1956, we have been also using this method with success.

The type rate of our virus strains differed from the foreign data published. Type 1 strains seem to have played a smaller part in the 1955 epidemic in Budapest, than type 2 and particularly type 3 strains.

We found no correlation between clinical picture and type of virus strains, or age. Each of the three types occurred in each district. As to age distribution, our data agree with the observation of RUDNAI [6] that in Hungary the occurrence of poliomyelitis has shifted towards the younger age groups, to under 3 years.

Summary

In the second half of 1955 we succeeded in isolating in human embryonic skin-muscle tissue culture thirty-two poliomyelitis virus strains from 86 patients with manifest disease and two strains from abortive cases.

From the 34 poliomyelitis virus strains seven belonged to type 1, ten to type 2 and fifteen to type 3. Identification of 2 cytopathogenic strains is still in progress.

We have grouped our results according to domicile, age and the calendar month.

LITERATURE

1. ENDERS, J. F., WELLER, T. H., ROBBINS, F. C.: Science **109**, 85 (1949).
2. FÖLDES, P.: a) Orv. Hetil. **96**, 1429 (1955). — b) ibid. **97**, 1078 (1956).
3. PINTÉR, M., ÁBRAHÁM, E., RÁVNAY, M.: a) Orv. Hetil. **97**, 393 (1956). — b) Acta Microbiol. Hung. **3**, 399 (1956).
4. KIBRICK, S., ENDERS, J. F., ROBBINS, F. C.: J. Immunol. **75**, 391 (1955).
5. VOROSHILOVA, M. K., TSHUMAKOV, M. P., ZEVANDROVA, V. I., SALMANSON, E. C.: Vopr. Virusol., **1**, 11 (1956).
6. RUDNAI, O.: Lecture at State Institute of Hygiene, Budapest, November 28, 1955.

EFFECTS OF FORMALDEHYDE ON INFLUENZA VIRUS

I. EFFECTS ON THE HAEMAGGLUTINATING ACTIVITY OF THE VIRUS

By

A. KOCH and E. CSONKA

"Human" State Vaccine Institute for Production and Research, Budapest

(Received February 21, 1957)

A number of viral vaccines produced for human purposes is prepared by formalin inactivation. Though this type of vaccines was used with great success, only few data are available — according to our knowledge — about the details of the formalin inactivation of human viruses. The following studies were carried out in order to get some information about the factors influencing the effect of formaldehyde on the haemagglutinating activity of influenza virus.

Materials and methods

Virus. The Paris PL 1/49 strain of influenza A-prime virus was used throughout. It was maintained in our laboratory by serial passages in 10-day old embryonated eggs.

Red blood cells (RBC). RBC of white Leghorn cocks were used. As it was observed that the RBC of some cocks gave extremely variable and unreproducible results, only RBC of selected animals were used in the present study. Citrated blood obtained by heart puncture was washed three times with saline and made up to a 1 per cent suspension for haemagglutination purposes.

Formaldehyde. This material was obtained in the form of *Solutio Formaldehydi* (PH. Hung. V). The solution was stored at 4° C in dark bottle and magnesium carbonate was added during the storage. The formaldehyde content of the solution was determined weekly. The dilutions used in the experiments were always prepared fresh in distilled water.

Preparation of concentrated and purified viral suspensions. As no accurate results were obtained with crude allantoic-fluid-virus, all the experiments were performed with purified material. Purification and concentration were made by the RBC adsorption-elution method. Elution was made in saline containing 10 per cent phosphate buffer of pH 7,2. A tenfold concentration was usually made.

Buffer. The disodium hydrophosphate-potassium dihydrophosphate buffer system was used throughout.

Haemagglutination tests. All these tests were performed according to the micro-method described by TAKÁTSY [1].

Experimental

We studied the influence of temperature, pH, formaldehyde- and virus concentration on the inactivation velocity of the haemagglutinating activity. Some experiments on the „reactivation" of formaldehyde-inactivated virus were also made.

Effect of temperature. In some preliminary experiments the speed of inactivation was found to be the highest at pH 8,0 in the pH range tested. Accordingly the experiments on the effect of different temperatures were performed at this pH.

The results are summarized in Fig. 1. It is to be seen that at a certain concentration of virus and formaldehyde the speed of inactivation depended on

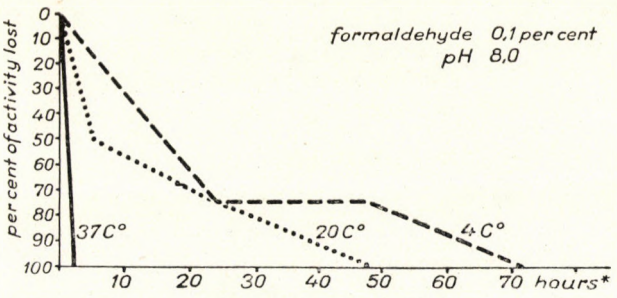


Fig. 1. Effect of temperature on tke speed of inactivation

* Time necessary for total loss of haemagglutinating activity

the temperature. Formaldehyde concentrations which inactivated the haemagglutinating activity rather slowly at 4° C and had a moderate effect only at 20° C, caused rapid inactivation at 37° C.

Effect of pH. The experiments on the effects of the pH were always made at 37° C, using 0,1 per cent formaldehyde (final concentration) as an inactivating agent. The desired pH was obtained by diluting the concentrated virus suspension to a haemagglutinating titre of 1 : 256 (usually a tenfold dilution)

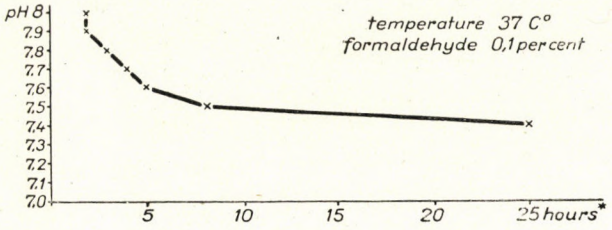


Fig. 2. Effect of pH on the speed of inactivation

* Time necessary for total loss of haemagglutinating activity

with saline containing 20 per cent buffer solution. The experiment was performed as follows. In a series of test tubes the virus suspensions of different pH were mixed with formaldehyde and incubated in a water bath of 37° C. At certain intervals samples were taken for titration. The results are presented in Fig. 2.

As Fig. 2 clearly shows the shifting of the pH towards alkaline caused a rapid increase in the velocity of inactivation. None of the pH values tested

caused any change in the haemagglutinating activity of the virus if no formaldehyde had been added.

The effect of formaldehyde concentration was studied at 37° C and pH 8,0. Under such experimental conditions at a certain virus concentration there was a minimum amount of formaldehyde necessary to achieve total loss of the haemagglutinating activity within a certain period of time. No effect was observed

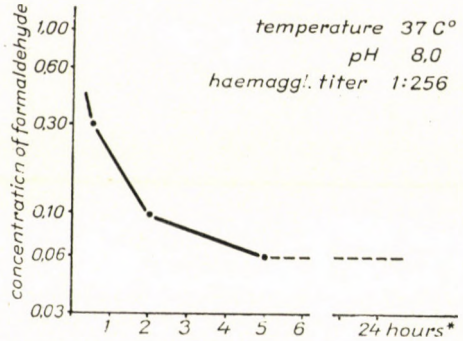


Fig. 3. Effect of formaldehyde concentration on the speed of inactivation
* Time necessary for total loss of haemagglutinating activity

at lower concentrations, while at higher concentrations the total inactivation took place sooner (Fig. 3).

Changes in the sensitivity of virus to formaldehyde in relation to the pH. These experiments were also carried out at 37°C. When different concentrations of formaldehyde were used at different pH values, the amount of formaldehyde

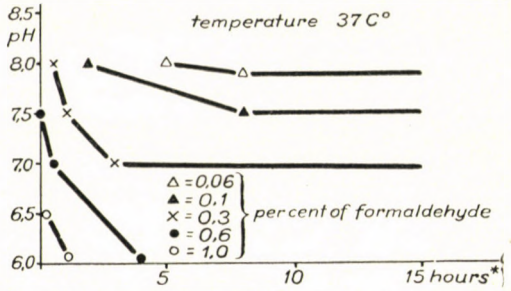


Fig. 4. Changes in the sensitivity of virus to formaldehyde in relation to the pH
* Time necessary for total loss of haemagglutinating activity

necessary for the inactivation of a certain amount of virus depended largely on the actual pH. The more alkaline the environment, the less formaldehyde sufficed for inactivation (Fig. 4).

The effect of virus concentration was found to be of moderate importance, as only changes over 50 per cent did cause any change in the time necessary for total inactivation.

"Reactivation" of inactivated virus by pH changes. As it was found that the pH has a very marked effect on the speed of inactivation and the amount of formaldehyde required, we thought that by changing the pH inactivation might be inhibited or even some "reactivation" might be achieved. This type of experiment was carried out essentially in the same way as an inactivation experiment, with the only difference that at certain intervals a sample was taken

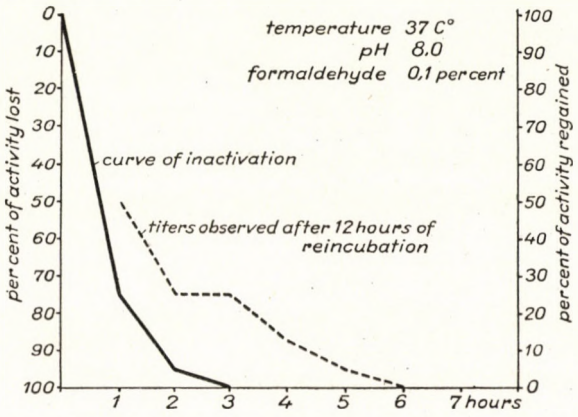


Fig. 5. "Reactivation" of inactivated virus by pH changes

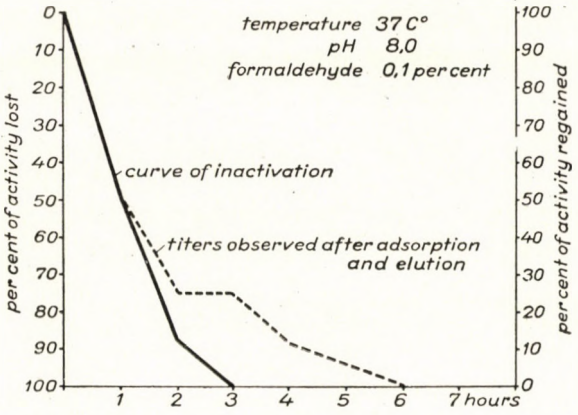


Fig. 6. "Reactivation" of inactivated virus by adsorption on, and elution from, red blood cells

and its pH was corrected to 6,5 with dilute hydrochloric acid. Afterwards the samples were returned to the water bath (37° C) for 12 hours and then titrated. It was found that by this method inactivation can be inhibited to a certain degree and for some few hours after the total inactivation at pH 8,0 part of the activity might also be recovered. After a certain period no "reactivation" took place following the acidification, *i. e.* the inactivation became irreversible. These results are presented in Fig. 5.

Recovering of haemagglutinating particles from formaldehyde-inactivated samples by RBC adsorption and elution. As we found that for a certain period part of the apparently inactive virus might regain its haemagglutinating activity if the pH was acidified to 6,5, we thought that for the same period part of the adsorbing and eluting capacity might also be retained. Accordingly, we made an inactivation experiment at 37° C and pH 8,0, and at certain intervals samples were taken for adsorption and elution purposes. Fig. 6 presents the results.

It can be seen that as long as the inactivation is reversible by acidification the capacity of the virus to adsorb and elute is also retained. No experiment by any other method was made to demonstrate the eventual adsorption of the virus on RBC after the loss of its eluting capacity.

Summary

The above studies were based mostly on the work of EATON [2] on the detoxication of the diphtheria toxin by formaldehyde and on that of ROSS and STANLEY [3] dealing with the effects of formaldehyde on the tobacco mosaic virus. A detailed discussion will be given in connection with the last paper of this series.

The present results may be summarized as follows.

1. The inactivation of the haemagglutinating activity of the influenza virus by formaldehyde is influenced by three main factors, *viz.* the temperature, the pH and the concentration of formaldehyde.

2. Though the effects of all these factors are intimately related to each other, the reaction velocity of the inactivation is most sensitive to changes in the pH.

3. The speed of inactivation was measured at different temperatures between +4° and 37° C and in a pH range of 6,0 to 8,0. It was found that the inactivating activity of a certain amount of formaldehyde was the greatest at pH 8,0 at 37° C. No spontaneous inactivation of virus was observed under these conditions during the experimental period.

4. If the pH of an inactivation system containing a certain amount of formaldehyde was shifted towards acid, inactivation can be inhibited and even "reactivation" of part of the activity can be achieved in an apparently inactive system.

5. As long as by acidification "reactivation" can be achieved, a gradually decreasing part of the virus retains its adsorbing and eluting capacity.

During this work was in progress TIMM *et al.* (J. Immunol. 77, 444, 1956 Dec.) reported similar observations in connection with the formalin inactivation of poliomyelitis virus.

LITERATURE

1. TAKÁTSY, GY.: Acta Microbiol. Hung. **3**, 191 (1955).
2. EATON, M. D.: J. Immunol. **33**, 419 (1937).
3. ROSS, A. F. and STANLEY, W. M.: J. Gen. Physiol. **22**, 165 (1939).

SIMPLE METHODS FOR TESTING THE NITRATE REDUCING, CATALASE AND THE FAT SPLITTING ACTIVITY OF BACTERIA

By

L. LOVREKOVICH

Institute of Epizootiology of the Veterinary College, Budapest

(Received March 22, 1957)

1. Testing of the nitrate reducing and catalase activities on solid medium in Petri dishes

The nitrate reduction being characteristic of certain bacteria, is regarded as an important factor in their identification. The usual nitrate reduction test consists of demonstrating the presence of nitrites in the inoculated nitrate containing fluid medium after a certain period of incubation.

The nitrite production of bacteria cannot be demonstrated with absolute certainty if only a single test is carried out. This failure is due to two different factors. First, the time necessary for nitrite production varies with the actual bacterium tested. Second, the nitrate reduction of some bacteria does not stop with the production of nitrites but proceeds till ammonia or even molecular nitrogen is produced. Thus the negativity of the nitrite test at a certain point of time does not essentially mean the missing of the nitrate reducing activity. This source of error might be overcome by repeated tests in small samples taken at certain intervals from the inoculated medium.

This method is time consuming, especially when a greater number of bacterial strains are to be tested. To avoid the above difficulties, a new technique of nitrite test on solid medium in Petri dishes, will be described.

Agar medium containing nitrate is poured into Petri dishes to form a layer about 5 mm thick. After cooling and drying the plate is cut into four sectors by cuts wide enough to avoid diffusion from one sector to the other. The organisms to be tested are inoculated to one sector each in such a way as to form a narrow strip about 20 mm long lying in the middle of each sector.

At intervals the nitrite reaction is carried out as follows. A glass tube (length, 40 mm ; inner diameter, 4,5 mm ; wall thickness, 1 mm) is inserted into the medium near the bacterium colonies in such a way as to draw up a little disc of agar into the tube. By means of a capillary pipette, GRIES-ILOSVAY nitrite reagent is layered onto the surface of the little disc in the tube.

A red coloured layer develops in the agar disc immediately if the reaction is strongly positive, while ½—1 minute may be necessary if reduction is only moderate (Fig. 1).

The method allows to take about 8 samples from each culture at different intervals during incubation. Another advantage of the method is that the diffusion inhibits any further action of the bacteria on the nitrites once produced, thus no false negative reactions occur.

The method can also be used to perform the catalase test if the sample is taken directly from the inoculated area covered with bacteria. A 10 per cent solution of hydrogen peroxide is used as reagent. The positive reaction is indicated by the formation of bubbles easily observable in the glass tube (Fig. 2).

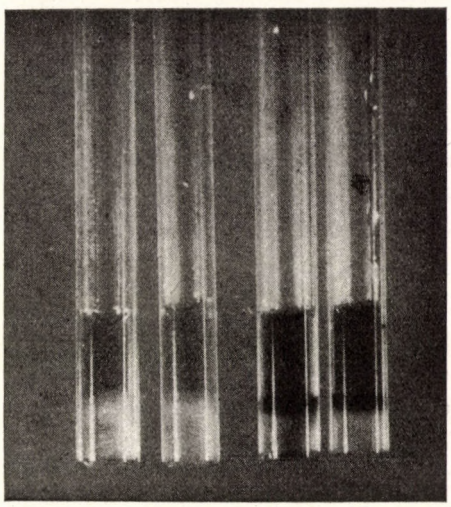


Fig. 1. Nitrite test
Left: negative reactions
Right: positive reactions

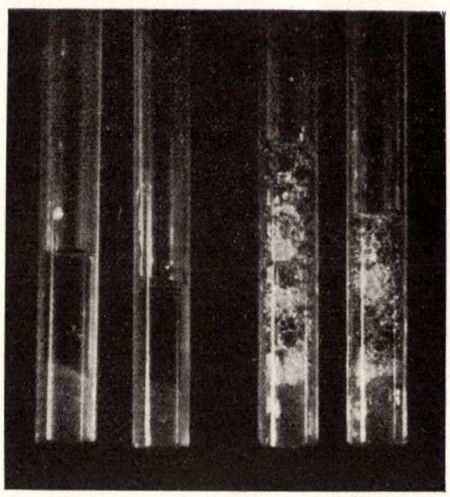


Fig. 2. Catalase test
Left: negative reactions
Right: positive reactions

2. Demonstration of the fat splitting activity of bacteria in fluid medium

In routine laboratory work solid media are used to demonstrate the fat splitting activity of bacteria, as the homogeneity of the fat emulsion is more easily achieved in solid media than in fluid ones. The decomposition of fat in such media is easily observed from the appearence of certain changes beneath the bacterium colonies.

In fluid media either constant shaking or the use of emulsifying agents is necessary to achieve homogeneity. In these media the decomposition of fat is demonstrated by titrating the free fatty acids with alkali at the end of incubation.

This method is too time consuming to be used for routine purposes, especially in mass work.

To avoid the above difficulties a new procedure is presented below.

A proper medium with, or without, organic carbon is dispensed into test tubes and sterilized. Ordinary white paper is cut to 10×50 mm strips. The strips are put in a Petri dish and melted ox fat is poured on them. After autoclaving at 115° C for 1 hour the strips are taken out of the fat under sterile conditions and transferred onto the wall of slanted tubes containing the fluid medium. As soon as the fat is solid, the strips are pushed into the fluid by means of a flamed and cooled loop. The tubes are then inoculated and incubated as usual.

At the end of the incubation the strips are removed, washed in water and stained with an 0,5 per cent alcoholic solution of methylene blue for about 30 seconds. The strips are then rinsed with water to remove excess stain.

Was the fat decomposed by the bacterium used, both the water and alcohol soluble products are removed during the staining procedure and the strips stain more or less blue ; even the fatty acids not completely removable are stained.

If no decomposition occurred, the fat soaked strips remain unstained.

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója Műszaki felelős: Farkas Sándor
A kézirat nyomdába érkezett: 1957. IV. 10. — Terjedelem: 12,25 (A/5) ív, 54 ábra

Akadémiai nyomda, Budapest, Gerlóczy u. 2. — 42100/57 — Felelős vezető: Bernát György

The *Acta Microbiologica* publish papers on microbiological subjects in English, German, French and Russian.

The *Acta Microbiologica* appear in parts of varying size, making up one volume.

Manuscripts should be addressed to

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Correspondence with the editors should be sent to the same address.

The rate of subscription to the *Acta Microbiologica* is 110 forints a volume. Orders may be placed with "Kultura" Foreign Trade Company for Books and Newspapers (Budapest, VI., Népköztársaság útja 21. Account No 43-790-057-181) or with representatives abroad.

Les *Acta Microbiologica* paraissent en français, allemand, anglais et russe et publient des travaux du domaine de la microbiologie.

Les *Acta Microbiologica* sont publiés sous forme de fascicules qui seront réunis en un volume.

On est prié d'envoyer les manuscrits, destinés à la rédaction, à l'adresse suivante:

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Toute correspondance avec la rédaction doit être envoyée à cette même adresse.

Le prix de l'abonnement est de 110 forints par volume.

On peut s'abonner à l'Entreprise pour le Commerce Extérieur de Livres et Journaux «Kultura» (Budapest, VI., Népköztársaság útja 21. Compte-courant No. 43-790 057-181) ou à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

«*Acta Microbiologica*» публикуют трактаты из области микробиологии на русском, немецком, английском и французском языках.

«*Acta Microbiologica*» выходят отдельными выпусками разного объема. Несколько выпусков составляют один том.

Предназначенные для публикации рукописи следует направлять по адресу:

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

По этому же адресу направлять всякую корреспонденцию для редакции.

Подписная цена «*Acta Microbiologica*» — 110 форинтов за том. Заказы принимает Предприятие по внешней торговле книг и газет «Kultura» (Budapest, VI., Népköztársaság útja 21. Текущий счет № 43-790-057-181) или его заграничные представительства и уполномоченные.

35,— *Ft*

INDEX

Tolnai, G. and *Barsy, G.:* Active and Passive Mouse Protection Tests Used in the Assay of Typhoid Vaccines 227

Kardeván, A. und *Kapp, P.:* Untersuchungen über das Vorkommen der Toxoplasmose an Haustieren in Ungarn. 237

Fűrész, I., Kubinyi-Schwanner, M. und *Józsa, G.:* Über die Bewertung der Laboratoriumsuntersuchungsresultate bei den mit Chloramphenicol behandelten Typhuskranken 253

Gunda, L., Joó, I., Richter, P. and *Váli, A.:* Preparation of Typhoid Vaccine from Separated Antigenic Components. I. Preparation of Purified O and Vi Antigens 263

Uri, J., Bognár, R. and *Békési, I.:* Fungicidal Effect of Methyl Derivatives of 8-Hydroxyquinoline on Dermatophytes 279

Szita, J.: Differential Diagnosis of Enterococci 289

Ivánovics, G., Alföldi, L. and *Lovas, B.:* Cultivation and Electron Microscopy of a Bacteriocinogenic Strain of Bacillus megaterium 295

Győrffy, B. and *Kállay, I.:* Streptomycin Resistance of Serratia marcescens 309

Ivánovics, G., Alföldi, L. and *Széll, Á.:* Serological Types of Bacillus megaterium and their Sensitivity to Phages 333

Molnár, E. and *Fornosi, F.:* Aetiologic Study of Poliomyelitis Cases Occurred in the Second Half of 1955 in Hungary 353

Koch, A. and *Csonka, É.:* Effects of Formaldehyde on Influenza Virus. — I. Effects on the Haemagglutinating Activity of the Virus 357

Lovrekovich, L.: Simple Methods for Testing the Nitrate Reducing, Catalase and the Fat Splitting Activity of Bacteria 363

ACTA MICROBIOLOGICA

ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS

E. FARKAS, J. HORVÁTH, S. KOTLÁN, R. MANNINGER,
A. PELC, K. RAUSS, J. SZIRMAI

REDIGIT

G. IVÁNOVICS

TOMUS IV FASCICULUS 4

A KADÉMIAI KIADÓ
BUDAPEST

1957

ACTA MICROBIOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA MIKROBIOLÓGIAI KÖZLEMÉNYEI

KIADÓHIVATAL: BUDAPEST V., ALKOTMÁNY UTCA 21.

Az *Acta Microbiologica* német, angol, francia és orosz nyelven közöl értekezéseket a mikrobiológia tárgyköréből.

Az *Acta Microbiologica* változó terjedelmű füzetekben jelenik meg. Több füzet alkot egy kötetet.

A közlésre szánt kéziratok a következő címre küldendők:

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Ugyanerre a címre küldendő minden szerkesztőségi levelezés.

Az *Acta Microbiologica* előfizetési ára kötetenként belföldre 80, külföldre 110 Ft. Megrendelhető a belföld számára az Akadémiai Kiadónál (Budapest V. Alkotmány utca 21. Bankszámla 05-915-111-44), a külföld számára pedig a »Kultúra« Könyv és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Bankszámla: 43-790-057-181), vagy külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

Die *Acta Microbiologica* veröffentlichen Abhandlungen aus dem Bereiche der Mikrobiologie in deutscher, englischer, französischer und russischer Sprache.

Die *Acta Microbiologica* erscheinen in Haften wechselnden Umfanges. Mehrere Hefte bilden einen Band.

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind an folgende Adresse zu senden:

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

An die gleiche Anschrift ist auch jede für die Redaktion bestimmte Korrespondenz zu richten.

Abonnementspreis pro Band: 110 Forint. Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Außenhandels-Unternehmen »Kultúra« (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Bankkonto Nr. 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

EXPERIMENTAL KERATOCONJUNCTIVITIS SHIGELLOSA

By

B. SERÉNY

State Institute of Hygiene, Budapest

(Received July 24, 1956)

No disease corresponding to human dysentery could be induced in laboratory animals. Although the disease occurs rather frequently in monkeys, apart from a single report [7] only *S. sonnei* cultures have been described to be suitable for inducing experimental infection in that species [16, 17]. The common method employed in dysentery research, the parenteral infection of mice, leads to Shigella sepsis. Attempts have been made to obtain an animal experimental model superior to those hitherto used. ZOELLER and MANOUSSAKIS [22] injected *S. dysenteriae* cultures into the conjunctival sac of guinea pigs and rabbits after bile treatment. WEIL *et al.* [19, 20] inoculated Shigellae into the chorioallantoic sac or into the amnion of the chicken embryo, BINGEL [2] infected guinea pigs vesically, and SERGEYEVITCH [15] used cats for peroral infection. These methods failed to gain wide-spread acceptance, partly because they were complicated (vesical infection) and partly because they were of doubtful efficiency (conjunctival infection). The embryonated hen's egg method does not seem to be superior to the mouse test and the results published by SERGEYEVITCH have not been confirmed. Thus, the problem of the experimental dysentery model still awaits solution.

In the following we shall discuss a new model disease [13, 14] together with the observations made in 1265 conjunctival infections induced in 425 guinea pigs. On the suggestion of RAUSS we have termed the new model disease keratoconjunctivitis shigellosa.

Method

In the experiments guinea pigs were used, but it is always possible to induce the condition also in the rabbit. Prior to infection the animal's eyes are examined in focal light to exclude the slightest ocular change and only animals with normal eyes are accepted. Old Shigella strains from the museum, R variants, phase II. cultures of *S. sonnei* are apathogenic in conjunctival infection and should therefore not be used. Exlusively fresh cultures not more than 1 day old are suitable for use, whereas there are no restrictions of any significance as regards the culture medium; agar, blood agar and broth are equally suitable. As a large inoculum (one with a cell count of about one thousand million germs) one normal loop of 4 mm in diameter from the solid medium should be given into the conjunctival sac. Smaller doses can be introduced more gently, by instillation.

During conjunctival infection the eyelids are drawn apart, slightly raising them from the eyeball, the loop, or the gentle glass spatule, holding the culture is slid under the eyelid in the auricular angle deep into the conjunctival sac, and the lids are let to adhere onto the inoculum. The loop is then gently guided along the tarsal conjunctiva toward the nasal angle, avoiding lesion to the cornea as much as possible. For this reason gentle pressure should be exerted on the lid by the loop during the procedure. The gentlest method of infection is instillation. The lids are pulled apart and from a Pasteur pipette 0,025 ml Shigella suspension is dripped into the eye.

After conjunctival infection is completed the lid margins are closed and fixed in this position for 1 minute. Experience has shown that rinsing the eye 1 minute after infection does not remove the infective material from the conjunctival sac and thus no special trick is necessary to ensure the success of the infection. By the method described natural infection is imitated and the pathogen will adhere without any lesion to, or technical interference on, the eye.

Symptoms of keratoconjunctivitis shigellosa

Latency is generally short and depends on the size of the inoculum. Infection with a large dose is within a few hours followed by the appearance of the first symptoms (conjunctivical oedema, oedema and hyperaemia of the fornices and semilunar plica, chemosis, exudation), whereas with small doses it takes several days (according to our observations, at most 5 days) until these symptoms develop. *Conjunctivitis* then extends rapidly, *blepharitis* develops and soon severe, purulent blepharoconjunctivitis appears, followed 1 to 2 days after conjunctivical infection by the development of *keratitis*. Keratitis begins with the formation of isolated infiltrates and within a day becomes diffuse, accompanied during the first days by fever. Dysenterial keratitis develops in characteristic stages, appearing in a definite order. In the first stage the entire surface of the strongly infiltrated, ulcerated cornea is covered by a whitish-gray coat. Within a few days the latter detaches circularly from the limbus, and the ring of loosened, oedematous corneal segment, which thus becomes visible, increases in diameter. This red ring is covered by epithelium and does not stain with fluoresceine. By the middle of the second week following conjunctival infection this second stage is over and now the whole corneal surface is red in colour. Simultaneously, beginning also at the limbus, the loosened cornea begins to flatten in the form of a ring increasing in size, just as the first stage. As a result, the whole corneal surface (from the periphery toward the centre and finally throughout) becomes cornea-like again, but translucency is regained (if at all) only later. Meanwhile, the symptoms of conjunctivitis subside, inflammatory hyperaemia and oedema lessen, then cease, chemosis being the most persistent symptom.

Keratoconjunctivitis shigellosa tends to heal spontaneously, without any treatment, within 2 to 4 weeks, usually leaving behind some lesions (swelling of the lids, corneal opacities). Sometimes it may last as long as 2 months and infrequently (in 2,6 per cent of the animals) it takes a chronic form. The incidence of fatal outcome is similar (2,5 per cent), but intercurrent

disease is apparently more often responsible for death than keratoconjunctivitis shigellosa itself.

Bacteriological, serological, cytological and histological studies

As a rule, the pathogen can be grown from the discharge, from infection until the onset of healing, over a period averaging 2 to 3 weeks. During incubation the forces of systemic defense keep the number of viable Shigellae in the discharge definitely low. This number shows then excessive variations, as destruction and multiplication of the pathogen take place side by side. The variability of the microbial count is followed by a gradual increase, marking the end of the latency period. From the onset of the disease until the corneal coat detaches excessive numbers of Shigella can be grown from the discharge. Bacteriological purification then occurs gradually. In typical, untreated cases the bacteriological finding turns negative invariably before clinical healing. The same occurs in chronic cases, in which, however, the pathogen may be recoverable for as long as 70 to 260 days.

In a considerable number, 34, of the 122 guinea pigs tested, after conjunctival infection Shigella could be grown from blood obtained by heart puncture. *Bacteriaemia* occurs during the incubation period, for a short time, also in cases in which the eye remains intact (acquired immunity, apathogenic Shigella). The general condition, body temperature and the agglutinin titre of serum change independently of the results of blood bacteriology.

Immediately after infection a change takes place in the *cytological pattern of the conjunctival discharge.* The little mucus obtainable under physiological conditions from the conjunctival sac of guinea pigs contains preponderantly mononucleated cells, believed to originate from the conjunctival epithelium. As early as 1 to 2 hours following infection the majority of the cells in the discharge are polymorphonuclear neutrophils. It is interesting that a leucocytic reaction develops also after infection with apathogenic Shigellae, when not even in focal light can ocular changes be detected. It is mainly in epitheloid type cells that greater numbers of intracellular Shigellae are found.

Histological examination reveals the gravest changes in the cornea. As early as 2 hours after conjunctival infection the process increasing to inflammation begins, at first in the area of the palpebral-bulbar junction. The corneal epithelium is diffusely infiltrated, mainly, by leucocytes. At sites there is epithelial destruction and the corneal tissue shows oedematous loosening. A somewhat milder leucocytic infiltration extends to the posterior elastic membrane of *Descemet.* Near to the junction the inflammation extends over to the palpebral conjunctiva, where the lymph follicles exhibit marked reticulocytic hyperplasia. During the subsequent days infiltration and oedematous loosening

increase and corneal ulcerations develop. After the coat is detached reparation begins, the thickness of the cornea is reduced, oedema disappears or diminishes (KERÉNYI).

In the sera from 53 guinea pigs, with keratoconjunctivitis shigellosa induced by conjunctival infection with S. dysenteriae, flexneri, sonnei or schmitzi cultures, 131 *Widal* tests were made against a diagnostic prepared from a homologous culture, between the 8th and 82nd day of the disease. In some animals the tests were made in series, at different intervals. Positive results were obtained in 71 per cent of the tests, in 73 per cent of the animals. Agglutinin in serum was most readily detected in S. flexneri infection. Agglutinin formation began during the second week of illness, reached its peak (maximum ; 1 : 640, average ; 1 : 180) after 18 or 19 days, then diminished gradually. Antibody production was irregular and was not demonstrable in many a case. The behaviour of the *Widal* reaction in keratoconjunctivitis shigellosa mostly agreed with the experience made in connection with dysentery by numerous authors, in Hungary by RAUSS *et al.* [12]. It is remarkable that agglutinin production may occur also after inoculation with killed Shigella or its endotoxin, when the eye remains intact.

The increase in antibacterial *mouse protecting antibodies* is another evidence of the immunological response of the organism. Sera from 74 guinea pigs with keratoconjunctivitis shigellosa were tested for mouse protecting activity, partly in pools and partly in individual sera, by the method described by COOPER and KELLER [4, 5] with either the constant infecting dose (one corresponding to several hundred times the LD 50) or with the constant amount of serum. Results identical in 3 parallel tests were only accepted. It was found that in the course of keratoconjunctivitis shigellosa the amount of mouse protecting antibodies increases within rather wide limits ; the 50 per cent protecting volume of the guinea pig serum varied from 0,025 to 0,1 ml prior to conjunctival infection, and from 0,0004 to 0,025 ml after recovery from keratoconjunctivitis shigellosa. The protective value of serum was increased also in chronic cases. There was, however, also an example for the contrary ; in 2 animals there was no difference between the local processes (clinical course, mode and time of recovery), yet the antibodies in serum were significantly increased in one animal and practically unaltered in the other. Sera from normal animals with different susceptibility may be equal in protective value and the immunity acquired in the course of the disease is not always parallel with the antibacterial antibody titre. After active immunization the protective capacity of the serum increases markedly also in cases in which simultaneous reinfection shows the animal to be susceptible to infection. As to the relationship between mouse protecting antibody in serum and immunity, from the findings we have concluded that although in many a case the antibodies indicate the existence of immunity, they do not determine it.

Factors influencing the development and course of keratoconjunctivitis shigellosa

Numerous observations made in the course of keratoconjunctivitis shigellosa indicate that in the development and course of this infectious disease the qualitative and quantitative relations of the pathogen, on the one hand, and the condition of the host organism, on the other, are of great significance.

A) *The pathogen*

The significance of the pathogenic agent is not restricted to the starting of the infective process. This has been referred to above, when it was stated that keratoconjunctivitis shigellosa does not heal until viable Shigellae are recoverable from the ocular discharge and reparation begins only after bacteriological negativity has resulted.

a) *Effect of pathogens belonging to different genus.* Conjunctival infection, recommended by CALMETTE as a tuberculosis model, has been carried out with a variety of bacteria during the past decades and thus the action of several bacteria is known in this relation. Controlled studies have revealed that following conjunctival administration of *M. tuberculosis* the eye itself remains intact [3, 9], just as after conjunctival infection with *C. diphtheriae* cultures [1] or with strains of *N. gonorrhoeae* [6, 8]. It is also known that previous treatment of the eye with bile makes certain pathogens *(S. typhi, S. paratyphi A* and *B, S. dysenteriae, C. diphtheriae)* capable of causing ocular inflammation in guinea pigs and rabbits, but the reaction does not develop consequently [21, 22]. Other methods, such as instillation of diphtheria toxin [1], burning of the conjunctiva [18], application of a paraffine bandage on the eye [8] may prove effective in the case of certain pathogens. However, we have not found any mention in the literature of a pathological condition similar to keratoconjunctivitis shigellosa.

We studied the results of conjunctival infection with loopful amounts of various intestinal bacteria. The 166 recently isolated strains used for this purpose included 21 *E. coli*, 36 *E. coli dyspepsiae* (O : 26, O : 55 and O : 111), 19 *Proteus*, 19 *Ps. aeruginosa*, 5 *S. paratyphi A*, 16 *S. paratyphi B*, 12 *S. typhi murium*, 6 *S. saint-paul*, 1 *S. derby*, 2 *S. cholerae suis*, 16 *S. typhi*, 1 *S. rostock*, 9 *S. anatum* and 3 *S. meleagridis* strains. The strains were isolated from diseased subjects at the *Department of Bacteriology, State Institute of Hygiene.* Keratoconjunctivitis shigellosa developed in none of the 182 conjunctival infections with the enteric pathogens, whereas the disease consequently developed in all the 241 cases of conjunctival infection with 130 recently isolated Shigella strains of various types. Apparently, among the intestinal bacteria Shigella is the only capable of causing keratoconjunctivitis.

Lacking recently isolated strains we have been unable to test the activity of all the species of the genus Shigella : we could not extend the investigations to types 3 to 7 of S. dysenteriae, and types 1 to 3 and 5—11 of S. boydi. Our statements therefore will apply to all Shigellae only after these organisms too have been examined.

Certain intestinal bacteria [S. saint-paul, derby, cholerae suis and anatum] produced a moderate, whereas S. typhi murium invariably a very marked conjunctivitis, without keratitis. S. typhi cultures did not lesion the eye, but elicited a disease of great severity, with septiaemia and a high mortality rate.

Thus, recently isolated Shigella strains in adequate doses are pathogenic by conjunctival infection. This specific property of these microorganisms makes it recommendable to include conjunctival infection in studies concerned with certain problems of the pathogenicity of the genus Shigella.

b) *Difference in action between single shigella groups.* It seems that the course of keratoconjunctivitis shigellosa may slightly vary from species to species. The difference between Flexner and Sonne infections is that with the former usually (but not invariably) exudation is ampler and more lasting and the time required for bacteriological and healing corneal reparation is longer. The differences observed are, however, not significant enough to alter the characteristic course of the disease.

c) *The infective dose.* The success of conjunctival infection with Shigella is highly dependent on the size of the infective dose. Pathogenic Shigella strains invariably cause keratoconjunctivitis when employed in concentrations of 10^8 or higher. If smaller doses are employed under identical conditions, the effect depends on the virulence of the given Shigella strain. More virulent strains are effective at microbial counts as low as 10^6 to 10^7, whereas the same quantity of less virulent Shigella induces disease only in some of the infected animals. Small doses, of a microbial count of 10^4 or lower, leave all the animals unaffected. On the basis of 486 conjunctival infections with 207 cultures of Shigella the ID 50 was generally between 10^6 and 10^7 ; with virulent strains, between 10^5 and 10^6 ; with less virulent ones, above 10^7.

As already mentioned, the duration of latency is influenced by the size of the inoculum. On the other hand, a 100-fold difference in the microbial count of the infective doses did not alter the single stages, the whole course and the duration of keratoconjunctivitis shigellosa.

When conjunctival infection is carried out with a number of Shigella too small to induce keratoconjunctivitis in the susceptible organism, the pathogens introduced into the conjunctival sac are rapidly destroyed and 1 to 6 hours after infection cannot be grown from the eye.

d) *Diminution and cessation of pathogenicity.* The strain of Shigella, which proves to be pathogenic and highly virulent on conjunctival infection, loses its virulence and finally turns apathogenic under various conditions.

During incubation at body temperature the virulence is diminished and the strain becomes non-pathogenic within a few days. This takes place sooner, in an inhibitor medium, *e. g.* in DC. A similar process may result on serial passage in media containing increasing concentrations of chloramphenicol, rendering thereby the virulent strain resistant to the antibiotic. Likewise, the phase II. cultures of S. sonnei and the R variants of the different Shigella types are apathogenic.

It is noteworthy that during storage for from 4 months to 2 years in a refrigerator (at + 4° C) virulence is reduced and pathogenicity is lost. The loss of pathogenicity takes place at a time when the biochemical properties, antigenic structure and mouse virulence are still unchanged, but usually, though not invariably, the resulting trypaflavin-agglutinability indicates changes in the surface antigen.

Even very high doses of heat-killed, highly virulent Shigella cultures fail to induce keratoconjunctivitis. The same applies to endotoxins. In these cases, however, the *Widal* reaction may turn positive.

B) *The macroorganism*

a) *Natural species immunity*. On the basis of its innate susceptibility, the guinea pig is the most suitable animal for keratoconjunctivitis shigellosa. Next comes the rabbit, in which the disease develops but inflammation does not extend over the entire corneal surface. In the eye of the cat keratitis developed only after repeated infection and even then in the form of focal infiltrations. In other species conjunctival infection is followed by keratoconjunctivitis shigellosa only exceptionally (hamster) or not at all (mouse, polecat, hen).

b) *Natural individual immunity*.The resistance of guinea pigs against Shigella introduced on the conjunctiva is relative ; high doses of a pathogenic strain cause disease in every case. The individual immunity manifests itself only with smaller infective doses, when some of the animals remain normal.

As far as the course of the disease is concerned, there is a marked difference between albino and darkfurred animals ; in the former, keratoconjunctivitis shigellosa is of shorter duration and reparation is more complete.

c) *Local immunity*. In the same animal keratoconjunctivitis shigellosa shows an identical, or a closely similar course in the right and in the left eye, but in some cases the process is quite different in the two identically infected eyes. For example, one eye may be affected by a typical, acute disease healing within a few weeks, whereas in the other eye chronic disease lasting for months may develop.

Phenomena suggesting tissue immunity have been observed mainly after reinfection.

d) *Natural, acquired immunity.* Keratoconjunctivitis shigellosa is followed by the development of immunity, as proved by the following observations.

1. After recovery the level of mouse protecting antibodies are increased.

2. After reinfection bacteriaemia and hyperpyrexia is less frequent and shorter in duration than after the first infection.

3. Shigellae introduced into the conjunctival sac of the recovered animal are in most cases soon destroyed at the portal of entry and after 1 or 2 days cannot be cultured.

4. Infection after recovery from keratoconjunctivitis shigellosa is followed by disease less often, than after the first infection. If a disease develops, it often (in 43,5 per cent of reinfections) consists only in a mild, abortive keratoconjunctivitis, much less severe than the typical disease, so in its appearance, as in extent, intensity, course and duration.

The immunity which develops in the course of keratoconjunctivitis shigellosa is, however, relative. On reinfection with smaller doses (which are certainly infective for a susceptible animal) the eye remains unaffected in only one third of the cases. In 48 of 260 reinfections of recovered animals (in 18,4 per cent) a typical, or in some respects even more severe (prolonged course, Shigella sepsis, mixed-abortive-typical) disease developed.

It has been observed that there may be a pronounced difference in the response to reinfection between healed and originally unaffected eyes. In the former the incidence of mild, abortive disease is higher, whereas in the eye left intact at the first infection reinfection causes typical keratoconjunctivitis. This difference in behaviour is ascribed to tissue immunity.

As regards the persistence of immunity, in accordance with the experience of RAUSS and KÉTYI [10] in dysentery, immunity may still exist after 9 months.

Discussion

The conjunctival route of infection offers means to elicit such an experimental shigellosis in the eye of the guinea pig which in many aspects stands nearer to human dysentery than the models thus far used. The pathogen is inoculated onto the conjunctiva, *i. e.* on a mucous membrane and infection can be carried out in the gentlest manner possible, without any aspecific injury effect. As a result of conjunctival infection, after a latency period identical in duration with that of dysentery a local process involving ulcer formation develops. Just like typical dysentery, typical keratoconjunctivitis shigellosa heals within 2 to 4 weeks, but also like dysentery, sometimes it turns into a chronic process. In keratoconjunctivitis shigellosa, too, antibodies may appear in the serum during the local process, demonstrating thereby doubtlessly the

occurrence of an immune response. In this response tissue factors are also involved.

An apparent difference between common dysentery and keratoconjunctivitis shigellosa is indicated by the circumstance that primary conjunctival infection is followed invariably by typical disease, whereas human dysentery may appear in the most variable forms. After recovery from keratoconjunctivitis shigellosa, however, repeated infection induces highly variable disease patterns. This certainly makes one to conclude that the variability of the dysenteric process is due to immunological differences. This means that in the susceptible organism successful infection invariably induces typical disease whereas, after recovery from the condition, repeated infection will induce a disease which may be abortive, mild, atypical or typical, depending on the intensity of immunity.

Septicaemia is uncommon in association with keratoconjunctivitis shigellosa. The success of infection by the conjunctival route can be judged by the development or absence of disease, by the course of keratoconjunctivitis shigellosa, and not by the rough criteria usual with parenteral infection, survival or death. The disease offers ample possibilities for direct and continuous observation. The eye by its localization and transparency is much easier to observe than any other organ.

The method makes it possible to determine the pathogenicity of Shigella strains and to characterize their virulence by the value of the ID 50. "Although examination of the guinea pig eye cannot by itself decide whether the failure to induce disease in that eye means at the same time an absence of human pathogenicity, the fact still remains that conjunctival infection has proved suitable for controlling a *certain* pathogenic property and may offer possibilities to study the factors controlling the pathogenicity of Shigella and the aetiological problems connected with it" (RAUSS).

It is believed that our method is a novel one. The conjunctival infection carried out with different bacteria by several authors [3, 9, 21, 1, 18, 6, 8] has been performed with Shigella cultures by ZOELLER and MANOUSSAKIS [22] who introduced the pathogen into the eye after treatment with bile. They have failed in regularly inducing disease in the previously aspecifically injured eye and even if disease had developed it did not lead to immunity, but to enhanced susceptibility. Our method will invariably induce typical changes under determined conditions and the changes in their entity bear some resemblance to human dysentery.

According to the above, the use of the new model promises success in research concerned with various theoretical and practical problems of dysentery. The method, however, has also some disadvantages. The portal of infection remains open and thus it cannot be ascertained what proportion of the inoculum has been left in the eye. This disadvantage is to a certain degree counter-balanced

by the fact that the Shigella introduced into the conjunctival sac adhere to it rapidly, within a minute. Dysentery and keratoconjunctivitis shigellosa are definitely different as regards the infected organism, the circumstances of infection, the distance between the portal and the subsequent localization of infection, the affected organ and the clinical symptoms. It is therefore obvious that data achieved by means of the model cannot be applied directly to human dysentery. We wish to call attention also to the fact that the Shigella-bearing discharge often flows from the eye, contaminates the fur of the animal and escaping into the air, may be a potential source of infection.

Summary

1. Guinea pigs infected conjunctivally with cultures of Shigella develop an experimental shigellosis termed keratoconjunctivitis shigellosa.

2. The phenomena observed and the conclusions drawn in connection with 1265 conjunctival infections in 425 guinea pigs are discussed, without going into the experimental details. A short description of the technique employed is followed by a list of prominent symptoms, and by an account given of the results of bacteriological, histological, serological and cytological studies. It is emphasized that the method may be considered specific. The difference in effect between single Shigella groups, the significance of the quantity of the infective dose and the loss of pathogenicity are dealt with. The results of conjunctival infection in different species, the role of natural, individual and local immunity are discussed. Finally, an account is given of the investigations according to which keratoconjunctivits shigellosa is followed by a relative immunity.

3. Evidence is presented indicating that the new model is more suitable for studies of the problems of dysentery than are the animal tests in common use. Keratoconjunctivitis shigellosa is identical with dysentery in that the Shigella transferred to a mucous membrane causes an acute, or sometimes chronic, local process, involving the immune response of the organism.

LITERATURE

1. Bieling, K., Oerlichs, L.: Ztschr. Hyg. **117**, 792 (1936). Ztschr. Imm. forsch. **92**, 93 (1938).
2. Bingel, K. F.: Ztschr. Hyg. **125**, 110., **574**, 610 (1943—1944).
3. Calmette, A., Guérin, C. and Grysez, V.: C. R. Soc. Biol. **74**, 310 (1913).
4. Cooper, M. L. and Keller, H. M.: Proc. Soc. Exp. Biol. **64**, 442 (1947).
5. Cooper, M. L. and Keller, H. M.: Proc. Soc. Exp. Biol. **68**, 87 (1948).
6. Drell, M. I., Miller, C. Ph., Bohnhoff, M., Moeller, V.: J. Inf. Dis. **77**, 201 (1945).
7. Forsyth, W. L.: Ind. J. Med. Res. **30**, 213 (1942).
8. Miller, C. Ph., Drell, M. I., Moeller, V., Bohnhoff, M.: J. Inf. Dis. **77**, 193, 216 (1945).
9. Paraf, I.: La tuberculose du cobaye, Paris (1939).
10. Rauss, K., Kétyi, I.: Acta Microbiol. Hung. **3**, 75 (1955).
11. Rauss, K.: Dysenteria, "Művelt Nép" Budapest (1955).
12. Rauss, K., Szendey, L.: Magy. Orv. Arch. **34**, 333 (1933).
13. Serény, B.: Acta Microbiol. Hung. **2**, 293 (1955).
14. Serény, B.: Thesis (1955).
15. Sergeyevitsh, E. A.: Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. No. 4. 71 (1954).
16. Troickij, V. L., Rubintstein, P. L., Gekker, V. D., Aksenova, A. S.: Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. No. 7. 58 (1953).
17. Troickij, V. L., Tumanjan, M. A., Dshikidze, E. K.: Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. No. 12. 37 (1953).
18. Weichsel, M.: Zbl. Bakt. I. Orig. **128**, 187 (1932).
19. Weil, A. J., Gall, L. S.: J. Inf. Dis. **69**, 67 (1941). J. Immunol. **41**, 445 (1941).
20. Weil, A. J., Volentine, J. A.: Proc. Soc. Exp. Biol. **44**, 160 (1940).
21. Zoeller, Chr., Batouil: C. R. Soc. Biol. **90**, 1154 (1924).
22. Zoeller, Chr., Manoussakis: C. R. Soc. Biol. **90**, 1399., **91**, 257 (1924).

UNTERSUCHUNG DES LEPTOSPIRENBEFALLS DER HAUSTIERE IN EINER SÜDOSTUNGARISCHEN GEMEINDE

Von

J. KISZEL und M. FÜZI

Mikrobiologisches Institut der Medizinischen Universität, Budapest

(Eingegangen am 19. September 1956)

Im Sommer 1952 war in der im Südosten des Landes gelegenen Ortschaft Ujkigyós unter Drescharbeitern eine Leptospirosenepidemie aufgetreten. Die serologische Untersuchung des Blutserums der Kranken ergab, dass es sich bei dem Krankheitserreger um einem Leptospirentyp der Hebdomadisgruppe handelte [1]. Anschliessend konnte nachgewiesen werden, dass der die Epidemie hervorrufende Leptospirentyp in den in der Umgebung der Ortschaft lebenden Feldnagetieren anzutreffen war, der Befall sich jedoch auf die Waldmäuse beschränkte [2]. Es gelang uns, aus der Niere von zwei Waldmäusen (*Apodemus sylvaticus*) zur Hebdomadisgruppe gehörende Leptospirenstämme zu isolieren (L. Uk—2, L. Uk—4), von denen wir später nachwiesen, dass sie als *L. sejrő* zu betrachten sind. Mit der ansteckungsverbreitenden Rolle der Nagetiere liess sich jedoch das Zustandekommen der Epidemie nicht erklären, da die befallenen Waldmäuse lediglich in der Umgebung des Dorfes anzutreffen waren, in den Bauernhöfen jedoch, wo die Kranken in der Zeit vor Ausbruch der Seuche gearbeitet hatten, unter den Nagetieren kein Leptospirenbefall vorgekommen war. Im weiteren führten wir daher zwecks Klärung der Ansteckungsquelle und der näheren Umstände der Epidemie die Untersuchung der im Dorf gehaltenen Haustiere durch, worüber wir im folgenden berichten wollen.

Die Gemeinde Ujkigyós ist eine charakteristische landwirtschaftliche Siedlung, wo viele Nutztiere gehalten werden. Die Schweinezucht ist sehr verbreitet, fast auf jedem Bauernhof gibt es 4—5 Schweine; Rinder und Pferde sind zwar in geringerer Zahl, aber ebenfalls beinahe überall vorhanden. Neben diesen Tieren gehört auch der Hofhund zum charakteristischen Bild der Bauernhöfe. Ausser den Tieren der Bauernhöfe untersuchten wir auch den Tierbestand eines Einzelgehöftes, in dessen Nachbarschaft die Drescharbeiten ausgeführt wurden, da sich die Drescharbeiter das Trinkwasser eine Zeitlang — vor Ausbruch der Epidemie — von einem offenen Brunnen dieses Gehöftes holten.

Material und Methoden

Zum Nachweis des Leptospirenbefalls der Haustiere wählten wir die serologische Methode. Im Juni und Juli 1955 untersuchten wir das Blutserum von 223 Haustieren, und zwar 103 Schweinen, 57 Rindern, 38 Pferden und 25 Hunden. Die Blutproben stammten grösstenteils (63,7%) von Tieren in den Bauernhöfen, zu 36,3% von Tieren des Einzelgehöftes. Mit dem Blutserum der Tiere nahmen wir unter Verwendung folgender Leptospirentypen die Agglutination—Lysis—Reaktion vor: *L. sejrő* (Uk) (der die Epidemie verursachende Leptospirentyp), *L. grippo-typhosa*, *L. hebdomadis*, *L. pomona* (TRk), *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. australis-B*, *L. ballum*, *L. mitis* (Johnson), *L. bataviae*. Als Anzeichen der Leptospireninfektion betrachteten wir einen Titer von 1/100 oder darüber.

In Fällen, wo das Serum gleichzeitig mit mehreren Leptospirentypen positive Reaktion gab, bewerteten wir Reaktionen mit niedrigerem Titer, falls es sich um Typen handelte, die miteinander in Antigenverwandtschaft stehen, als Mitagglutination, sonst sahen wir die mehrfachen Reaktionen als Reste einer überstandenen Infektion mit mehreren Typen an.

Ergebnisse

Bei den mit dem Blutserum von 223 Haustieren vorgenommenen Agglutination-Lysis-Reaktionen fanden wir Leptospira-Antikörper in insgesamt 100, d. h. in 44,8% der untersuchten Sera. Die anlässlich der serologischen Untersuchung der einzelnen Tierarten gewonnenen Ergebnisse lassen sich folgendermassen zusammenfassen (Tabelle I).

Von den *Schweinen* waren 45,6% befallen, und zwar 30 der 68 Dorfschweine und 17 der Gehöftschweine. Wie aus Tabelle I ersichtlich, gab ein beträchtlicher Teil der Schweinesera gleichzeitig mit mehreren Leptospirentypen positive Reaktion, woraus hervorgeht, dass Mischinfektionen unter Schweinen nicht selten vorkommen. Prüfen wir die Resultate in der Hinsicht, wie häufig die einzelnen Typen in Erscheinung traten, ergibt sich folgende Reihenfolge: L. pomona-Antikörper waren in 29 Sera nachweisbar, L. mitis-Antikörper in 13 Sera, L. icterohaemorrhagiae-Antikörper in 10 Sera, während L. sejrő (Uk)-Antikörper lediglich in 5 Sera anzutreffen waren. Ausser diesen Typen fanden wir in je 1 Fall L. canicola-, L. bataviae- und L. ballum-Reaktionen. Die Titer der positiven Reaktionen variierten zwischen 1/100 und 1/3200. Hohe Titer fanden wir insbesondere unter den L. pomona- und L. sejrő (Uk)-positiven Sera, während unter den Reaktionen der anderen Typen die L. icterohaemorrhagiae-Titer zumeist niedrig waren.

Was das Alter betrifft, so dominierten 1—2jährige Tiere (56%); ältere wurden nur vereinzelt untersucht. Der Infektionszustand der älteren Tiere lässt sich daher nicht genau beurteilen, während bei den jüngeren festzustellen war, dass bis zum Ende des ersten Lebensjahres bereits etwa 50% eine Leptospireninfektion überstanden hatten.

Die Mehrzahl der untersuchten Schweine waren kastrierte Tiere und Säue, die im grossen ganzen gleichmässig infiziert waren, während sich nur 1 von 3 Ebern als befallen erwies.

Bei der Mehrzahl der seropositiven Tiere waren klinische Symptome nicht zu beobachten, indessen hatten 2 Schweine, deren Blutserum L. pomona

Tabelle 1

Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Haustiere in Ujkígyós

Art der Haustiere	Anzahl der untersuchten Tiere		Negativ		Positiv																Sämtliche positiven Fälle	
					Mit einem Leptospirentyp										Mit mehreren Leptospirentypen							
					L. sejrő (Uk)		L. pomona (TRk)		L. canicola		L. ictero-haem.		L. ballum		L. mitis		L. bataviae		L. sejrő (Uk) + L. pomona (TRk)		L. sejrő (Uk) + L. ict. haem.		L. pom. + L. mitis		L. pom. + L. ictero-haem.		L pomona + L. batav.		Absolute Zahl	Prozentsatz
	absolute Zahl	%	absolute Zahl	%	a. Z.	%	a. Z.	%	a. Z.	%	a. Z.	%	a. Z.	%	a. Z.	%	a. Z.	%	a. Z.	%	a. Z.	%	a. Z.	%	a. Z.	%	a. Z.	%		
Schweine	103	100	56	54,4	2	1,9	17	16,5	1	<1	8	7,8	1	<1	4	3,9	1	<1	2	1,9	1	<1	9	8,7	1	<1			47	45,6
Rinder	57	100	37	65,0	8	14,1	7	12,3					1	1,7					2	3,5	1	1,7					1	1,7	20	35,0
Pferde	38	100	18	47,5	4	10,5	7	18,4			2	5,3	1	2,6	1	2,6			4	10,5					1	2,6			20	52,5
Hunde	25	100	12	48,0	7	28,0	1	4,0	1	4,0	1	4,0							3	12,0									13	52,0

a. Z.=absolute Zahl

mit einem Titer von 1/800 bzw. 1/1600 agglutinierte, 1½ bzw. 2 Monate vor dem Zeitpunkt der Untersuchung eine mit Fieber, Appetitlosigkeit und allgemeiner Mattigkeit einhergehende Erkrankung durchgemacht. In einem anderen Hof wurde bei einem Schwein, welches 2 Wochen vor der Untersuchung abortiert hatte, ebenfalls eine L. pomona-Seroreaktion mit hohem Titer (1/1600) festgestellt. Auch bei 4 anderen, mit dem letzteren im gleichen Gehege befindlichen Schweinen war Leptospireninfektion — ohne klinische Symptome — nachweisbar.

Die Infektion der *Rinder* war von geringstem Ausmass (35%). Von 32 Rindern im Dorf erwiesen sich 12, von 25 Tieren des Gehöftes 8 als befallen. Im Vergleich zu den Schweinen ergaben sich bei den Blutsera der Rinder seltener gemeinsame Reaktionen, woraus auf ein weniger häufiges Vorkommen der Mischinfektionen geschlossen werden kann. Unter den die Infektion hervorrufenden Leptospirentypen kamen L. sejrő (Uk) und L. pomona ungefähr gleich häufig vor : L. sejrő (Uk)-Antikörper fanden wir in 11, L. pomona-Antikörper in 10 Sera, L. ballum-, L. icterohaemorrhagiae- und L. bataviae-Reaktion in je 1 Fall. Bei positiven L. sejrő (Uk)- und L. pomona-Sera sahen wir häufig hohe Titer (bis 1/3200). Die positiven L. sejrő (Uk)-Sera mit hohem Titer ergaben gewöhnlich Mitagglutination mit L. hebdomadis.

Das Alter der Rinder war 2 bis 12 Jahre, die meisten waren 4—8 Jahre alt. Bei Vergleich mit den Schweinen fällt auf, dass die jungen Tiere nicht infiziert waren. Lediglich bei über 4 Jahre alten Tieren war eine Infektion festzustellen. Mit zunehmendem Alter erhöhte sich auch die Anzahl der befallenen Tiere.

Auch unter den Rindern waren verhältnismässig wenige männliche Tiere (49 Kühe, 8 Stiere), von denen sich keines als infiziert erwies. Die Infektionsfreiheit der Bullen hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass diese von anderen Tieren abgesondert im Bullenhaus der Gemeinde untergebracht waren und mit Kühen ausschliesslich beim Bespringen in Berührung kamen, was offenbar vom Gesichtspunkt einer Ausbreitung der Leptospireninfektion praktisch von geringer Bedeutung ist.

Unter den leptospirenbefallenen Tieren sahen wir eine leptospirosisverdächtige Erkrankung lediglich bei einer 5jährigen Kuh. Wie der Besitzer mitteilte, hatte die Erkrankung des Tieres etwa 3 Wochen vor der Untersuchung begonnen ; der Harn war rot, der Milchertrag beträchtlich verringert, das Tier abgemagert, matt und appetitlos. Auf Grund der mit L. sejrő (Uk) gewonnenen Agglutination-Lysis-Reaktion von hohem Titer (1/1600) halten wir es für wahrscheinlich, dass das Auftreten der Symptome die Folge einer Infektion mit diesem Leptospirentyp war.

Die *Pferde* waren am stärksten infiziert (52,6%). Sowohl aus den Bauernhöfen als auch aus dem Gehöft waren 19 Tiere untersucht worden. Von den Dorftieren waren 7, von den Pferden aus dem Gehöft 13 befallen. Gemeinsame Reaktionen beobachteten wir auch bei den Pferdesera. Unter den die Infektion

hervorrufenden Leptospirentypen kam L. pomona am häufigsten vor, Antikörper dieses Typs waren in 12 Blutsera anzutreffen. An zweiter Stelle kam L. sejrő (Uk) vor, mit dem 8 Blutsera positive Reaktion ergaben, während L. icterohaemorrhagiae-Antikörper in 3 Blutsera, L. mitis- und L. ballum-Antikörper nur in je 1 Serum nachgewiesen werden konnten. Es sei erwähnt, dass die Reaktionen mit höchstem Titer bei Pferdesera beobachtet wurden ; auch Titer von 1/25000 waren nicht selten. Die L. sejrő (Uk)-positiven Pferdesera mit hohem Titer ergaben gewöhnlich Mitagglutination mit L. hebdomadis.

Das Alter der untersuchten Pferde war zwischen 1 und 17 Jahren. Ebenso wie bei den Rindern waren eher die älteren Pferde befallen, während bei Tieren unter 3 Jahren eine Infektion nicht festzustellen war. Die anderen Altersgruppen waren ungefähr gleichmässig befallen.

Hengste sind nicht untersucht worden, der untersuchte Bestand setzte sich in beinahe gleicher Anzahl aus Wallachen und Stuten zusammen. Befall fanden wir bei den Tieren beider Gruppen, unter den Wallachen jedoch etwas häufiger als unter den Stuten.

Leptospiroseverdächtige Erkrankungen wurden unter den Pferden nicht beobachtet. Interessanterweise hatten trotz der verhältnismässig starken Verseuchung weder die Tierpfleger noch der am Ort ansässige Tierarzt auf Mondblindheit hinweisende Symptome wahrgenommen.

Die Leptospireninfektion der *Hunde* war annähernd von gleichem Ausmass wie die der Pferde (52%). Die Mehrzahl der untersuchten Hunde (insgesamt 23) bestand aus den Hunden der Bauernhöfe, von denen 12 befallen waren. Aus dem Gehöft wurden nur 2 Hunde untersucht, von denen sich einer ebenfalls als infiziert erwies. Mischinfektion anzeigende gemeinsame Reaktionen waren auch bei den Hundesera zu beobachten. Unter den für die Infektion verantwortlichen Typen stand L. sejrő (Uk) an erster Stelle, indem 10 Sera positive Reaktion gaben. L. pomona-Antikörper kamen in 4 Sera vor, während mit L. canicola und L. icterohaemorrhagiae nur in je 1 Fall positive Reaktion beobachtet werden konnte.

Nahezu zwei Drittel der untersuchten Hunde waren weniger als 4 Jahre alt, die übrigen hatten ein Alter von 4—12 Jahren. Infizierte Tiere waren unter den jüngeren und älteren in ungefähr gleicher Anzahl anzutreffen. Hohe Titer ergaben eher die Sera der jungen Hunde, und zwar beobachteten wir den höchsten Titer im Serum des jüngsten (halbjährigen) Hundes (L. sejrő (Uk), 1/3200).

Die meisten infizierten Tiere waren Hündinnen (von 13 waren 9 befallen) ; von 7 männlichen erwiesen sich 2 und von 5 kastrierten ebenfalls 2 als infiziert. Diese Verteilung der Ansteckung zu »Gunsten« der Weibchen steht im Gegensatz zu den Beobachtungen, die man in bezug auf das Verhältnis der Canicola-Infektion von Hunden nach Geschlechtern gewonnen hat. Zumeist war nämlich festgestellt worden, dass die Infektion unter männlichen Hunden häufiger

vorkommt, weil diese mit Vorliebe den Urin und die Genitalien der anderen Tiere beschnüffeln und sich daher leichter anstecken.

Unter Hunden kamen Erkrankungen während der Untersuchungsdauer nicht vor.

Besprechung

Aus den Untersuchungsergebnissen geht hervor, dass die Leptospireninfektion unter den Haustieren in Ujkigyós ausgedehnt vorkommt und dass diese von verschiedenen Leptospirentypen hervorgerufen wird. Die Bedeutung der einzelnen Typen lässt sich unter besonderer Berücksichtigung des *L. sejrő* folgendermassen zusammenfassen:

Der durchschnittliche *L. sejrő* (Uk)-Befall der Haustiere war 15,2%. Dieser Wert ist erheblich höher als die anlässlich früherer Untersuchungen bei dortigen Nagetieren beobachtete (0,7%ige) durchschnittliche Ansteckung. Bei der Untersuchung des L. sejrő (Uk)-Befalls nach Tierarten (Tabelle II)

Tabelle II

Die Infektion der in Ujkigyós untersuchten verschiedenen Tierarten mit L. sejrő (Uk)

Tierart	Anzahl der untersuchten Tiere	*L. sejrő*-Befall	
		absolute Zahl	%
Feldmaus *(Microtus arvalis)*	243	—	—
Spitzmaus *(Mus spicilegus)*	55	—	—
Waldmaus *(Apodemus sylvaticus)*	37	3	8,1
Ziesel *(Citellus citellus)*	65	—	—
Hund	25	10	40
Schwein	103	5	4,8
Rind	57	11	19,3
Pferd	38	8	21

sehen wir, dass sich bei den Nagetieren die L. sejrő (Uk)-Verseuchung nur auf eine einzige Art, die Waldmäuse, beschränkt, während sie bei den Haustieren unter sämtlichen untersuchten Arten vorkommt. Zahlenmässig stehen an erster

Stelle die Hunde, hiernach folgen die Pferde und Rinder, während die Verseuchung der Waldmäuse erheblich niedriger ist, jedoch grösser als die der Schweine. Vom Gesichtspunkt der Entstehungsbedingungen der menschlichen Epidemie in Ujkigyós zeugen diese Angaben für die infektionsverbreitende Rolle der Haustiere, um so mehr, als die befallenen Nagetiere nicht am Schauplatz der Seuche, sondern auf den Äckern der Umgebung anzutreffen waren. Die Frage, welche Haustierart die Quelle der Infektion bildete, lässt sich nicht entscheiden, da die Exposition sämtlichen untersuchten Haustierarten gegenüber bestand.

Von Haustieren war bisher weniger bekannt, dass sie menschliche L. sejrő-Infektionen verbreiten können. Als Quelle derartiger menschlicher Ansteckungen erwähnen die meisten Autoren die Nagetiere. So misst auch GSELL [3] im Zustandekommen der seinerseits mitgeteilten L. sejrő-Infektionen den Nagetieren Bedeutung bei, obwohl in einem beträchtlichen Teil der Fälle der Beruf der Kranken (Schweinemetzger, Käser, Schweinezüchter) im Hinblick auf den Kontakt mit Schweinen den Verdacht auf die infektionsverbreitende Rolle dieser Tiere gelenkt hatte. Diese Infektionsart hält jedoch GSELL für unwahrscheinlich, weil die Ansteckung von Schweinen mit L. sejrő nirgends nachgewiesen werden konnte. Einzelne Autoren hatten L. sejrő-Antikörper in den Blutsera von Pferden, Rindern und Hunden gefunden, erwähnen aber nichts über die Bedeutung dieser Tiere in der Verbreitung der menschlichen L. sejrő-Infektion. BORG PETERSEN [4] fand in Dänemark unter 128 Kuhsera eines positiv, welches L. sejrő mit einem Titer von 1/300, L. saxkoebing mit 1/100 agglutinierte; von 39 Pferdesera gaben zwei gleich starke Reaktion mit L. sejrő und L. saxkoebing. KATHE [5] fand 1943 unter den Sera von 162 gesunden Pferden 11 L. sejrő-positiv. HEUSSER und Mitarbeiter [6] beobachteten bei der Untersuchung von mehreren hundert Pferdesera gleichfalls in einigen Fällen L. sejrő-Seropositivität. WIESMANN [7] hatte 1947 aus der Ostschweiz stammende 200 Rindersera untersucht, von denen 68 auf L. sejrő mit hohem Titer unter gleichzeitiger Mitagglutination mit L. saxkoebing reagierten. WICKERHAUSER [8] fand in Bern bei der Untersuchung von 300 Kuhsera zu 16,6% L. sejrő-Antikörper. SCHLOSSBERGER und KREUZ [9] beobachteten in den Jahren 1950—53 unter 75 Pferdesera in 9, unter 1182 Hundesera in 5 Fällen L. sejrő-Positivität.

Bei der serologischen Untersuchung der Rinder hatte man bisher L. sejrő-Antikörper nur in den Blutsera gesunder Tiere angetroffen. Im Gegensatz zu diesen Erfahrungen wurde in Ujkigyós bei einem L. sejrő-positiven Rind Hämoglobinurie beobachtet; auf Grund des hohen Titers kann daher als wahrscheinlich angenommen werden, dass die Erkrankung eine Folge der L. sejrő-Ansteckung war. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass dieses Krankheitsbild auch in Europa von Leptospirentypen der Hebdomadisgruppe hervorgerufen werden kann, wie dies in Japan bereits früher festgestellt wurde [10].

L. pomona-Infektion konnte gleichfalls bei allen vier Tierarten nachgewiesen werden, und zwar bei Pferden und Schweinen ungefähr im gleichen Ausmass, etwas seltener unter Rindern und ganz selten bei Hunden. Das Vorkommen von L. pomona bei Schweinen war in den 1940er Jahren nachgewiesen worden (GSELL und RIMPAU, COLLIER, TERSKICH, SAVINO und RENNELLA [3]). Die ersten Beobachtungen von GSELL und RIMPAU [11] konnten in fast sämtlichen Staaten Europas bestätigt werden. Auch unsere vereinzelten Schweineuntersuchungen in den Jahren 1953—54 ergaben, dass dort, wo menschliche L. pomona-Ansteckungen vorkamen, L. pomona-Verseuchung unter den Schweinen auch in Ungarn vorzufinden war [12]. Auf den Umstand, dass die L. pomona-Ansteckung im Zustandekommen der Schweineaborte auch in Ungarn eine Rolle spielt, war die Aufmerksamkeit von CSONTOS, ROMVÁRY und KEMENES [13] anlässlich einer in einem brucellafreien Bestand aufgetretenen Leptospiroseepidemie im Jahre 1955 gelenkt worden.

Auch in den Blutsera von Pferden haben mehrere Autoren L. pomona-Antikörper gefunden, in Europa vor allem im Zusammenhang mit der Untersuchung der Mondblindheit von Pferden [3, 14, 6, 15, 16, 17, 9]. In Ungarn hatten KASZA und KEMENES [18] bei Pferden L. pomona-Seropositivität festgestellt. — Heute ist bereits als allgemein anerkannt zu betrachten, dass L. pomona ein häufiger Krankheitserreger der Rinder-Leptospirose ist [19]. In Ungarn wurden die ersten Fälle von KELEN [20] im Jahre 1952 beobachtet; der von ihm aus Kälbern isolierte Leptospirenstamm erwies sich später als L. pomona [12]. Auch die von KEMENES [21] 1953—54 anlässlich der in anderen Landesgebieten vorgekommenen Seuchen aus Rindern isolierten Stämme, von denen einer durch KMETY [22] erst als Australis-B identifiziert worden war, sind als L. pomona-Stämme zu betrachten. Wie aus den Untersuchungen von KASZA und KEMENES [18] hervorgeht, ist L. pomona-Seropositivität bei ungarischen Rindern nicht selten.

Die L. pomona-Verseuchung von Hunden wurde zuerst von MOCHTAR und COLLIER [23, 24] in Batavia nachgewiesen; diese Autoren vermochten diesen Leptospirentyp 1939 aus der Niere eines Strassenhundes erfolgreich zu züchten. Die europäischen Autoren stellten den L. pomona-Befall der ihrerseits untersuchten Hunde zumeist als gering fest. BABUDIERI und CASTAGNOLI [25] fanden in Rom unter 159 Hundesera eines pomona-positiv. STEIGNER [26] fand 1949—50 in Hannover von 290 Hundesera nur in 2, SCHLOSSBERGER und KREUZ [9] unter den Blutsera von 1182 Hunden aus Frankfurt a. M. und Umgebung insgesamt nur in 4 Fällen L. pomona-Antikörper. In Nordungarn hatten wir die L. pomona-Verseuchung der Hunde bereits früher untersucht, doch erwies sich die Ansteckung der untersuchten Dorfhunde als relativ gering [27].

L. mitis-Reaktionen hatten wir bei Schweinesera und einem Pferdeserum beobachtet. Dieser Leptospirentyp dürfte unter den Schweinen in Ujkigyós erheblich seltener vorkommen als L. pomona. Über das Auftreten von L. mitis

in der Tierwelt hatte als erster JOHNSON [28] berichtet, der diesen Typ aus Schweineniere zu isolieren vermochte, aber L. mitis-Agglutinine in Kälberserum auch schon vorher angetroffen hatte. In Europa erwähnten zuerst GSELL und WIESMANN [29], dass sie im Tierbestand von Personen, die eine L. mitis-Infektion überstanden hatten, L. mitis-seropositive Schweine fanden. Positive Agglutinationen mit L. mitis wurden unter Schweinen seither auch in mehreren anderen europäischen Ländern festgestellt [30, 31, 32, 9]. Über die L. mitis-Infektion unter Pferden fanden wir in der Literatur nur wenige Angaben. L. mitis-Reaktionen bei der Untersuchung von Pferden wurden in Europa von CHEMNITZ [33], in Australien von WELLINGTON und Mitarbeitern [34] wahrgenommen.

L. icterohaemorrhagiae-Reaktionen beobachteten wir verhältnismässig selten und zumeist mit niedrigem Titer bei den Sera von Schweinen, Pferden und Hunden. L. icterohaemorrhagiae kommt in Ratten häufig vor, doch ist seit langem bekannt, dass dieser Typ gelegentlich auch in Haustieren anzutreffen ist. Bei Hunden wurde diese Infektion beinahe überall festgestellt, meistens jedoch in niedrigerem Prozentsatz als die Ansteckung mit L. canicola [3]. Im Hinblick auf die engen Beziehungen der Schweine und Ratten hatte UHLENHUTH [35] bereits 1916 Untersuchungen über das Vorkommen von L. icterohaemorrhagiae unter Schweinen in Angriff genommen, doch vermochte er diesen Leptospirentyp aus der Niere und dem Blut der gesunden Schweine niemals nachzuweisen. Eine durch L. icterohaemorrhagiae verursachte mit Gelbsucht einhergehende Schweineerkrankung beobachteten KLARENBEEK und WINSSER [36] 1937 in Holland. Seither ist die Verseuchung mit L. icterohaemorrhagiae in den Schweinebeständen verschiedener Länder nachgewiesen worden [37, 38, 30, 31, 32, 9]. In Pferden wurden gleichfalls L. icterohaemorrhagiae-Antikörper gefunden, so von KATHE [5], HEUSSER und Mitarbeitern [6], DYMOWSKA [31], SCHLOSSBERGER und KREUZ [9].

Auffallend ist die spärliche Zahl der *L. canicola*-Reaktionen, die nur in 2 Fällen, bei einem Hunde- und einem Schweineserum, beobachtet wurden. Die Seltenheit des L. canicola-Befalls unter den untersuchten Hunden ist auch deshalb von Interesse, weil die Hunde im nordwestlichen Teil des Landes in hohem Prozentsatz mit diesem Leptospirentyp infiziert sind [27]. Die mit Schweineserum gewonnene L. canicola-Reaktion bestätigt unsere frühere Beobachtung, wonach in Ungarn auch die Schweine als Reservoir dieses Typs in Frage kommen [27]. Die L. canicola-Verseuchung von Schweinen wurde in den letzten Jahren von mehreren Autoren nachgewiesen. KINDLER und SCHINDLER [37] fanden Canicola-Positivität bei der serologischen Untersuchung von 195 Schweinen in einem Fall. WILLIAMS und Mitarbeiter [39] bestätigten die Canicolaentleerung bei Schweinen in den USA und vermochten den Krankheitserreger aus Schweineniere zu isolieren. VAN DER HOEDEN [40] beschrieb in Israel eine Canicola-Infektion in zwei Sauherden.

Mit *L. ballum* fanden wir bei 3 Tierarten (Schwein, Pferd, Rind) in je 1 Fall positive Seroreaktion. Dieses Resultat ist neuartig, da L. ballum bisher in Nagetieren angetroffen wurde [41]. Bei Haustieren wurden L. ballum-Antikörper lediglich im Rinder- [42] und Schweineserum [9] selten gefunden. Bei der Bewertung dieser Reaktionen muss man indessen sehr vorsichtig sein, da wir anlässlich unserer Nagetieruntersuchungen L. ballum weder am hier besprochenen Ort noch in anderen Gebieten des Landes angetroffen haben und auch menschliche Erkrankungen dieses Typs in Ungarn bisher nicht beobachtet wurden. Aus den vorliegenden Resultaten können wir daher lediglich den Schluss ziehen, dass die Infektion dieser Tiere entweder von L. ballum oder von einem mit diesem verwandten Leptospirentyp verursacht wurde. Diese Frage wird sich erst auf Grund weiterer Erfahrungen entscheiden lassen.

L. bataviae wurde von einem Schweine- und einem Rinderserum agglutiniert. L. bataviae-Befall von Rindern ist bisher nicht beobachtet worden, während in den Blutsera von Schweinen Gsell und Rimpau [11] in der Schweiz, Kolochine und Collombier [43] in Frankreich und Babudieri [32] in Italien positive Reaktionen mit diesem Leptospirentyp fanden. Bei unseren Nagetieruntersuchungen haben wir L. bataviae bisher nicht angetroffen, indessen konnte das Vorkommen einzelner menschlicher L. bataviae-Fälle in Ungarn serologisch bestätigt werden [44].

Interesse verdienen die *Mischinfektionen*, bei denen das gemeinsame Vorkommen von L. sejrő (Uk) und L. pomona am häufigsten beobachtet werden kann. Mit diesen beiden Leptospirentypen infizierte Tiere waren unter sämtlichen untersuchten Arten festzustellen, während sich das seltenere Vorkommen der anderen Typen auch darin äusserte, dass sie Mischinfektionen entweder überhaupt nicht oder nur in geringer Zahl verursachten.

Es ist interessant, dass wir unter den zahlreichen Haustieren nicht ein einziges mit L. grippotyphosa infiziertes angetroffen haben. Diese Beobachtung lässt sich mit der gleichen Wahrnehmung anlässlich unserer Untersuchungen an den Nagetieren der Gegend in Zusammenhang bringen.

Endlich sei die gebietsmässige Aufteilung des Befalls kurz besprochen. Infizierte Tiere kamen in der Mehrzahl der Bauernhöfe und auch im Einzelgehöft vor. In bezug auf das Ausmass des Befalls der verschiedenen Arten im Dorf und im Einzelgehöft bestand kein wesentlicher Unterschied, mit Ausnahme der Pferde, bei denen die Infektion im Einzelgehöft erheblich häufiger vorkam als im Dorf. Die Infektionsverhältnisse der Tierbestände in den verschiedenen Höfen lassen sich folgendermassen charakterisieren. In einzelnen Höfen, vor allem in jenen, wo nur wenige Tiere gehalten wurden, war jeweils nur eine Tierart infiziert, während in anderen Höfen sich auch mehrere Tierarten als befallen erwiesen. Auffallenderweise waren nur wenige Höfe zu finden, wo die Infektion der verschiedenen Tierarten nur durch einen einzigen Leptospirentyp verursacht wurde. Ein derartiger Hof war z. B. der auf Abb. 1 dar-

gestellte, mit *a)* bezeichnete, wo Schweine und Hunde nur mit L. sejrő (Uk) infiziert waren. In den meisten Höfen war die Infektion der verschiedenen Tierarten, oft aber auch die der gleichen Arten, durch verschiedene Typen verursacht. So fanden wir z. B. in dem mit *b)* bezeichneten Hof bei den Schweinen und beim Hund L. pomona, bei den Rindern und Pferden L. sejrő (Uk). Der Umstand, dass auch in Beständen mit nur wenigen Tieren Infektion mit ver-

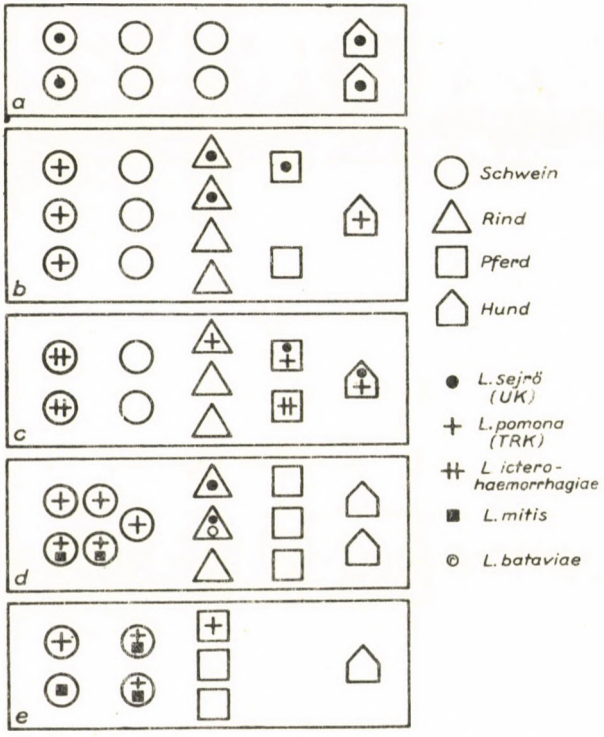


Abb. 1. Der Infektionszustand des Tierbestandes in fünf Bauernhöfen

schiedenen Leptospirentypen vorkam, hatte es ermöglicht, dass sich einzelne Tiere mit mehreren Typen infizierten. Ein Beispiel hierfür ist der mit *c)* bezeichnete Hof, wo die Hälfte der Schweine und ein Pferd mit L. icterohaemorrhagiae, ein Rind mit L. pomona, das andere Pferd und der Hund mit L. pomona und L. sejrő (Uk) infiziert waren.

Interessanterweise haben selbst die häufig vorkommenden Leptospirentypen in den Beständen der einzelnen Höfe nur selten Massenbefall hervorgerufen. Die Infektion mit L. sejrő (Uk) war z. B. beinahe in jedem Hof vorzufinden, meistens aber nur in 1—2 Tieren. Unter den Schweinen konnten wir jedoch an einigen Stellen, wo die Tiere täglich auf die gemeinsame Weide geführt wurden, das gehäufte Vorkommen des L. pomona- und L. mitis-Befalls

beobachten. So waren z. B. sämtliche Schweine der Höfe *d)* und *e)* teils mit L. pomona, teils mit L. mitis, teils mit beiden Leptospirentypen infiziert.

Abschliessend können wir feststellen, dass zwar die in Ujkigyós vorhandenen Tierarten mit verschiedenen Leptospirentypen infiziert waren, unter diesen aber häufigst L. sejrő (Uk) vorkam, so dass es nicht als Zufall bezeichnet werden kann, dass die menschliche Epidemie von diesem Typ hervorgerufen war. Aus den Untersuchungsergebnissen kann gleichzeitig der Schluss gezogen werden, dass man sich bei der Klärung der Infektionsquellen menschlicher Leptospirosen nicht mit orientierenden Untersuchungen lediglich einiger Tierarten begnügen darf, sondern durch epidemiologische Umweltuntersuchungen unbedingt sämtliche in Frage kommenden Reservoire systematisch prüfen muss.

Zusammenfassung

In der südostungarischen Gemeinde Ujkigyós wurden zur Klärung der näheren Umstände einer 1952 aufgetretenen menschlichen Leptospiroseepidemie unter den Haustieren Untersuchungen vorgenommen. Auf Grund der serologischen Untersuchung von 103 Schweinen, 57 Rindern, 38 Pferden und 25 Hunden konnte bei 100 Tieren, d. h. 45% aller untersuchten Tiere Leptospireninfektion nachgewiesen werden. Die Ansteckung der Haustiere war durch verschiedene Leptospirentypen verursacht, unter denen auch der die erwähnte menschliche Epidemie hervorrufende *L. sejrő* (Uk) angetroffen werden konnte. Neben dem 15,2%igen durchschnittlichen *L. sejrő* (Uk)-Befall der Haustiere wies die Infektion der untersuchten Arten folgende Reihenfolge auf:

Hunde 40%; Pferde 21%; Rinder 19%; Schweine 5%. Es wird eingehend erörtert, dass bei der Verbreitung der L. sejrő-Infektion den Haustieren die grösste Rolle zukommt.

Unter den anderen Leptospirentypen kam *L. pomona*, die gleichfalls in sämtlichen untersuchten Arten vorzufinden war, am häufigsten vor, während der Befall mit *L. mitis*, *L. icterohaemorrhagiae* und *L. canicola* seltener anzutreffen war und sich meist nur auf 1—2 Tierarten beschränkte. In den untersuchten Beständen konnten auch Leptospirentypen nachgewiesen werden, die in Ungarn menschliche Infektionen bisher nur sehr selten verursacht haben *(L. bataviae)* oder bei menschlichen Krankheitsbildern noch nicht festgestellt werden konnten (*L. ballum* oder ein mit diesem verwandter Leptospirentyp).

Unter sämtlichen untersuchten Arten gab es Tiere, die gleichzeitig mit mehreren Leptospirentypen infiziert waren.

LITERATUR

1. Fejér, I., Füzi, M., Alföldy, Z., Kiszel, J.: Orv. Hetil., **24**, 665 (1954).
2. Kiszel, J., Alföldy, Z., Füzi, M.: Acta Microbiol. Hung. **4**, 167 (1957).
3. Gsell, O.: Leptospirosen. Bern, 1952.
4. Borg Petersen, C.: Acta path. microbiol. Scand., **21**, 165 (1944).
5. Kathe, J.: Ztschr. Immunforsch. **103**, 60 (1943).
6. Heusser, H., Gsell, O., Kanter, U. und Wiesmann, E.: Schweiz. Med. Wschr., 756 (1948).
7. Wiesmann, E.: Ztschr. Hyg., **130**, 80 (1949).
8. Wickerhauser, T.: Schweiz. Ztschr. allg. Path. u. Bakt., **14**, 1 (1951).
9. Schlossberger, H. und Kreuz, G.: Ztschr. Hyg. **140**, 433 (1954).
10. Yamamoto: Bull. Off. Int. Ep., **36**, 421 (1951).
11. Gsell, O. und Rimpau, W.: Münch. Med. Wschr., **91**, 117 (1944).
12. Füzi, M., Alföldy, Z., Kiszel, J.: Katonaorvosi Szemle. **8**, 933 (1956).
13. Csontos, J., Kemenes, F. u. Romváry, J.: Magyar Állatorvosok Lapja, **9**, 303 (1955).
14. Savino, E. u. Rennella, E.: Dia Medico, **18**, 20 (1946).
15. Gochenour, W., S. Yager, R. H. u. Wetmore, P. W.: Proc. Soc. Exp. Biol., **74**, 199 (1950).

16. KATHE, J., ENGELHARDT, K. u. GREVE, O.: Zbl. Bakt. Orig., **158,** 333 (1952).
17. KRAPF, W. u. BRUNNER, K. T.: Schweiz. Arch. Tierheilk., **95,** 255 (1953).
18. KASZA, L. u. KEMENES, F.: Magyar Állatorvosok Lapja, **11,** 1 (1955).
19. VAN DER HOEDEN, J.: La leptospirose bovine. Office international des Epizooties. Rapport à la XIXe session (R. n^{0} 205, 1, 1951).
20. KELEN, A.: Acta Vet. Acad. Scient. Hung., **2,** 289 (1952).
21. KEMENES, F.: Magyar Állatorvosok Lapja, **5,** 1 (1955).
22. KMETY, E.: Zbl. Bakt. Orig., **163,** 398 (1955).
23. MOCHTAR, A. u. COLLIER, W. A.: Ned. Ind. Blad Diergeneesk., **51,** 339 (1939).
24. COLLIER, W. A.: Schweiz. Med. Wschr., 508 (1948).
25. BABUDIERI, B. e CASTAGNOLI, B.: Ann. Igiene, 145 (1940).
26. STEIGNER, K. FR.: Zbl. Bakt. Orig., **156,** 216 (1950).
27. FÜZI, M. u. KISZEL, J.: Honvédorvos. **9,** 231 (1957).
28. JOHNSON, D. W.: Med. J. Austral., 724 (1950).
29. GSELL, O. u. WIESMANN, E.: Schweiz. Med. Wschr., 503 (1948).
30. VAN RIEL, J.: Bull. Acad. Med. Belg., 368 (1952).
31. DYMOWSKA, Z., KOZLOWSKA, D., WLODEK, Z.: Przeglad. Epidem., **2,** 119 (1953).
32. BABUDIERI, B. e FIORENTINO, M.: R. C. Ist. Sup. Sanita, **17,** 59 (1954).
33. CHEMNITZ, H.: Ztschr. Immunforsch., **110,** 395 (1953).
34. WELLINGTON, N. A. M., FERRIS, A. A. u. STEVENSON, W. J.: Aust. Vet. J., **29,** 212 (1953).
35. KOLLE, W., KRAUS, R., UHLENHUTH, P.: Handbuch der Pathologischen Mikroorganismen 3. Aufl. Springer, J. Berlin **7,** 487 (1930).
36. KLARENBEEK, A. u. WINSSER, J.: Dtsch. Tierärztl. Wschr., 434 (1937).
37. KINDLER, M. u. SCHINDLER, R.: Monatsschr. prakt. Tierheilk., 14 (1950).
38. NISBET, D. I.: J. comp. Path. Ther., **61,** 155 (1951).
39. WILLIAMS u. Mitarbeiter: s. YAGER, R. H.: Symposium on the leptospira. Med. Sci. Public. Washington (1952).
40. VAN DER HOEDEN, J.: J. Infect. Dis., **33,** 98 (1956).
41. BORG PETERSEN, C.: Acta path. microbiol. Scand., **21,** 504 (1944).
42. WOLFF, J. W. u. BOHLANDER, H.: Docum Med. geograph. trop., **4,** 3 (1952).
43. KOLOCHINE-ERBER, B. et COLLOMBIER, M.: Ann. Inst. Pasteur, **79,** 370 (1950).
44. Erscheint demnächst.

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER PSEUDOMONAS PYOCYANEA-BAKTERIOPHAGEN

Von

B. Lovas, D. M. Egyessy und L. Alföldi

Elektronenmikroskopische Abteilung des Instituts für Messtechnik und Instrumentenwesen der Ungarischen Akademie der Wissenschaften und Mikrobiologisches Institut der Medizinischen Universität, Szeged

(Eingegangen am 23. September 1956)

Die vorangegangene Mitteilung hatte sich mit der Isolierung und biologischen Charakterisierung von drei neuen Bakteriophagen der Pseudomonas pyocyanea befasst [1]. Bei den im Interesse ihrer morphologischen Kennzeichnung vorgenommenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen handelte es sich um unsere erste einschlägige Arbeit, die gleichzeitig auch Gelegenheit bot, die verschiedenen präparativen Verfahren kennenzulernen. Die Bedeutung der präparativen Verfahren bei der Untersuchung von Phagen muss um so mehr betont werden, weil wir bei den im folgenden zu beschreibenden drei neuen Bakteriophagen und seither auch bei anderen Bakteriophagen feststellen konnten, dass je nach den Züchtungsansprüchen der Wirtszelle und des Phagstammes unterschiedliche elektronenmikroskopische präparative Verfahren zum Ziel führen. Bei den Untersuchungen wandten wir ausser dem allgemein benutzten Tropfverfahren bei der Präparation der Bakteriophagen auch die Abklatsch- und die Abziehtechnik an. Bei unseren Untersuchungen verwendeten wir unabhängig von den Angaben der 1953 erschienenen Abhandlungen von Raettig [2, 3] das die topographischen Verhältnisse besser als jede andere Methode bewahrende Filmbewuchsverfahren, dessen Ausbreitungsprobleme wir mit dem Zerstäubungsverfahren zu lösen vermochten.

Material und Methoden

1. *Bakterien:* Der mit 3 R bezeichnete *Pseudomonas pyocyanea*-Stamm des Mikrobiologischen Instituts der Medizinischen Universität Szeged wurde während der Untersuchungen durch 24stündige Überimpfungen aufrechterhalten. Für die Phaginfektion verwendeten wir stets 12—16stündige Kulturen, die von der Oberfläche des Schrägagars mit physiologischer Kochsalzlösung abgewaschen wurden. Die Bakteriensuspension wurde auf eine Bakterienzahl von 10^8/ml verdünnt. Die infizierten Bakterien wurden grösstenteils auf einfachem Bouillon-Agar, bei Anwendung des Phagstammes F_3 auf Laktatnährboden inkubiert.
2. *Phagstämme:* Die Stämme F_1 und F_3 erhielten wir in Phiolen ebenfalls vom obigen Institut, während der Stamm F_2, da dieser unseren Untersuchungszwecken am besten entsprach, auch auf der Elektronenmikroskopischen Abteilung kontinuierlich gezüchtet wurde. Die Bouillonkulturen wurden von den Nährbodenkomponenten durch Zentrifugieren gereinigt. Zur Infektion benutzten wir Phagsuspensionen mit einer Partikelchenzahl von 10^8—10^9/ml.
3. *Präparative Verfahren:* Zu Beginn der Untersuchungen arbeiteten wir nach dem einfachen Tropfverfahren; nach Infektion der Bouillonkultur wurde das Untersuchungsmaterial in Intervallen von 5 Minuten auf die Kollodiummembran präpariert. Neben seiner Selektivität

war der grösste Fehler dieses Verfahrens, dass die Präparate vom Bouillonnährboden ausserordentlich stark verunreinigt wurden, weshalb wir auf Grund der Mitteilung von KELLENBERGER [4, 5] daran dachten, zwecks Vermeidung des nachträglichen Waschens und in der Hoffnung auf bessere topographische Ergebnisse die Filmbewuchsmethode auch zur Phagpräparation zu verwenden. Unsere Wahl fiel deshalb auf das KELLENBERGERsche Verfahren und nicht auf die ursprüngliche Methode von HILLIER, KNAYSI und BAKER [6] *(HKB)*, weil letztere eine viel dickere Kollodiummembran vorschreibt, die möglicherweise auf die Ernährung der Bakterien und daher auf den ganzen Versuch ungünstigen Einfluss ausüben könnte. Später teilten RAETTIG [2, 3] und auch KELLENBERGER [7] mit, dass das Filmbewuchsverfahren für Phagpräparationszwecke vorteilhaft sei.

Bei der Filmbewuchspräparation arbeiteten wir auf 2% Agar enthaltendem Nährboden, auf dem die Membran mit in 0,2%igem Amylazetat gelöstem Kollodium hergestellt wurde. Anfangs versuchten wir die Ausbreitung der ursprünglichen Beschreibung entsprechend nach Auftröpfeln des Materials mit dem Glasstäbchen herbeizuführen; im Hinblick auf die häufigen Membranrisse und die ungleichmässige Ausbreitung des Materials modifizierten wir jedoch das Verfahren [8] und zerstäubten die von der Oberfläche des Schrägagars abgewaschene und mit dem entsprechenden Phagstamm zusammengebrachte Bakteriensuspension in einem geeigneten Apparat auf die Membranoberfläche. Auf eine derartige KELLENBERGERsche Platte (K-Platte) wurden auch die reinen Phagsuspensionen zerstäubt bzw. bei Messung des F_3-Phagen mit Polystyrol latex vermischt, weil auf diese Weise das nachträgliche Waschen vermieden und auch das Latex weniger aggregiert wurde als während der Eintrocknung des Präparates beim einfachen Tropfverfahren.

Beim Abziehverfahren benutzten wir gleichfalls 0,2%iges Kollodium. Einen guten Film vermochten wir zu gewinnen, wenn wir die Platte noch vor dem Begiessen mit Kollodium, bei offenem Deckel 20—30 Minuten im Thermostaten trocknen liessen. Die Abklatschpräparate wurden mit dem nach der Beschreibung von GRÜN und TISCHER [9, 10] zusammengesetzten Apparat hergestellt. Im übrigen haben wir bei Pseudomonas pyocyanea während der Anwendung des Filmbewuchsverfahrens keinerlei auf Ernährungsstörungen hinweisende Anzeichen beobachtet, wie sie von HENNESSEN, GRÜN und LINDNER [11] im Zusammenhang mit einzelnen Bakterien erwähnt wurden.

Die Präparate wurden ausnahmslos mit Formalin fixiert und nach Goldbedampfung im TTC-Elektronenmikroskop bei 40 kV Spannung untersucht.

Ergebnisse

1. *Bakterienveränderungen und Lysisprodukte.* Die erste Frage war in unseren Versuchen, wie sich die Bakterien unter den Bedingungen des Filmbewuchsverfahrens verhalten. Wir stellten fest, dass sie sich trotz der ungewöhnlichen Ernährungsverhältnisse rasch vermehrten, und da wir die Bakterien auf der Membran stets in logarithmischer Phase ausbreiteten, erhielten wir nach 2—3 Stunden bereits aus 30—50 Individuen bestehende Siedlungen. Die Bakterien waren 2—3 μ lang und 0,5 μ breit. Gewöhnlich fanden wir an der intakten Bakterie eine polare Geissel, welche etwa 5 μ lang und ungefähr 300 Å breit war (Abb. 1).

Bereits 15 Minuten nach der Phaginfektion konstatierten wir, dass die Bakterien anschwellen (Abb. 4, 5, 9). In einem Teil dieser Bakterien entstehen grobe, grosse Klümpchen (Abb. 2, 7, 13), während diese Klümpchenbildung in anderen Fällen nicht beobachtet werden kann, sondern sich die Bakterie auflockert und an ihrer Stelle charakteristische scheibenförmige Gebilde zurückbleiben (Abb. 6, 8, 12). Derartige Scheiben wurden bereits in einer Mitteilung erwähnt [12], die sich jedoch ebenfalls mit Pseudomonas pyocyanea-Phagen befasst. Die Grösse der Scheiben variiert zwischen 50 mμ und 0,5 μ, doch

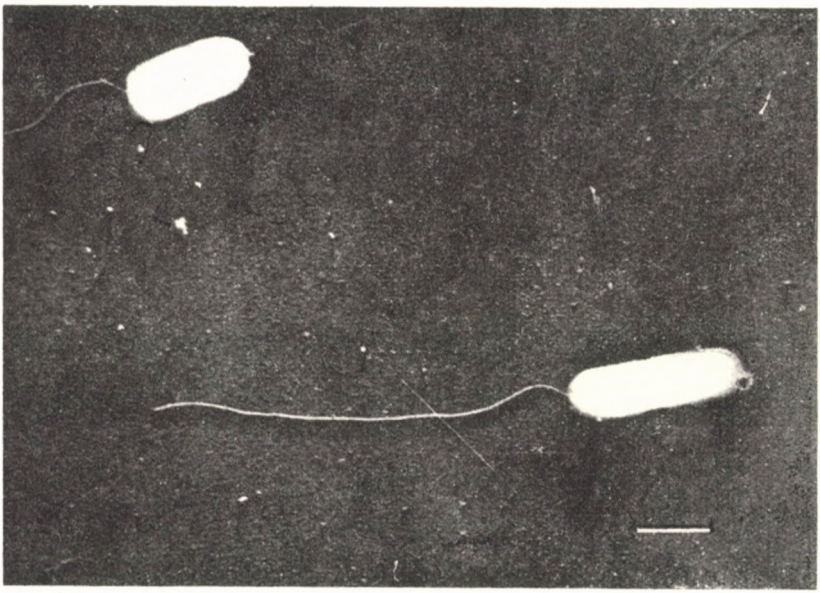


Abb. 1. Intakte Pseudomas pyocyanea aus einer auf K-Platte zerstäubten Bouillonkultur
9800×

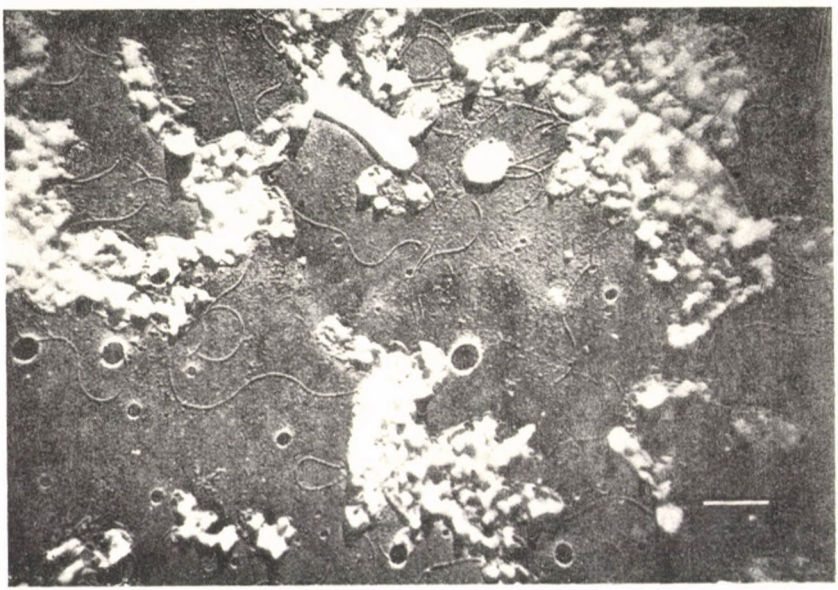


Abb. 2. Mit F_3-Phagen infizierte, auf K-Platte zerstäubte Bakterien. Die Bakterien sind von einer klümpchenartigen Erscheinung infolge fortgeschrittener Lysis
9000×

sind sie an der Stelle eines zerfallenen Bakteriums sehr häufig von annähernd gleicher Grösse (Abb. 3). Die grösseren Scheiben sind von charakteristischer Diskusform, an den kleineren ist eine nabelartige Einbuchtung zu sehen. Wahrscheinlich handelt es sich um zystenartige, an der Kollodiummembran abgeflachte Gebilde, deren Rolle noch unbekannt ist.

Ein anderes bezeichnendes Lösungsprodukt ist ein auf den Aufnahmen regelmässig wahrnehmbares, sehr dünnes (120 Å), aber auch mehrere μ Länge erreichendes fadenartiges Gebilde. Dieses war in den phagfreien Kontroll-



Abb. 3. Scheibenförmige Gebilde nach der Lysis von mit F_1-Phagen infizierten, auf K-Platte zerstäubten Bakterien. Der Pfeil zeigt auf Phagpartikelchen. 9400×

präparaten nur sehr selten und vereinzelt, jedoch nach der Lysis in grosser Zahl zu sehen. Diese Fäden fanden wir auch in dem in Phiolen aufbewahrten filtrierten Material. Das oft gerade verlaufende oder in scharfem Winkel gebrochene Gebilde ist erheblich dünner als die Geissel und im Hinblick auf die im folgenden beschriebene Phagadsorptionserscheinung besonders interessant (Abb. 4, 5, 6, 12, 13). Ähnliche Gebilde wurden von WEIBULL und HEDWALL [13] als bei der Bakteriendesintegration entstehende Proteuszellfraktionen erwähnt, während HOUWINK und VAN ITERSON [14] ähnliche Fäden in Escherichia coli-Kulturen fanden.

2. *Bakteriophagen.* Den Ergebnissen der biologischen Untersuchungen entsprechend, bei denen alle drei Phagen (F_1, F_2 und F_3) als selbständige Pyocyaneus-Spezies nachgewiesen wurden, konnten auch bei den elektronenmikro-

skopischen Untersuchungen zwischen den drei Phagen Unterschiede festgestellt werden. Alle drei Phagen gehören zur Gruppe der kugelförmigen, schwanzlosen Phagen, sind aber von unterschiedlicher Grösse. Ausserdem wies F_2 charakteristische Eigenschaften, Aggregation und Fadenadsorption auf, welche diese nicht nur von F_1 und F_3 unterscheidet, sondern mit denen sie unter den bisher bekannten Phagen alleinsteht.

F_1-Phage. Kugelförmiges, 600 Å $\pm$ 10% grosses Partikelchen. Im Inneren sahen wir in mehreren Fällen eine kreuzförmige Zeichnung, als ob es aus vier

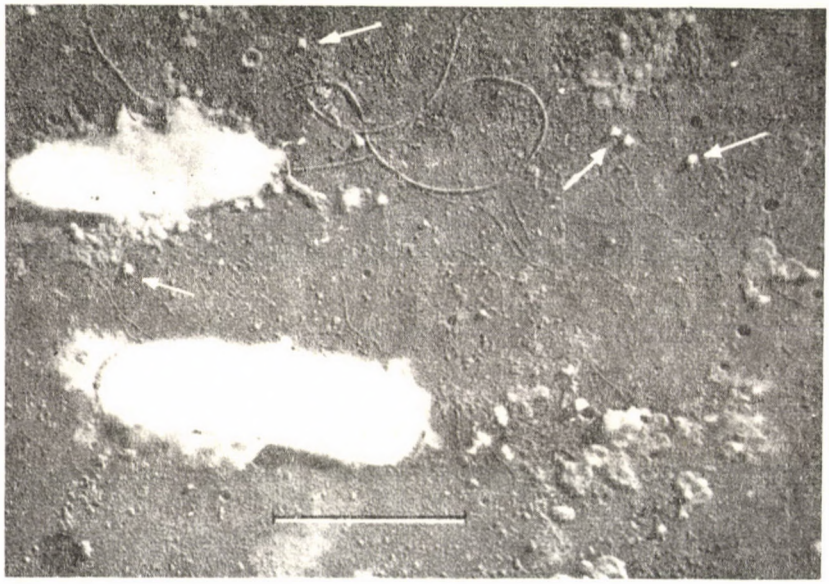


Abb. 4. Mit F_1-Phagen infizierte Bakterienkultur. In der Umgebung aufgedunsener Bakterien einige Phagpartikelchen, scheibenförmige Lysisprodukte und Fadengebilde. 26 000×

kleineren Kugelpartikelchen bestände. Die einzelnen Phagpartikelchen liegen unregelmässig zwischen den Lysisprodukten, den bereits erwähnten scheibenförmigen Gebilden, doch kommt es häufig vor, dass sich 2—5 Partikelchen in einer Reihe, dicht nebeneinander befinden. Die bereits erwähnten fadenförmigen Gebilde waren in allen Gesichtsfeldern anzutreffen, aber an diese adsorbierte Phagpartikelchen, wie sie für die F_2-Phage so charakteristisch sind, haben wir niemals gesehen (Abb. 4, 5, 6).

F_2-Phage. Dieses Partikelchen ist gleichfalls kugelförmig und hat eine Grösse von 750 Å $\pm$ 10%. Im Gegensatz zum F_1-Phagen und auch zu den Resultaten der biologischen Messungen erschien diese Phage auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen stets mit grosser Partikelchenzahl (Abb. 7). Während wir die F_1-Phag-Partikelchen verstreut, in geringer Zahl und ohne

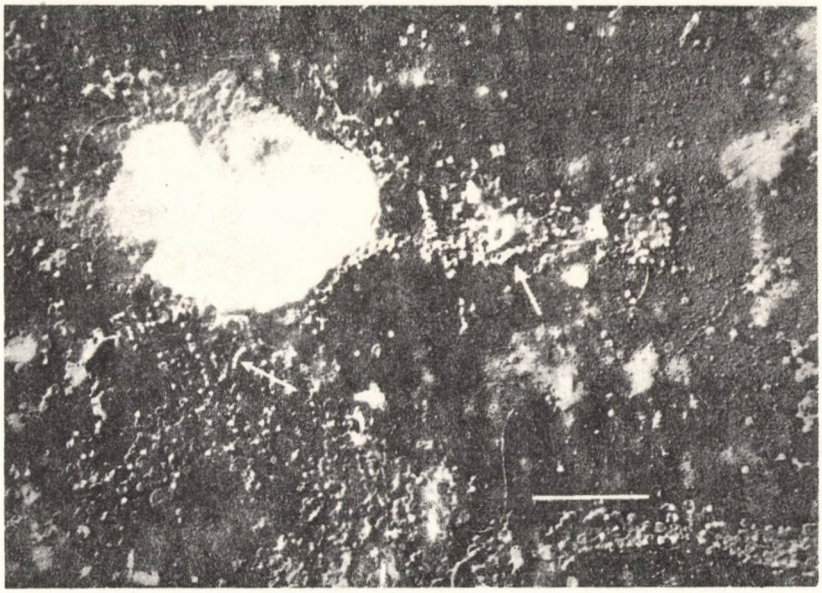


Abb. 5. Mit F_1-Phagen infizierte Bakterienkultur auf der K-Platte. Im Umkreis einer stark gedunsenen Bakterie sehr zahlreiche scheibenförmige Lysisprodukte und Phagpartikelchen. 15 500×

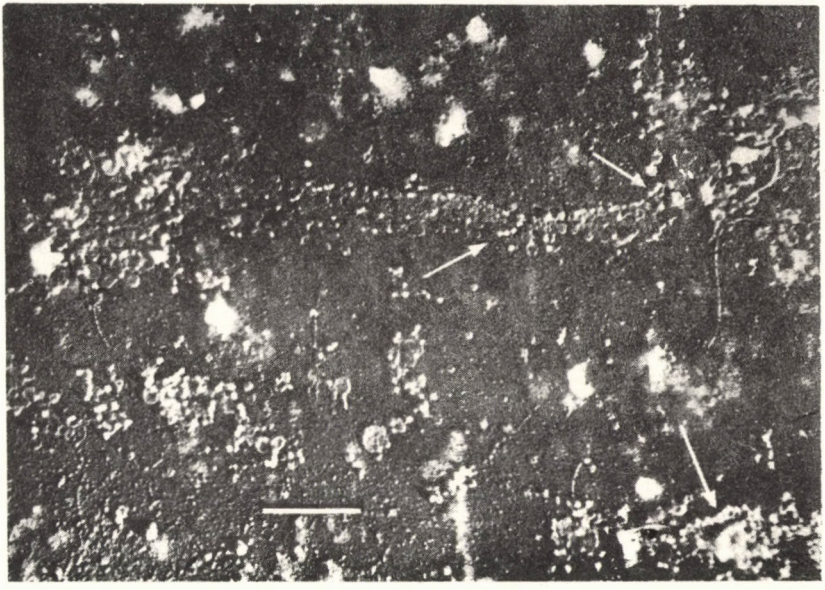


Abb. 6. Mit. F_1-Phagen infizierte Bakterienkultur auf der K-Platte. An der Stelle vollständig aufgelöster Bakterien sind scheibenförmige Gebilde und Phagpartikelchen zu sehen. 14 000×

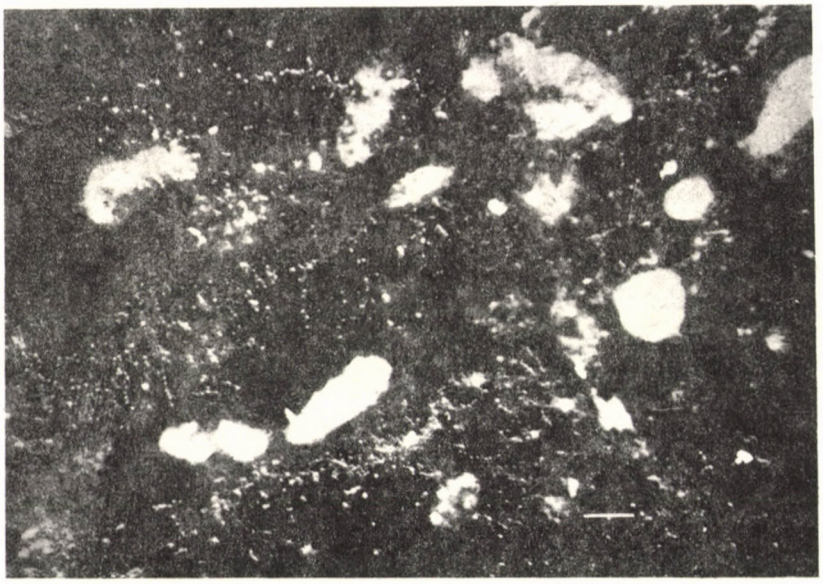


Abb. 7. Mit F_2-Phagen infizierte Bakterienkultur in Bouillon. Tropfpräparat. In der Umgebung der sich auflösenden Bakterien zahlreiche Phagpartikelchen. 6600×

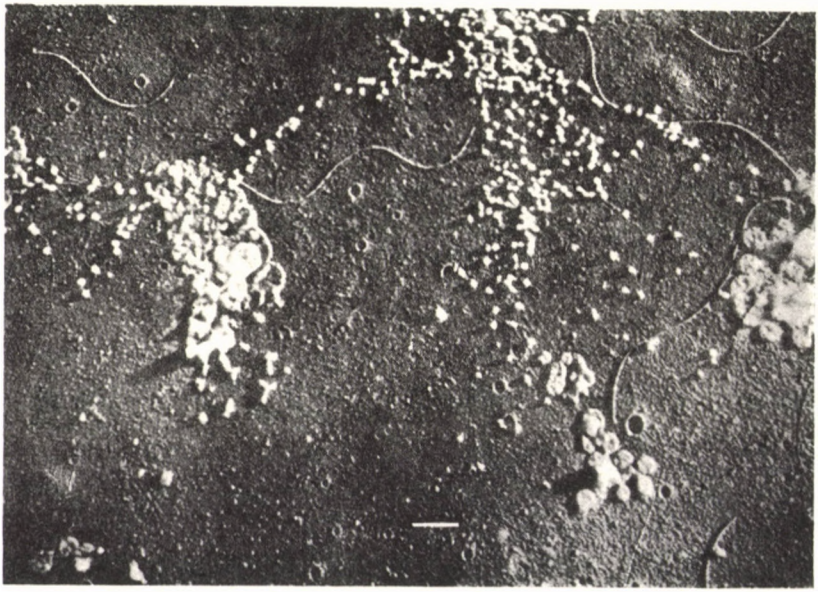


Abb. 8. An der Auflösungsstelle der mit F_2-Phagen infizierten, auf K-Platte zerstäubten Bakterien zurückgebliebene scheibenförmige Gebilde und Phag-»Familien«. Zwischen den Phagen sieht man diese verbindende Fäden. 5000×

jede besondere Anordnung antrafen, war bei der F_2-Phage die oft auch 300 Partikelchen umfassende, entschieden aus dem Zerfall einer Bakterie stammende »Phagfamilie« auffallend (Abb. 8, 10). Diese »familienartige« Erscheinungsform war bei unseren zahlreichen Untersuchungen ein ständig beobachtetes Phänomen. Bei der F_2-Phage zeigte sich aber auch noch eine sehr kennzeichnende morphologische Erscheinung, und zwar in erster Linie die Aggregation, eine vielfach in ausgeprägten Doppelreihen vorhandene Anordnung der Phag-

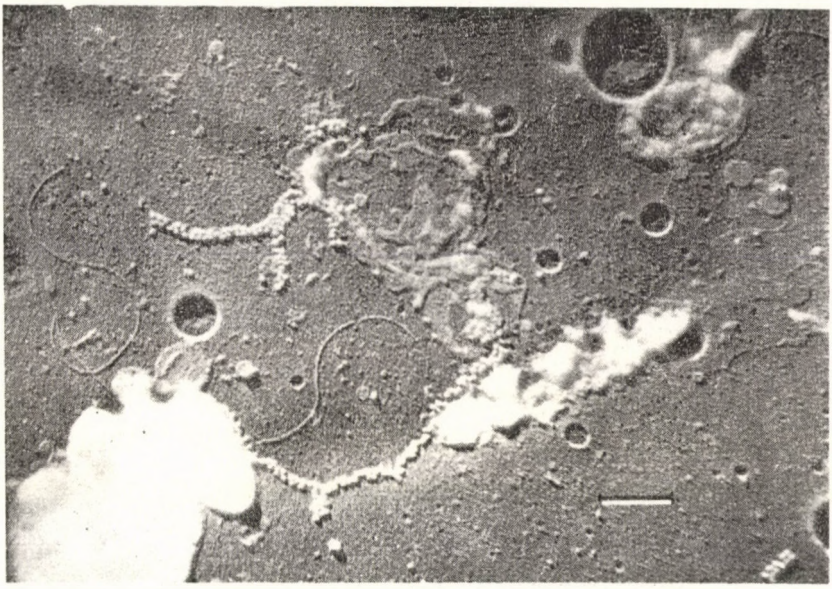


Abb. 9. Auf mit F_2-Phagen infizierte K-Platte zerstäubte, verschiedene Abstufungen der Lysi aufweisende Bakterien. In der linken unteren Ecke Bakterien mit bereits aufgelöster Struktur in der rechten unteren Ecke zwischen den grossen Klümpchen einer verlängerten, aufgedunsenen Bakterie noch nicht befreite, unreife Phagen. Darüber befinden sich an der Stelle einevöllig aufgelösten Bakterie abgeflachte, zystenartige Gebilde und in Doppelreihen angeordnete Phagpartikelchen. 9000×

partikelchen. Diese Anordnung war sowohl bei den nach dem Filmbewuchsverfahren (Abb. 9), dem Abzieh- (Abb. 10) und dem Abklatschverfahren (Abb. 11) hergestellten Präparaten als auch in den zentrifugierten, filtrierten und in Phiolen aufbewahrten reinen Phagsuspensionen zu beobachten. Diese Zusammenrottung der Phagpartikelchen war derart charakteristisch und häufig, dass wir ihr in allen Präparaten begegneten.

Eine andere, bei den F_1- und F_3-Phagen nicht festgestellte Erscheinung war die »Fadenadsorption« der Phagpartikelchen. Sehr häfig fanden wir lange, mehrere μ grosse, an aufgereihte Perlen erinnernde Gebilde, an welche sich die Phagpartikelchen wie auf die bereits erwähnten geraden (Abb. 12) oder bogen-

förmig gekrümmten (Abb. 13) Fäden, die erheblich dünner waren als die Flimmerhärchen und diesen auch strukturell nicht glichen, adsorbierten. An Geisseln haftende Phagpartikelchen sahen wir jedoch nur in den seltensten Fällen, und auch dann befand sich nur je ein Partikelchen an der Geissel, im Gegensatz zu den letzten und vielen anderen ähnlichen Fällen, bei denen bis zu 100 Partikelchen an einem Faden klebten.

F_3-Phage. Im Gegensatz zu den vorstehend beschriebenen zwei Phag-Spezies vermochten wir diese Phage im Hinblick auf ihre spezielleren Nährboden-

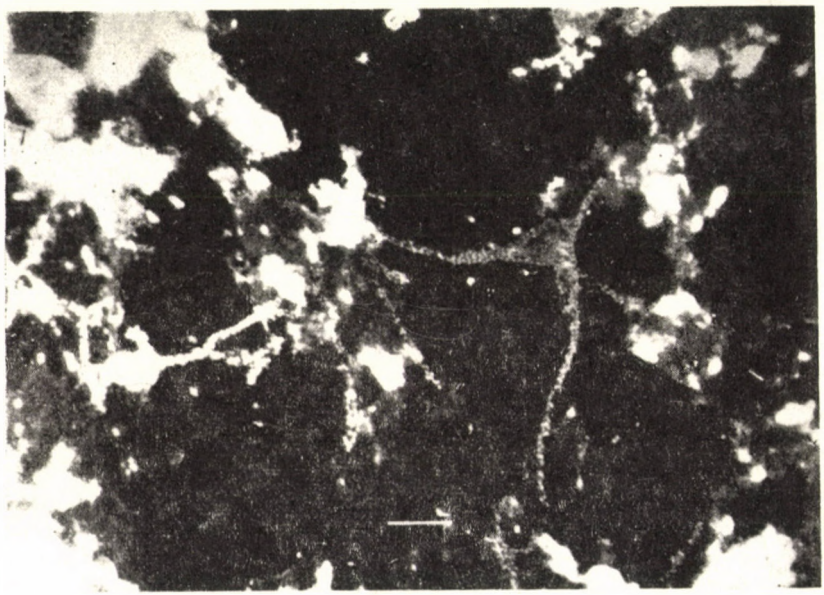


Abb. 10. Von der Oberfläche einer mit F_2-Phagen infizierten Bouillon-Agarkultur zubereitetes (unbedampftes) Abziehpräparat. Zwischen den in Auflösung begriffenen Bakterien eine in Doppelreihen angeordnete Phagenfamilie. 8700×

ansprüche am wenigsten zu studieren. Ihre Grösse betrug im Vergleich zu Polystyrolpartikelchen 750 Å ± 10% (Abb. 14). Auch diese ist ähnlich wie die beiden anderen ein kugelförmiges Partikelchen. In den filtrierten und zentrifugierten Präparaten war keine derartige Anordnung, wie wir sie bei F_2 beschrieben, zu beobachten, dagegen fanden wir in dem auf die Membran gesprühten Ultrazentrifugensediment ziemlich viele, die Elektronen in geringem Masse streuende Phag-»ghost«-en (Abb. 15). In den 10 Minuten nach der Infektion hergestellten Präparaten sahen wir an die Bakterienoberfläche adsorbierte Phagen (Abb. 16). Dagegen ist es mit keinem Präparationsverfahren gelungen, auf den lytischen Bildern F_3-Phagpartikelchen vorzufinden.

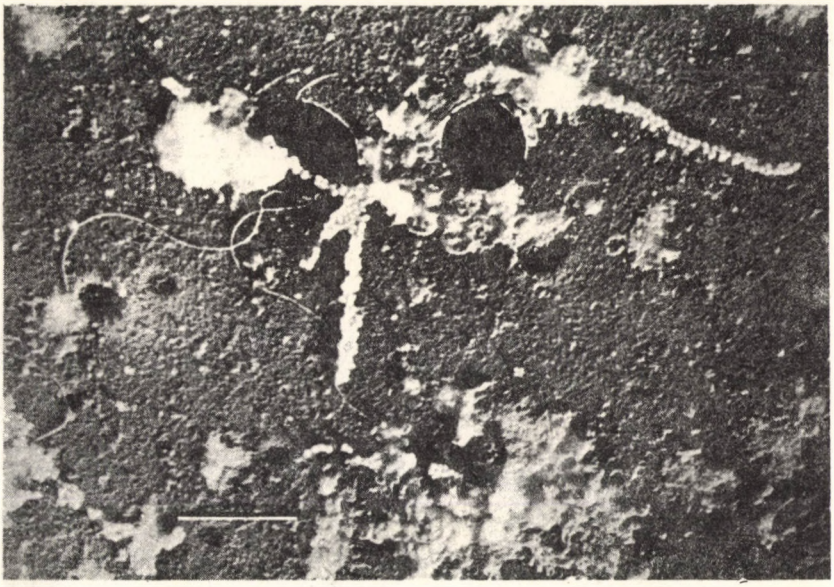


Abb. 11. Von der Oberfläche einer mit F_2-Phagen infizierten Bouillon-Agarkultur nach dem Abklatschverfahren hergestelltes Präparat. In der Aufnahme sieht man Lysisprodukte und in Doppelreihen angeordnete Phagpartikelchen. 16 000×

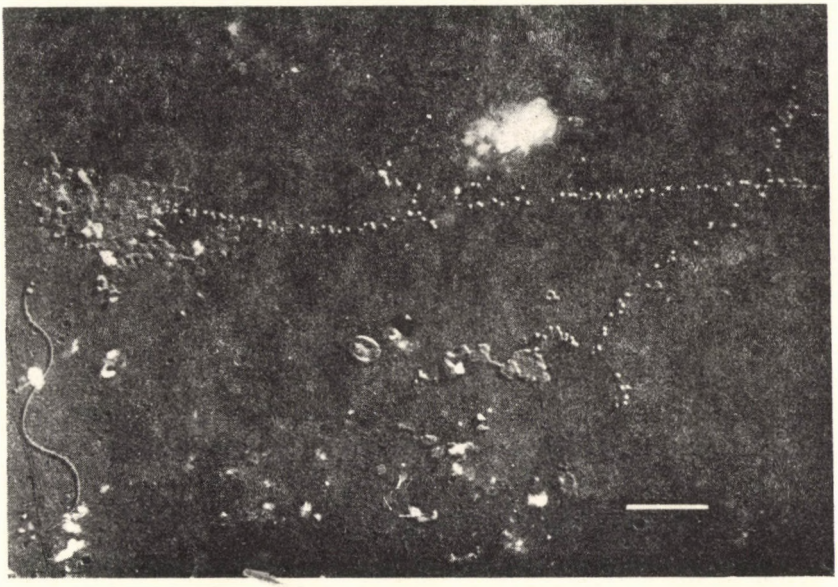


Abb. 12. Mit F_2-Phagen infizierte Bakterienkultur auf K-Platte. Nach Auflösung der Bakterien blieben scheibenförmige Gebilde zurück, die freigesetzten Phagen haben sich an einen langen Faden adsorbiert. 10 500×

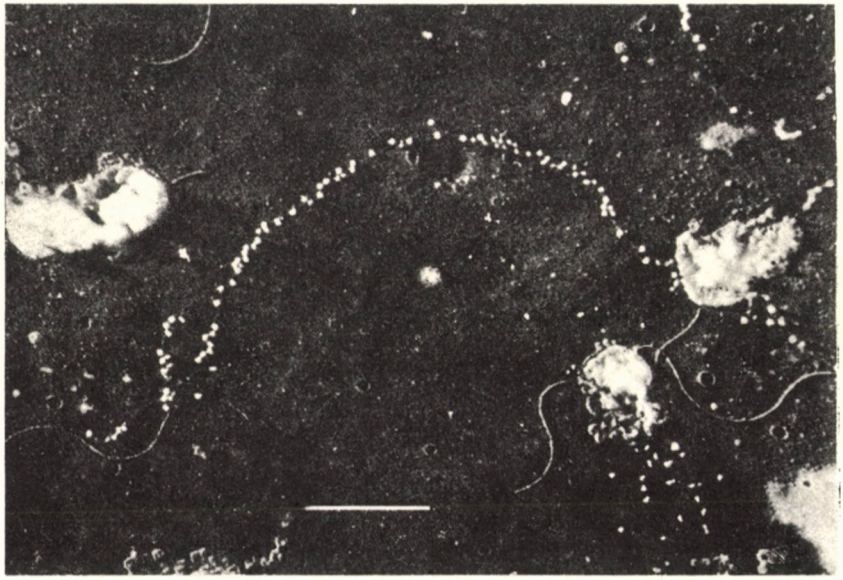


Abb. 13. Die aus einer mit F_2-Phagen infizierten, auf K-Platte zerstäubten Bakterienkultur freiwerdenden Phagen haben sich an einen Faden adsorbiert. 16 000×

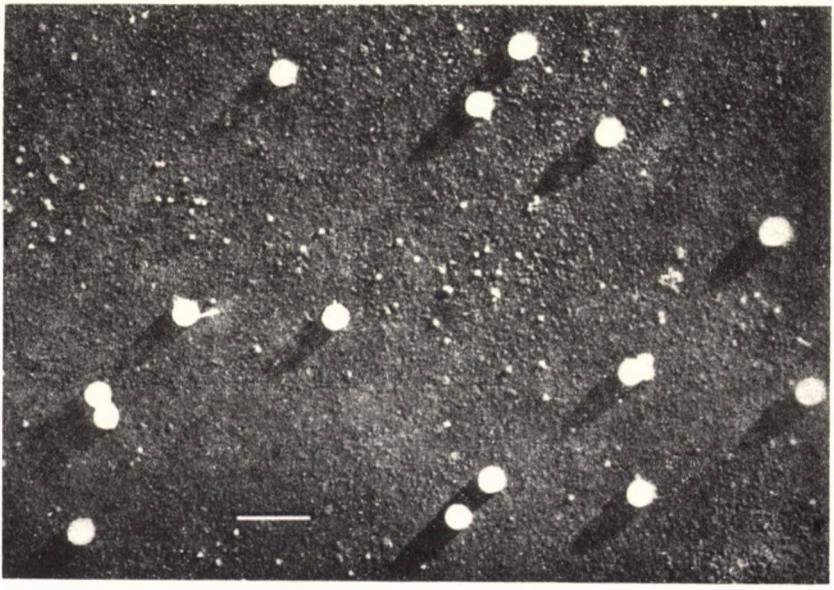


Abb. 14. F_3-Phagpartikelchen, zusammen mit Polystyrol latex-Partikelchen auf eine K-Platte zerstäubt. 9500×

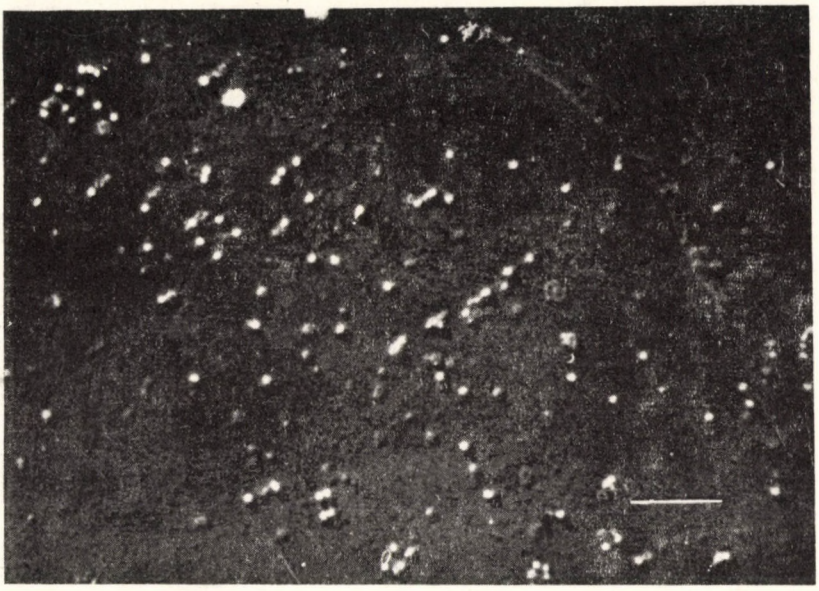


Abb. 15. F_3-Phagpartikelchen aus dem Ultrazentrifugensediment. Zwischen den kompakten kontrastbildenden Phagpartikelchen sind weniger elektronenstreuende Phag-»ghost«-en zu sehen 12 500×

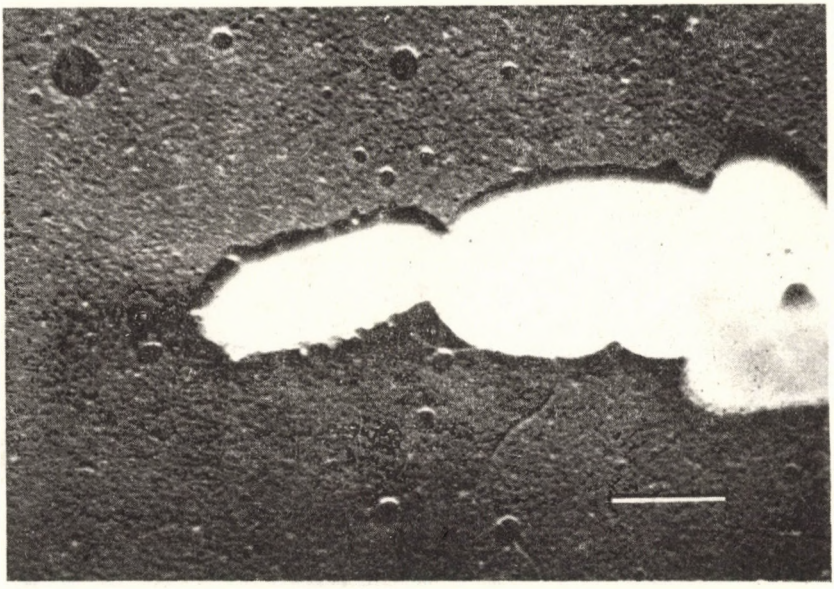


Abb. 16. F_3-Phagpartikelchen, an die Oberfläche einer Bakterie adsorbiert. Auf K-Platte zerstäubtes Material, 10 Minuten nach der Infektion. 15 000×

Besprechung

Im Laufe unserer Untersuchungen hatten wir die Möglichkeit, die bei den elektronenmikroskopischen Phaguntersuchungen gebräuchlichen verschiedenen präparativen Methoden miteinander zu vergleichen. Wenngleich sämtliche Verfahren zufriedenstellende Aufnahmen ergaben, fanden wir im Hinblick auf ihre Reinheit und topographische Zuverlässigkeit doch die KELLENBERGERsche Filmbewuchsmethode am geeignetsten. Insbesondere bei der Zerstäubung von Suspensionen mit niedriger Bakterienkonzentration (10^5—10^6/ml), wo sich die einzelnen Lysisereignisse in 20—30 μ Entfernung voneinander abspielen, sich also die Lysisprodukte nicht miteinander vermischen konnten, erschienen die einzelnen Phag-»Familien« in einer Isolierung, welche beinahe auch die Durchführung quantitativer Messungen ermöglicht. Ein beachtenswertes morphologisches Bild bot die F_2-Phage. In den meisten Präparaten war die Aggregation der Phagpartikelchen — unabhängig von der präparativen Vorbereitung — augenfällig. In den Aggregaten waren 100—200, ja häufig noch mehr Phagpartikelchen in doppelten und dreifachen Reihen angeordnet. Diese Aggregate vermochten wir auch in den filtrierten, von grösseren Bakterienfragmenten gereinigten, kalt aufbewahrten Phagsuspensionen zu beobachten. In erster Linie in den auf K-Platten hergestellten Präparaten war auch die Fadenadsorption der Phagpartikelchen häufig wahrnehmbar. Diese beiden Erscheinungen betrafen beträchtliche Phagpartikelchenmengen, weshalb die Anzahl der freien Phagpartikelchen in den zur Infektion benutzten Phagsuspensionen niedrig war. Vermutlich ist es darauf zurückzuführen, dass die biologischen Messungen des F_2-Phagen sehr niedrige Phagmengen ergaben.

Unsere Untersuchungen erstreckten sich nicht auf die Klärung der Ursachen der Aggregation und Fadenadsorption; hierfür sind weitere Versuche erforderlich. Nach Durchsicht einer grossen Anzahl von Aufnahmen tauchte aber der Verdacht auf, dass auch die Anordnung in doppelten und dreifachen Reihen ursprünglich mit einer Adsorption an die erwähnten Fäden beginnt. In der lockeren Struktur der Phagfamilien ist zwischen den Phagpartikelchen ein verworrenes Gewebe von Fäden zu sehen, so dass angenommen werden kann, die Zusammenrottung der Partikelchen, die Entstehung der »Familie«, trete bereits aus diesem Grunde ein. Die Anordnung in doppelten-dreifachen Reihen würde demnach einem stärkeren, kompletteren Zustand der »Familie«-Form entsprechen.

Bei der F_1-Phage konnten wir auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen die verschiedensten Zustände der Lysis beobachten, die Anzahl der Phagen war indessen wesentlich geringer als bei der F_2-Phage.

Einer weiteren Untersuchung bedarf auch die F_3-Phage, bei der wir, obwohl entschiedene Lysis zu sehen war, nach keinem der drei präparativen

Verfahren (Filmbewuchs-, Abklatsch- und Abziehmethode) Phagpartikelchen anzutreffen vermochten.

Zwischen der Anzahl der scheibenförmigen Gebilde und der Fäden sowie dem Zustand der Lysis schien ein entschiedener Zusammenhang zu bestehen. In den Aufnahmen des aus fortgeschrittener Auflösung präparierten Materials kamen beide in viel grösserer Anzahl vor als zu den der Infektion näherliegenden Zeitpunkten. Nach der Lösung wird das Bild des Ausgangsmaterials, der intakten Bakterien und Phagen, vom Bilde massenhafter Phag-, Geissel-, Faden- und Scheibenformen abgelöst. Diese letzteren sind in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen in solchen Massen zu sehen, dass auch ihre Differenzierung als selbständige Fraktion und ihre chemische Untersuchung nicht unmöglich erscheint.

Zusammenfassung

Die neuen Pseudomonas pyocyanea-Bakteriophagenstämme F_1, F_2 und F_3 wurden nach verschiedenen präparativen Verfahren zur elektronenmikroskopischen Untersuchung vorbereitet. Das Filmbewuchsverfahren erscheint wegen seiner Reinheit und guten topographischen Resultate für Phaguntersuchungen am geeignetsten. Die Phagen F_1 und F_2 wurden als Produkte der am Film vor sich gegangenen Lysis, die F_3-Phage nach Ultrazentrifugenanreicherung bzw. in dem an Bakterien adsorbierten Zustand photographiert. Alle drei Phagen sind schwanzlos, kugelförmig und weisen einen Durchmesser von 600—800 Å auf. Im Laufe der Lysis wurden bei den Phagen F_1 und F_2 sehr zahlreiche scheibenförmige Gebilde verschiedener Grösse, ferner sehr dünne Fäden festgestellt. An letzteren war die Adsorption von F_2-Phagpartikelchen zu beobachten. Die F_2-Phage bildete ausserdem auch in doppelten und dreifachen Reihen angeordnete Aggregate und Phag-»Familien« von ziemlich lockerer Struktur. Es ist anzunehmen, dass die Ergebnisse der biologischen Messungen an dieser Phage von diesen Eigenschaften beeinflusst wurden.

LITERATUR

1. Alföldi, L.: Acta Microbiol. Hung. **4**, 107 (1957).
2. Raettig, H.: Zbl. Bakter. I. Orig. **158**, 80 (1952).
3. Raettig, H.: Ztschr. Mikrosk. **61**, 80 (1952—53).
4. Kellenberger, E.: Ztschr. Mikrosk. **6/7**, 412 (1952).
5. Kellenberger, E.: Experientia **8**, 99 (1952).
6. Hillier, J., Knaysi, G. and Baker, R. F.: J. Bacter. **56**, 569 (1948).
7. Kellenberger, E.: Rapports du Congrès Européen d'Electronmicroscopie, Gent (1954).
8. Lovas, B.: Acta Microbiol. Hung. **4**, 23 (1957).
9. Grün, L. und Tischer, W.: Optik **6**, 129 (1950).
10. Grün, L. und Tischer, W.: Optik **9**, 241 (1952).
11. Hennessen, W., Grün, L. und Lindner, E.: Zbl. Bakter. I. Orig. **156**, 381 (1950—51).
12. Van Den Ende, M., Don, Ph. A., Elford, W. J., Challice, C. E., Dawson, I. M. and Hotchin, J. E.: Hygiene **1**, 12 (1952).
13. Weibull, C. and Hedwall, J.: Biochim. Biophys. Acta **10**, 35 (1953).
14. Houwink, A. L. and Van Iterson, A. L.: Biochim. Biophys. Acta **5**, 10 (1950).

COMPLEMENT TITRES IN SUBJECTS WITH DIFFERING UPTAKES OF DIETARY PROTEIN, WITH SPECIAL REFERENCE TO ANTIBODY FORMATION IN DEPENDENCE ON DIET

By

L. Fekete, Gy. Nemes, J. Kleeberg and E. Ábrahám

State Institute of Food Research and Nutrition, Budapest

(Received October 20, 1956)

The relation of dietary protein to antibody formation has been known since the work of Cannon *et al.* [1]. It has been confirmed and further developed in numerous investigations [2—6]. In an earlier paper [3], one of us successfully demonstrated the favourable effect a protein diet exerts on antitoxin production in children inoculated with tetanus anatoxin. A number of authors studied the protein contents of the complement and the relation between the synthesis of the serum protein fractions and the mechanism underlying the production of the protein components of the complement [7—12]. In humans, we do not yet know with certainty with which protein fraction the synthesis of the complement proceeds simultaneously nor is it known how complement production is affected by an adequate protein diet.

Materials and methods

Groups of well-nourished and ill-fed subjects were kept under observation. The imperfectly nourished groups were made up of members of the gipsy settlements around Pécs. The well-fed control groups consisted of children from the model crèches and day nurseries in the town, and healthy adult town dwellers. Every subject was examined four times during the year for which the investigations lasted.

Particular care was taken, four times in the year and each time over a whole week, in recording the subject's diet and its nutritive value, and in observing the conditions under which it was being taken up.

Food uptake was evaluated on the basis of the Dietary Standards issued by the *State Institute of Food Research* [13]. The daily consumption of nutrients per head was compared with the data approved by the *Committee of Nutrition of the Hungarian Academy of Sciences*. In determining the subject's nutritional state, in controlling them for nutritional disease, and in carrying out laboratory tests, the examinations followed Fekete's [14] book on screenings. The children's developmental state was determined by Simkó's [15] paediometric index and all subjects were clinically controlled for eventual pathological changes.

The complement was determined with the titration method elaborated by the *Serological Department* of the *State Institute of Public Health*. For the complement and the sheep erythrocytes we are indebted to the *University Institute of Microbiology*, Pécs. All determinations were made within 30 to 60 minutes following blood sampling. Korpáczy's [16] salt method was used in establishing the total protein of the serum; the paper-electrophoretic method described by Grassmann [17] was employed in examining the serum fractions, among them gamma-globulin. Since functional disturbances of the liver interfere with both the complement values and the synthesis of the serum fractions, the suspects were singled out by the Mallen and Takata tests and by examining the urine for urobilinogen.

True to their accustomed ways, the gipsies in the settlements live chiefly on vegetables and consume but little animal protein. They breast-feed their infants for years, and after weaning

keep them on a diet poor in animal protein. The members of the group of undernourished subjects, afflicted with more or less grave nutritional disease that rendered them suitable for immunobiological studies, were selected from among 150 children of 1 to 16 years of age, and 256 adults.

The immunobiologically studied cases were distributed as follows: — 182 adult controls, 42 children from 2 to 3 years of age as controls: 234 underfed adults, and 56 undernourished children 2 to 3 years of age.

Results

Dietary studies. From the recorded individual and family diets, the daily uptake per head was computed, with the aid of *Diet Tables*, for the individuals in the various age groups. The amounts consumed were then compared with the values physiologically required by the subjects, according to their respective age, body weight, and occupation. The relative figures are listed in Tables 1 and 2.

If we compare the daily averages of nutrients actually taken up by the gipsy children with those consumed by the normal town children or with the physiological dietary standards for children in the 2 to 3-year age group, we find that the gipsies are calorically underfed and subsist upon a diet poor in animal protein. Their consumption of fat and vitamins is also deficient; particularly low is the uptake of vitamin B_2, vitamin C, and nicotinic acid. While the uptake of adequate protein amounts to 42 per cent of the total protein in the control children, it is less than 20 per cent in the gipsies.

Similar deficiencies are found in the adults. The data in the Table refer to kg of body weight. In the groups of both normals and underfeds, the actual consumption figures are compared with the nutrient requirements of individuals of the same weight and constitution. In the group of underfeds, the men as well as the women are conspicuous for caloric deficiency; they live on a diet poor in animal protein and characterized by an excess of carbohydrate and a deficiency of vitamin B_2 and nicotinic acid. Of all the essentials, fat consumption is the nearest to satisfactory. Of the minerals, the uptake of calcium is the lowest, hardly covering half the requirement.

A comparison of the diets consumed by the well-fed and ill-fed children, respectively, throws light upon the causes of the deficiencies. The diet fed to the normal children is varied, while that of the gipsy children, and also of the adults, is monotonous, consisting fundamentally of beans, potato, and bread. The quantitative differences in the daily consumption per child are equally instructive. The normally fed child consumes a daily average of 0,5 l of milk, the ill-fed gipsy child only 0,05 l: the average consumption for the former is one-third of an egg per day, for the latter one egg a week, and similar differences are in the uptake of other animal proteins (cheese, curds). The underfed are conspicuous for their high intake of cereals. While the normal children in the crèches eat about 150 g of bread a day, ill-fed gipsy children of the corresponding age consumed 250 to 300 g. The gipsy diet includes only a minimum of fruits, a daily average of 20 to 30 g, and very small quantities of greens and fresh

Table 1

Food consumption of well-fed and ill-fed children of both sexes in the 2—3-year age group per day and head

Normally fed children

Number of subjects	Body height in cm		Body weight in kg		Number of calories		Protein in g		Adeq. protein in %		Fat in g		Carbohydr. in g		Vit. A in IU		Vit. B_1 in mg		Vit. B_2 in mg		Nicotinic acid in mg		Vit. C in mg		Vit. D in γ		Calcium in mg		Iron in mg	
	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc
42	98,2	1,0	13,0	2,1	1100	211	38	6,0	42	3,0	50,4	4	120	26	2200	120	0,5	0,1	0,6	0,12	8,0	1,1	23	6,0	30	3,0	630	4,6	7,0	1,1

Ill-fed children

56	85	1,2	12,3	1,1	688	1,26	30	3,0	12	3,0	6,9	3,0	1161	30	313	6,6	0,26	0,1	4,5	0,1	6,6	1	6,6	1,0	2,3	1,4	157	3,6	0,6	2,0

av = arithmetical means of the consumption values.
sc = scatter.

Table 2

Average daily food consumption per head of normally and deficiently fed adults

Number of subjects	Body height in cm		Body weight in kg		Number of calories		Protein in g		Adeq. prote- in in %	Fat in g		Carbohydr. in g		Vit. A in IU		Vit. B_1 in mg		Vit. B_2 in mg		Vit. C in mg		Nicotinic acid in mg		Calcium in mg		Iron in mg	
	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc	av	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc
Normally fed males																											
120	163	3	50	2,0	3295	3,20	109,3	11,2	31	95	4,3	470	1,60	4144	1,10	1,08	0,61	1,87	0,8	40,2	1,3	35,8	3,3	6,25	2,1	30,0	2,2
Ill-fed males																											
158	160	2,6	50	1,0	2295	1,60	99,3	1,01	16	23,2	3,2	387,8	1,11	1044	170	0,88	0,2	0,87	0,4	20,2	1,3	15,8	3,9	5,25	1,9	32	2,3
Normally fed females																											
62	152	2,0	48	1	2671	342,6	101,2	13	42	78	6,1	362	7,2	5000	118	2,0	0,9	2,2	0,9	46,0	2,4	30	11	600	1,1	31	3,3
Ill-fed females																											
76	148	2,0	37	1,2	1895	2,63	83,8	1,4	20	191	4,3	432,2	6,3	867	110	0,72	0,3	30,72	0,3	16,6	2,1	13,3	8	4,36	1,3	26	3,5

Average age of normal men 38,5, of ill-fed men 42,3, of normal women 32,3, of ill-fed women 35,3 years.
av = arithmetical means of the consumption values.
sc = scatter.

vegetables. All the greater is their consumption of potato and beans ; even little children are fed daily 200 g of the former and 50 g of the latter, on an average. Gipsies eat little forest products, mostly crab-apples and wild pears, and when their season is on, strawberries and raspberries.

Intergroup dietary studies reveal, however, that the deficiency is the greatest in the uptake of high-quality animal protein.

Statistical methods. In calculating the values of the food consumed, we based ourselves upon the average inputs, and determined the scattering accordingly. A similar procedure was followed in the statistical evaluation of the data on the serum protein fractions and the complement titres.

Serological results, immunobiological tests. Table 3 lists the protein uptakes, the titres of the serum complement, and the values of the serum protein fractions. Against the figures, arranged from the lowest to the highest, showing the uptake of dietary protein per kg of body weight, stand all the serological data pertaining to each of them separately.

Table 3

Correlations between adequate protein uptake, serum complement titre, and the quantitative changes in serum protein fractions in subjects with differing diets

Number of subjects	Uptake of adeq. protein in g/kg		Complement titres			Serum											
			undiluted	diluted		Serum total protein in g/100 ml		Albumin in g/100 ml		α_1 globulin in g/100 ml		α_2 globulin in g/100 ml		β globulin in g/100 ml		γ globulin in g/100 ml	
	av	sc	%	1 : 5%	1 : 10%	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc	av	sc
30	0,01	0,06	50	38	12	5,2	1,1	1,0	0,3	0,12	0,2	0,18	0,16	0,68	0,10	0,57	0,20
30	0,06	0,06	50	37	13	5,2	1,0	1,0	0,3	0,14	0,2	0,14	0,16	0,70	0,11	0,50	0,26
20	0,10	0,03	46	42	12	6,0	1,3	1,0	0,4	0,20	0,2	0,16	0,2	0,68	0,12	0,60	0,30
42	0,15	0,06	36	30	34	6,3	1,3	1,2	0,5	0,10	0,2	0,11	0,21	0,70	0,31	0,50	0,30
28	0,20	0,08	40	40	20	6,3	1,4	1,2	0,7	0,26	0,16	0,10	0,11	0,68	0,22	0,80	0,29
30	0,25	0,08	40	42	18	6,8	1,2	1,3	0,6	0,11	0,21	0,16	0,21	0,26	0,18	0,32	0,12
60	0,30	0,10	35	35	30	6,6	1,3	1,6	0,4	0,20	0,16	0,26	0,20	0,39	0,11	0,50	0,16
30	0,40	0,10	30	35	35	7,8	1,6	2,5	0,7	0,18	0,12	0,19	0,11	0,70	0,19	0,16	0,10
73	0,45	0,08	26	40	34	8,0	1,8	3,0	0,9	0,10	0,11	0,12	0,10	0,36	0,20	0,73	0,11
86	0,50	0,08	20	40	40	8,2	1,7	3,6	0,6	0,30	0,10	0,10	0,10	0,39	0,20	0,30	0,10
65	1,20	0,09	12	38	50	8,0	1,3	4,0	1,0	0,21	0,10	0,16	0,11	0,26	0,11	0,42	0,18

av = arithmetical means of the consumption values.
sc = scatter.

These data were studied for correlations between them. To have to compare absolute values instead of proportions, the complement titres were, in

an arbitrary manner, designed numerically. The following correlations of significance were established to exist.

1. Between the amount of adequate protein in the food and the complement titre ; coefficient : + 0,746 ;

2. between the dietary protein uptake and the quantitative changes in the total protein and the serum albumin, respectively ; coefficients : + 0,876 for total protein, and + 0,810 for albumin ;

3. between the changes in the amount of the serum albumin and those of the complement titre values ; coefficient : + 0,896.

Upon a protein uptake above 1,2 g per kg the complement titres and serum protein values cease to increase, and the correlations only exist on lower levels, to which our tabulated data refer.

Discussion

On the above evidence, it seems probable that a diet deficient in protein goes hand in hand with a low complement titre, and that it is accompanied by changes in the serum protein, particularly by a decrease in the amount of serum albumin. Since thus the complement titre changes with the changes in the serum albumin, there seems reason to assume that complement formation and serum albumin production are abundant or deficient in dependence on the subject's diet being rich or poor in protein.

The fluctuations of the gamma globulin level on the one hand, and the differences in the uptake of dietary protein or the complement values on the other, do not seem to be correlated. It would appear that to a deficiency in protein, complement and albumin production react much more sensitively than globulin synthesis. This is perhaps an indication that the albumins and the complement may have a common metabolic mechanism, and that the synthesis of their respective protein component is contingent on the same or similar dietary factors.

From the immunobiological point of view, the phenomena observed permit the following conclusions.

a) On a protein-deficient diet the amount of serum albumin decreases, and together with it decreases the value of the complement titre.

b) Hypoalbuminaemia and diminishing complement activity assumedly impair the subject's resistive capacity ; CANNON *et al.* have shown this to be the case in animals [1] and epidemiological observations have lead to the same result.

c) Our present findings appear to confirm earlier observations, namely, that it is primarily through an inadequate uptake of protein that malnutrition asserts its adverse effects on the subjects' capacity to resist infections.

It is hoped that subsequent research work, using the above methods, will throw additional light on protein concentrates and special diets as the means to intensify resistance to infection and to establish the nutritional prerequisites of recovery.

Summary

The effect of protein uptake on the changes in the complement titre was studied in well-fed and ill-fed individuals. It was found that in subjects living on a diet deficient in adequate protein the serum complement titre is low, and so is the serum albumin content. Complement activity reaches its optimum when 1,2 g of good-quality protein are taken up per kg of body weight; a higher rate of protein input is not accompanied by a rise in the complement titre.

Acknowledgements. The authors' thanks are due to Miss M. RADEK of the *Department of Paediatrics of the University* at Pécs for assistance in the clinical examinations; to Professor KERPEL-FRONIUS for valuable advice; to Professor L. KUN of the *Institute of Public Hygiene of the University* at Pécs, for guidance in the titration of the complement in blood samples. Authors are also indebted for the assistance to L. BACZUR and his co-workers of the *Department of Health of Baranya County*. The help of Dr. F. MANDULA in adapting the titration method is also highly appreciated.

LITERATURE

1. CANNON, P. R.: J. Immunol. **44**, 107 (1942).
2. SCHOENHEIMER, R., RATTNER, L., RITTENBERG, D. and HEIDELBERGER, M.: J. Biol. Chem. **144**, 541, 545 (1942).
3. FEKETE, L.: Orv. Hetil., **13**, 343 (1954); Acta Microbiol. Hung. **1**, (1954).
4. FEKETE, L. and BAKOS, Á.: Congress Hygiene, in Budapest, 1954.
5. AXELROD, A. E. and PRUZANSKY, J.: Symp. on Protein Metabolism, in Proc. of Nutrition Symposium, Toronto, Ont. Canada, Oct. 30 (1953).
6. FELLER, A. E., BOULANGER, L. B., RALLI, E. P. and FRANCIS, T.: J. Immunol. **21**, 121 (1942).
7. RICE, C. E., BOULANGER, P. and PLUMMER, P. J.: Canad. J. Med. Sci. **29**, 13 (1954).
8. HEGEDÜS, A. and GREINER, H.: Magy. Orv. Arch. (1939).
9. MADDEN, A. and WHIPPLE, J.: J. Exp. Physiol. **25**, 363 (1937).
10. HEIDELBERGER, M. and PEDERSON, K. O.: J. Exp. Med. **65**, 393 (1937).
11. GITTLIN, D.: Bull. N. Y. Acad. Med., **31**, 359 (1954).
12. FEKETE, L. and KORPÁCZY, I.: Acta Physiol. Hung. **5**, 469 (1954).
13. *Table of Dietary Standards*, Institute of Food Research and Nutrition, Budapest (1955).
14. FEKETE, L.: Táplálkozásegészségügyi Szűrővizsgálatok Technikája. Egészségügyi Könyvkiadó. Budapest (1951).
15. SIMKÓ, J.: Népegészségügy, 15 (1951).
16. KORPÁCZY, I.: Kísérl. Orvostud. **3**, 68 (1950).
17. GRASSMAN, U. W. and HANNIG, K.: Naturwiss., **37**, 496 (1950).

DIE ROLLE DES pH BEI DER STERILISIERUNG VON KONSERVEN

Von

K. VAS und G. PROSZT

Forschungsinstitut für die Konserven-, Fleisch- und Kühlindustrie, Budapest

(Eingegangen am 22. Dezember 1956)

DIE WIRKUNG DES pH AUF DIE HITZETOLERANZ AEROBER BAKTERIENSPOREN

Die Wasserstoffionenkonzentration übt auf alle Lebensphasen der Mikroorganismen grossen Einfluss aus. Auch die Abtötungsgeschwindigkeit der Mikroben ist vom pH abhängig, ob es sich nun um das »natürliche« Absterben in älteren Kulturen oder um künstlich hervorgerufene, durch Chemikalien oder Hitze bedingte Zerstörung handelt.

Der letzteren Möglichkeit kommt in der Konservenindustrie, wo die Bekämpfung der schädlichen Mikroben das Endziel der Technologie bildet, grosse potentielle Bedeutung zu. Durch eine Reihe der zu diesem Zweck in Anspruch genommenen technischen Verfahren sucht man die Mikroorganismen chemisch oder durch Hitze zu vernichten bzw. die Vermehrung der am Leben gebliebenen Zellen zu verhindern. Sowohl die chemische, als auch die physikalische Konservierung kann jedoch, wenn sich die im Nahrungsmittel anwesenden Mikroben nur durch grobe chemische oder Hitzeeinwirkungen vernichten lassen, mit Folgen verknüpft sein, welche den Geschmack, Geruch, Nährwert und biologischen Wert der Lebensmittel schädlich beeinflussen. In derartigen Fällen erscheint jeder technologische Eingriff berechtigt, durch den die Widerstandsfähigkeit der Mikroben ohne wesentliche Veränderung der Zusammensetzung sowie des biologischen und Genusswertes der Lebensmittel herabgesetzt werden kann. Da die Senkung des pH hierzu geeignet erscheint, ist die Wirkung der pH-Senkung auf die Konservierung bereits von vielen Autoren untersucht worden. Der Erfolg der chemischen Behandlung lässt sich durch die pH-Senkung beträchtlich erhöhen [10]. Ebensowenig fehlen in der Literatur Mitteilungen über das verbesserte Ergebnis der Hitzebehandlung nach pH-Senkung (z. B. [1]). Auf Grund dieser Erkenntnis ist es heute üblich, Lebensmittel ihrem Hitzebehandlungsbedarf entsprechend nach dem pH zu gruppieren. (Bekanntlich genügt es, Ware unter pH = 4,5 ohne Druck, im Wasserbad zu sterilisieren, während es über pH 4,5 einer Hitzeeinwirkung über 100° C im Autoklaven bedarf.) Unter den Lebensmitteln, deren Hitzebehandlung man in einzelnen Ländern durch pH-Senkung zu mildern sucht,

sind in erster Linie Gemüsesorten, Kartoffeln usw. zu erwähnen. Wo keine Geschmackshindernisse bestehen, wird die Wasserstoffionenkonzentration mit Sauerkrautsaft oder anderen »natürlichen« säurehaltigen Stoffen erhöht. Die Grenzen des Verfahrens ergeben sich aus dem bei grösserem Säuregehalt auftretenden sauren Geschmack.

Die Beschäftigung mit obiger Frage schien uns interessant ; wir glaubten, klären zu müssen, worauf die Haltbarkeit der gesäuerten hitzebehandelten Lebensmittel zurückzuführen sei: auf die herabgesetzte Hitzetoleranz der Bakterien oder darauf, dass die Keime, welche die Hitzebehandlung überstanden haben, im sauren Medium sich nicht vermehren und daher kein Verderben hervorrufen können.

Besonders interessant schien uns die Untersuchung der Frage, ob die Abtötungsgeschwindigkeit der *aeroben Sporen*, welche den grössten Teil der Mikroflora der »handelsüblich sterilen« (d. h. wenige lebende, aber vermehrungsunfähige Mikroben enthaltenden) Konserven bilden [2], durch pH-Senkung erhöht werden kann. Die Frage der partiellen oder vollständigen Keimfreiheit der Konservenerzeugnisse bildet bekanntlich für die Fachleute der Industrie und des öffentlichen Gesundheitswesens ein ständiges Problem. Während nämlich vom Gesichtspunkt des Verderbens die Residualmikroflora erfahrungsgemäss praktisch keine Gefahr bedeutet, muss man vom hygienischen Standpunkt für wünschenswert halten, dass die vollständige Sterilität der Konserven bei der industriellen Herstellung gewährleistet wird. Sollte sich die pH-Senkung auch den erwähnten Mikroben gegenüber als erfolgreich erweisen, so muss ihre eventuelle Anwendung in Erwägung gezogen werden.

Versuche bei verschiedenem pH

Material und Methoden

Der untersuchte Mikroorganismus. Für unsere Versuche verwendeten wir einen Stamm des aeroben sporenhaltigen *Bacillus cereus*, der eine übliche Komponente der Restmikroflora hitzebehandelter Konserven bildet.

Die für die Untersuchungen benötigte Sporensuspension wurde so hergestellt, dass wir den Mikroorganismus auf einem 4 g Fleischextrakt, 200 ml süsse Molke, 100 ml (1 + 10) Hefedekokt, 10 g Glukose, 2 g Pepton *(Witte)*, 20 g Agar und 700 ml dest. Wasser enthaltenden, auf pH 7,2 eingestellten Nährboden in Petri-Schalen züchteten. Nach etwa einwöchiger Inkubation (28° C) bestand die Kultur hauptsächlich aus Sporen (Kontrolle mit dem Phasenkontrastmikroskop). Die Sporen wurden in M/15 Phosphatpuffer pH 7 gründlich dispergiert, von den eventuellen Klumpen mittels aseptischer Filtration durch ein steriles Leinentuch befreit und 10 Minuten bei 80° C gehalten. Diese bei 4—5° C aufbewahrte Stammsuspension (etwa 10^9—10^{10} Sporen/ml) benutzten wir sodann zur Impfung der Hitzebehandlungsmedien.

Hitzebehandlungsmedien. Als Hitzebehandlungsmedium verwendeten wir im allgemeinen Phosphatgemische. Aus 0,1 *M* K_3PO_4- und 0,1 *M* H_3PO_4-Lösungen stellten wir Gemische zusammen, deren pH 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 bzw. 7,0 betrug.

Bei pH 3 brachten wir drei verschiedene Erhitzungsmedien zur Anwendung: ausser Phosphorsäure Milchsäure (6,0 g Milchsäure, 0,68 g Na-Laktat je Liter) und auch Zitronensäure (12,6 g Zitronensäure, 7,4 g Na_2HPO_4 je Liter).

Die Hitzebehandlung. Von der Sporensuspension übertrugen wir etwa 2 Vol% in das fragliche sterile Erhitzungsmedium, so dass die anfängliche Sporenzahl 10^7—10^8/ml war. Nach kräfti-

gem Umrühren pipettierten wir das beimpfte Erhitzungsmedium in Mengen von 0,75 ml in 16 × 160 mm grosse Reagensgläser, und zwar so, dass die Pipette die Innenwand des Reagensglases *nur am Boden* berührte [10]. Die mit Wattestopfen verschlossenen Reagensgläser wurden in ein Glyzerin-Hitzebehandlungsbad von 90 ± 0,25° C getaucht. Nach jeder Hitzebehandlungsperiode (5—10—15 Minuten) wurden jeweils 5 Proben rasch herausgehoben, in kaltem Wasser abgekühlt und mit je 15 ml steriler Magermilch von pH 7 aseptisch aufgefüllt. Nach Inkubation während 20—30 Tagen bei 28° C stellten wir die in den Reagensgläsern stattgefundene Entwicklung fest.

Die Wirkung des pH auf die Hitzetoleranz der Bakteriensporen

Hitzetoleranz im Phosphatmedium. Den Einfluss des pH auf die Hitzetoleranz der *Bacillus cereus*-Sporen untersuchten wir in mehreren Versuchen bei 3, 4, 5, 6 und 7 pH in 0,1 *M* Phosphatpuffer bei 90° C.

Aus der Anzahl der positiven bzw. negativen Röhrchen der zu verschiedenen Zeitpunkten herausgenommenen je 5 parallel hitzebehandelten Reagensglas-Serien errechneten wir die dezimale Reduktionszeit (D_{90}) nach der Methode von HALVORSON und ZIEGLER [3] bzw. STUMBO und Mitarbeitern [7], mit der Abweichung, dass wir auf Grund unserer bereits erwähnten früheren Untersuchungen [9, 10] nicht den Durchschnitt der sich aus je einer Untersuchungsserie ergebenden *D*-Werte, sondern denjenigen *L*-Wert zur Grundlage nahmen, der sich aus den Angaben der während der Hitzebehandlung zeitlich zuerst auftretenden, auch negative Reagensgläser enthaltenden 5 parallelen Röhrchen errechnen lässt. Die auf diese Weise gewonnenen D_{90}-Werte sind mit ihren Mittelwerten und den mittleren Abweichungen der Mittelwerte auf Tabelle I wiedergegeben.

Wie ersichtlich, ist die Schwankung innerhalb der einzelnen pH-Werten unter den Paralleluntersuchungen ziemlich gross. Dennoch steht der Einfluss des pH auf die Hitzetoleranz, wie Abb. 1 anschaulich zeigt, ausser Zweifel.

Aus der in Tabelle Ia angeführten Varianzanalyse kann festgestellt werden, dass die Abhängigkeit des D_{90}-Wertes vom pH durch die lineare Regression (1. Kurve)

$$D_{90} = 2{,}075 \cdot \text{pH} - 1{,}684$$

annähernd zum Ausdruck gebracht wird. Die Abweichung von der Linearen ist im Vergleich zur Streuung innerhalb der pH-Niveaus gerade noch signifikant ($F = 3{,}1$ gegenüber $F_{0{,}05} = 2{,}8$).

Bei Anwendung der Methode der orthogonalen Polynomialen [5] stellten wir fest (Tabelle Ib), dass die Punkte auch von den quadratischen (2. Kurve) bzw. kubischen (3. Kurve) Zusammenhängen nach den Formeln

$$D_{90} = 2{,}2201 + 0{,}3778 \cdot \text{pH} + 0{,}1697 \cdot (\text{pH})^2 \quad \text{bzw.}$$

$$D_{90} = -7{,}4009 + 6{,}7561 \cdot \text{pH} - 1{,}1666 \cdot (\text{pH})^2 + 0{,}891 \cdot (\text{pH})^3$$

Tabelle I

Die Hitzeresistenz von Bac. cereus-*Sporen in phosphorsäurehaltigen Medien bei verschiedenen pH-Werten;* D_{90} *in Minuten*

Nr. der Bestimmung	pH				
	3	4	5	6	7
1	3,65	5,29	5,76	11,53	14,89
2	4,08	8,68	7,69	11,53	15,37
3	5,09	9,50	7,94	11,90	11,90
4	4,76	6,61	9,31	9,92	13,03
5	3,40	6,61	7,94	11,17	11,90
6	5,44	6,61	7,69	9,92	11,90
7	4,60	6,61	8,65	10,57	11,90
8	6,08	5,29	7,94	9,61	15,87
9	5,44	6,61	5,95	10,24	12,89
10	4,08	9,26	7,94	11,90	12,10
Mittelwert	4,66	7,11	7,68	10,83	13,17
Mittlere Abweichung des Mittelwertes	± 0,27	± 0,48	± 0,34	± 0,28	± 0,50

Anmerkung. Anfängliche Sporenzahl: bei pH 3: $4{,}9 \cdot 10^7$/ml; bei den übrigen pH-Werten: $7{,}8 \cdot 10^7$/ml.

Tabelle I a

Ursprung der Variation	Summe der Abweichungsquadrate	Freiheitsgrade	Varianz	F	$F_{0,05}$	$F_{0,01}$
Insgesamt	512,04	49				
Zwischen den pH-Niveaus ..	444,42	4				
Lineare Regression	430,48	1				
Abweichung von der linearen Regression	13,95	3	4,65	3,10*	2,8	4,3
Innerhalb der pH-Werte....	67,61	45	1,50			

* Signifikant (Wahrscheinlichkeit des Zufalls: $P \leq 5\%$)

gerade noch signifikante Abweichungen zeigen. Die beste Annäherung ergab natürlich (da es sich um 5 pH-Niveaus handelt) die quartische Regression (4. Kurve) nach der Gleichung

$$D_{90} = -158{,}0181 + 139{,}6880\,\mathrm{pH} - 43{,}6298\,(\mathrm{pH})^2 + 5{,}9231 \cdot (\mathrm{pH})^3 - \\ - 0{,}2919 \cdot (\mathrm{pH})^4$$

Tabelle I b

Ursprung der Variation	Summe der Abweichungs-quadrate	Frei-heits-grade	Varianz	F	$F_{0,05}$	$F_{0,01}$
Insgesamt	512,04					
Zwischen den pH-Niveaus ..	444,48	4				
linearer Teil	430,48	1	430,48	287***	4,1	7,3
quadrat. Teil	4,03	1	4,03	2,69	4,1	7,3
kubischer Teil	1,14	1	1,14	0,76	4,1	7,3
quartischer Teil	8,74	1	8,74	5,83*	4,1	7,3
Innerhalb der pH-Niveaus ..	67,61	45	1,50			

* Signifikant ($P \leqq 5\%$).
*** Signifikant ($P \leqq 0{\cdot}1\%$)

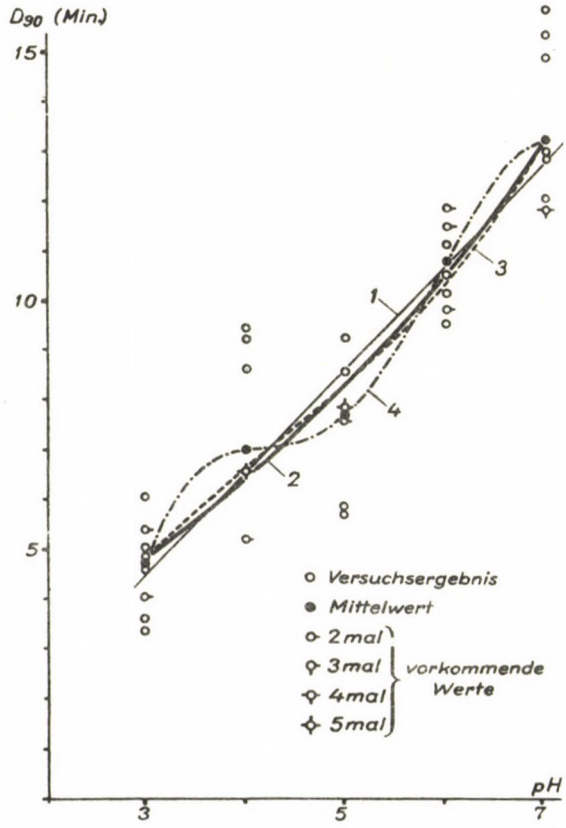


Abb. 1. Die Wirkung des pH auf die Hitzetoleranz der *Bac. cereus*-Sporen

Tabelle II

Die Hitzeresistenz von Bac. cereus-*Sporen bei pH 3 in verschiedenen Medien;* D_{90} *in Minuten*

Nr. der Bestimmung	Hitzebehandlungsmedium		
	phosphorsäurehaltig	milchsäurehaltig	zitronensäurehaltig
1	3,65	3,40	4,76
2	4,08	4,08	5,73
3	5,09	4,76	4,60
4	4,76	4,76	3,29
5	3,40	4,08	4,08
6	5,44	2,72	4,08
7	4,60	3,29	4,76
8	6,08	3,40	3,95
9	5,44	3,40	3,40
10	4,08	3,04	6,11
Mittelwert	4,66	3,69	4,48
Mittlere Abweichung des Mittelwertes	± 0,27	± 0,22	± 0,27

Anfängliche Sporenzahl: $4{,}9 \cdot 10^7$/ml.

Tabelle II a

Ursprung der Variation	Summe der Abweichungsquadrate	Freiheitsgrade	Varianz	F	$F_{0,05}$	$F_{0,01}$
Insgesamt	23,96	—	—	—	—	—
Zwischen den Hitzebehandlungsmedien	5,29	2	2,65	3,82*	3,35	5,49
Innerhalb der Hitzebehandlungsmedien	18,67	27	0,69	—	—	—
Zwischen Phosphor- und Milchsäure	4,69	1	4,69	6,78*	4,21	7,68
Zwischen Phosphor- und Zitronensäure	0,18	1	0,18	0,26	—	—

* Signifikant ($P \leq 5\%$).

Für die Zwecke der Praxis genügt es jedenfalls, wenn wir den linearen Zusammenhang in Betracht ziehen. In diesem Sinne wird durch die Senkung des pH um eine Einheit der bei pH 7 ungefähr 13 Minuten ausmachende D_{90}-Wert grob um 2 Minuten herabgesetzt.

Hitzetoleranz im Milchsäure- bzw. Zitronensäuremedium. Um festzustellen, ob über die Wirkung des Wasserstoffions hinaus die Anionen oder gegebenenfalls die undissoziierten Säuren auf die Hitzetoleranz der Sporen irgendeinen besonderen Effekt ausüben, bestimmten wir die dezimale Reduktionszeit bei 90° C ausser in Phosphorsäure auch im Milchsäure- bzw. Zitronensäuremedium. (Die Untersuchungen erfolgten in der Weise, dass wir die Hitzetoleranz an je einem Tage in jedem Medium parallel bestimmten und diese Messungen mehrmals wiederholten.) Die aus den Resultaten errechneten D_{90}-Werte sind in Tabelle II enthalten.

Durch Varianzanalyse lässt sich nachweisen (Tabelle IIa), dass zwischen den Durchschnittswerten der im Phosphorsäure- und Zitronensäuremedium vorgenommenen Bestimmungen (4,66 bzw. 4,48 Minuten) keine signifikante Differenz besteht, zwischen den Mittelwerten der Messungen in Phosphorsäure- und Milchsäurelösung (4,66 bzw. 3,69 Minuten) jedoch bereits eine Abweichung vorhanden ist. Bei pH 3 ist demnach die Hitzetoleranz der untersuchten Bakteriensporen in Anwesenheit von Milchsäure geringer als bei gleichem pH im Zitronensäure- oder Phosphorsäuremedium.

Auswertung der Ergebnisse

Im ersten Teil unserer Versuche stellten wir fest, dass die *Hitzetoleranz* der untersuchten aeroben Bakteriensporen durch die pH-Senkung geschwächt wurde. Zur Feststellung, ob diese Veränderung vom Gesichtspunkt des *Hitzebehandlungsbedarfes* einen wesentlichen Vorteil bedeutet, reicht die Kenntnis der *D*-Werte nicht aus, vielmehr muss man auch die Wärmepenetrationskurve des fraglichen Nahrungsmittels berücksichtigen. Infolgedessen kann man naturgemäss nicht mehr erwarten, dass durch die Senkung der dezimalen Reduktionszeit z. B. auf $^1/_3$ auch der Hitzebehandlungsbedarf auf $^1/_3$ herabgesetzt wird. Im folgenden wollen wir die Situation an einem Zahlenbeispiel erläutern.

Im Wasserbad von 100° C erwärmten wir in einem $^1/_1$ kg Glas bzw. in einer $^1/_1$ kg Dose grüne Erbsen bzw. Tomatenpüree von 28—30 Refr.-Grad (d. h. ein sich typischerweise schnell und ein sich typischerweise langsam erwärmendes Nahrungsmittel). Thermoelektrisch wurde die im thermischen Mittelpunkt der Behälter herrschende Temperatur gemessen, die bei den grünen Erbsen als Funktion der Zeit auf Abb. 2 dargestellt ist.

Indem wir den Temperaturkoeffizienten (Q_{10}) der Hitzeabtötung in allen Fällen als 10 annahmen und in der Voraussetzung, dass die Hitzetoleranz der Sporen im Lebensmittel dieselbe ist wie im Phosphatpuffer, errechneten wir die zur Vernichtung der untersuchten Sporen erforderliche Hitzebehandlung auf die übliche Weise [8, 9] durch Berechnung der Hitzeabtötungs- (Lethalitäts-)geschwindigkeiten, unter Berücksichtigung einer *8fachen* Senkung des

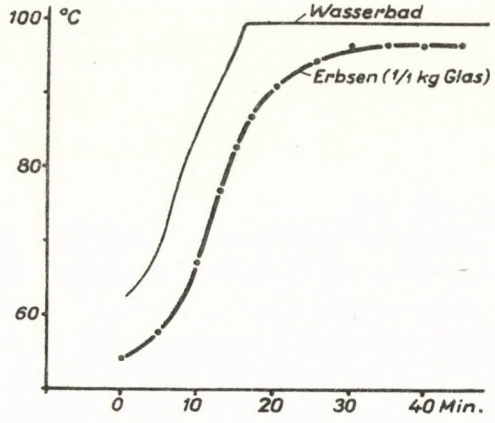


Abb. 2. Hitzepenetrationskurve von Erbsenkonserven

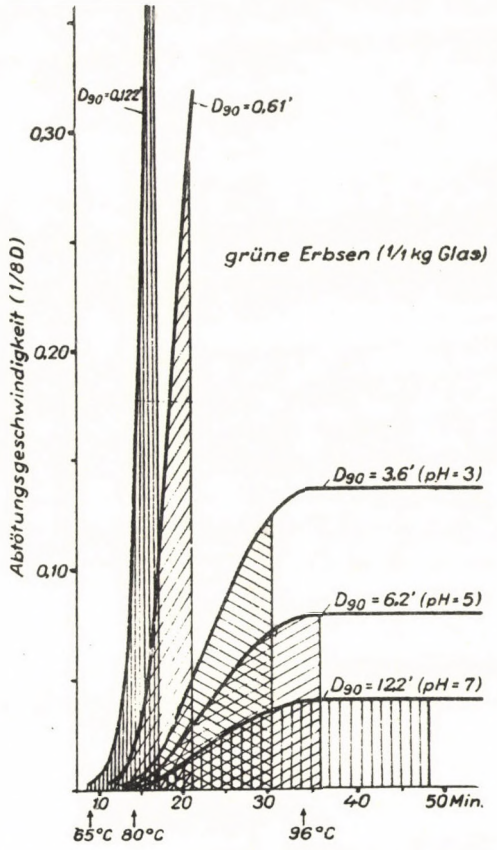


Abb. 3. Berechnung des Hitzebehandlungsbedarfes bei Erbsenkonserven von verschiedenem pH. — Die schraffierten Flächen unter den Lethalitätskurven entsprechen *einer* Flächeneinheit.

ursprünglichen Sporengehaltes auf $^1/_{10}$ (d. h. Verminderung auf 0,000001%). Der Einfachheit und besseren Vergleichbarkeit halber nahmen wir an, dass das pH der Erbsen oder des Tomatenpürees so gestaltet werden kann, dass sich die dezimale Reduktionszeit der Bakterien in ihnen bei 90° C zwischen 12,2 bzw. 0,122 Minuten variieren lässt. Die Hitzebehandlungsbedarfskurven (Lethalitätskurven) für Erbsen sind auf Abb. 3 ersichtlich.

Durch planimetrische Messung stellten wir die Zeitdauer fest, in der nach Erreichung einer Glaszentrumtemperatur von 65° C die Ware — zwecks Vernichtung der fraglichen Bakterien im erwähnten Ausmass (Verminderung auf 0,000001% = Erreichung der Flächeneinheit) erwärmt werden muss.

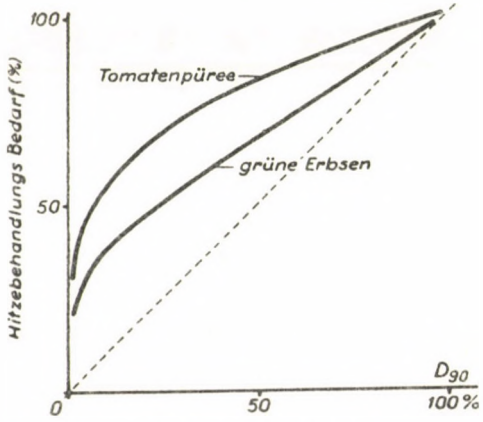


Abb. 4. Wirkung der Veränderung der dezimalen Reduktionszeit (D_{90}) auf die Gestaltung des Hitzebehandlungsbedarfes von Erbsen- bzw. Tomatenpüreekonserven

Die Ergebnisse der Berechnungen für Erbsen und Tomatenpüree gehen aus Abb. 4 hervor.

Die Senkung des D_{90}-Wertes von den ursprünglichen 12,2 Minuten um *70%* führte demnach bei den sich rasch erwärmenden Erbsen zu einer *45%igen*, bei dem sich langsam erwärmenden Tomatenpüree nur zu einer *27%igen* Verminderung des Hitzebehandlungsbedarfs. *99%ige* Senkung des D_{90}-Wertes ergab *80-* bzw. *70%ige* Verminderung des Hitzebehandlungsbedarfs. — Diese Zahlen zeigen deutlich, obwohl sie nur für den gegebenen Fall gelten, dass die Wirkung der Senkung der dezimalen Reduktionszeit auf die Verminderung des Hitzebehandlungsbedarfs infolge der begrenzten Wärmeleitungsgeschwindigkeit nur verspätet in Erscheinung tritt.

Die vorgenommenen Geschmacksproben und ihre mathematisch-statistische Analyse [11] ergaben, dass das pH von grünen Erbsen und Lecsó (grüne Paprika in Tomatenpüree) durch Anwendung von H_3PO_4 oder Milchsäure ohne unerwünschte Geschmacksveränderungen höchstens um etwa 0,7 herabgesetzt werden kann.

DIE WIRKUNG DES pH AUF DIE KEIMUNG AEROBER BAKTERIENSPOREN

Im ersten Teil dieser Mitteilung hatten wir die Rolle des pH bei der Sterilisierung durch Hitze untersucht und festgestellt, dass zwar bei sinkendem pH die Hitzetoleranz der als Modell benutzten aeroben Sporen (mit der dezimalen Reduktionszeit gemessen) geringer ist, jedoch der bei den Lebensmitteln von $pH < 4{,}5$, in der Praxis in Erscheinung tretende geringe Hitzebehandlungsbedarf durch die im sauren Medium feststellbare geringe Senkung der Hitzetoleranz nicht erklärt werden kann.

Im zweiten Teil unserer Arbeit untersuchen wir nun die Wirkung des pH auf die Keimung der Sporen.

Material und Methoden

Der untersuchte Mikroorganismus. Für die Versuche verwendeten wir denselben aeroben Sporenbildner, einen *Bacillus cereus*-Stamm, wie bei den vorangegangenen Hitzetoleranzversuchen. Züchtung, Bereitung und Aufbewahrung der Sporensuspension erfolgten ebenso, wie oben beschrieben wurde. Während der ganzen Versuchsserie benutzten wir die gleiche Suspension.

Die Messung der Sporenkeimung. Der Beginn der Keimung, ihre Geschwindigkeit und ihr Ausmass wurden in der Sporensuspension turbidimetrisch gemessen. Wir benutzten hier die Beobachtung von POWELL [6], wonach die den Beginn der Keimung anzeigende Refraktivitätsverminderung durch photometrische Messung der optischen Dichte bzw. Lichtabsorption der Sporensuspension einfach festgestellt werden kann. Bekanntlich zeigt die erwähnte optische Veränderung den Beginn der Keimung und nicht die Entwicklung der Keimstäbchen an. Für

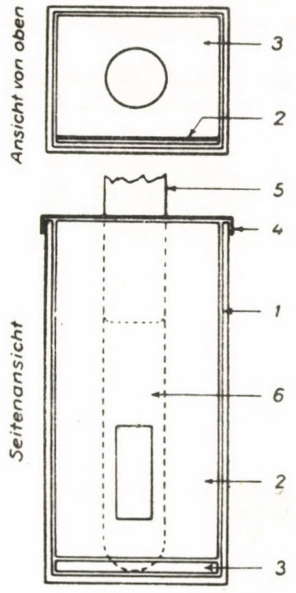


Abb. 5. Reagensglasadapter zum *Lange*schen lichtelektrischen Kolorimeter. (*1*) Wand der 100 ml-Küvette des Apparates; (*2*) rostfreie Metallplatte mit Blendenöffnung; (*3*) Plexiplatte mit einer runden Vertiefung in der Mitte zur Fixierung des Reagensglasbodens; (*4*) Küvetten-Deckplatte mit einer runden Öffnung in der Mitte zur Fixierung des Reagensglases; (*5*) Reagensglas; (*6*) Sporensuspension

uns war der erste Prozess entscheidend, da dieser nach POWELLs Untersuchungen sich parallel mit der Veränderung der Anzahl der hitzetoleranten Zellen verändert. Im folgenden verstehen wir unter »Keimung« stets diese erste Phase der Keimbildung.

Für die Untersuchungen benutzten wir das *Langesche lichtelektrische Photokolorimeter* (Typ IV), zu dem wir einen Reagensglasadapter konstruierten, um als Funktion der Zeit ohne Ausgiessen dieselbe Suspension oft untersuchen zu können. Das Reagensglas wurde in der Mittellinie der wassergefüllten 100 ml-Küvette des Apparates untergebracht, auf der zur Photozelle befindlichen Seite wandten wir eine 9 mm breite und 25 mm lange Blende in der Weise an, dass ihre longitudinale Mittellinie mit der Längsachse des Reagensglases und der Mittellinie der Photozelle in einer Ebene lag. Die Oberfläche der Suspension im Reagensglas befand sich über der oberen Linie der Blende (Abb. 5).

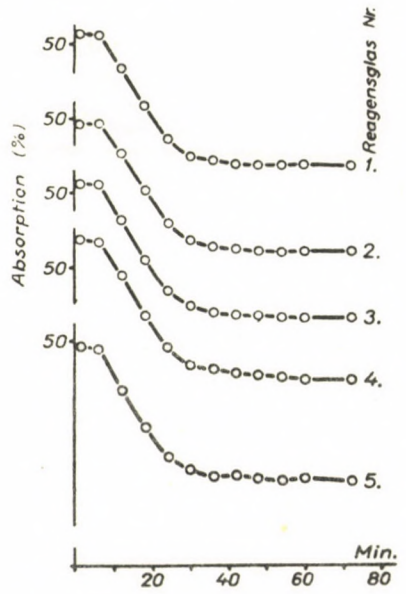


Abb. 6. Untersuchung der Keimung von Sporensuspensionen durch Trübungsmessung in 5 parallelen Reagensgläsern. — Um die parallelen Ergebnisse darstellen zu können, ist die Ordinate nicht kontinuierlich eingeteilt

Indem wir die im Reagensglas (16 mm ⌀) befindliche Sporensuspension, deren Temperatur im Wasserbad elektrisch eingestellt worden war (±0,25° C), für die Dauer der Messung in das Photometer stellten, konnten wir mit dem orangenfarbigen Filter den Prozentualwert der Lichtabsorption feststellen (wobei vor der Zelle der anderen Seite eine mit dest. Wasser gefüllte 100 ml-Küvette und eine ebensolche Blende verwendet wurden). Als Blindwert wurde die in den üblichen Reagensgläsern auftretende Lichtabsorption des suspendierenden Mediums angenommen und in Abzug gebracht. Im verwendeten System zeigte die Konzentration der Sporensuspension nach den Vorversuchen mit der prozentualen Lichtabsorption in dem bei den Untersuchungen benutzten Bereich praktisch linearen Zusammenhang.

Das *Suspendierungsmedium* wurde so zubereitet, dass wir zu der 4 g Fleischextrakt, 200 ml süsse Molke, 100 ml Hefedekokt, 10 g Glukose, 5 g Pepton, 6 g KH_2PO_4 und 700 ml Wasser enthaltenden, in kleineren Mengen (genau 50 ml) in 150 ml-Flaschen mit Wattestopfen bei 115° C 30 Minuten sterilisierten, bis zur Verwendung auf Eis gelegten Grundlösung zwecks Einstellung des pH verschiedene Säurelösungen gaben, das Volumen in Normalkolben auf 100 ml einstellten und das Gemisch in Teilgaben von 8 ml in sterile Reagensgläser übertrugen. Da das pH in den Medien mit niedrigerem Säuregehalt auch von der zur Impfung benutzten geringen Sporensuspensionsmenge etwas verändert wurde, nahmen wir die endgültige pH-Bestimmung in besonderen Reagensgläsern sofort *nach der Beimpfung* im *Metrohm*-Apparat mit Glaselektroden vor.

Zur *Einstellung des pH* wurden folgende Säuren benutzt: 0,43%ige Salzsäure, 3,20%-ige Phosphorsäure, 2,18%ige Milchsäure, 2,17%ige Weinsäure, 1,96%ige Zitronensäure und 5,22%ige Essigsäure. Die Wasserstoffionenkonzentration des Nährmediums suchten wir bei sämtlichen Säuren im allgemeinen auf pH 4,00, 4,25, 4,75, 5,00 und 6,00 einzustellen, was — von kleineren Abweichungen abgesehen — auch gelang. Das pH der Grundnährlösung betrug 6,9.

Von der beschriebenen konzentrierten Sporensuspension gaben wir zu den in die Reagensgläser eingemessenen, im Wasserbad gehaltenen 8 ml-Nährlösungsportionen 0,2 ml, so dass ihre anfängliche Sporenzahl je ml etwa $1{,}4 \cdot 10^8$ betrug. Nach raschem Schütteln wurde die erste Ablesung im Photometer in der 1. Minute nach der Beimpfung vorgenommen, hiernach wurde in der ersten Stunde im allgemeinen alle 6, fallweise alle 3 Minuten, sodann viertel-bzw. halbstündlich, im allgemeinen 2—4 Stunden hindurch, gemessen.

Mit jeder Säure, bei allen pH-Werten und Temperaturen, d. h. bei sämtlichen Behandlungsweisen arbeiteten wir jeweils mit 5 Reagensgläsern. Über den zeitlichen Verlauf der Sporenkeimung gibt Abb. 6 Auskunft.

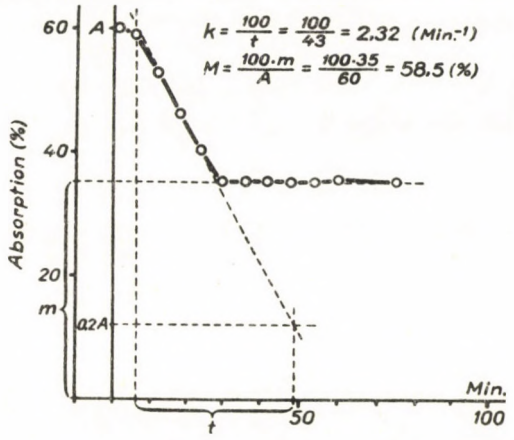


Abb. 7. Graphische Bestimmung der zur Berechnung der Keimungsgeschwindigkeit und Keimungsfähigkeit benötigten Angaben

Bewertung der Resultate. Zwecks Auswertung der gewonnenen Ergebnisse wurde die Keimungskurve aller Reagensgläser aufgezeichnet und auf diese Weise *Geschwindigkeit und Ausmass der Lichtabsorptionsverminderung* je Kultur graphisch untersucht. Den ersteren Wert stellten wir so fest, dass wir zum schnellsten Abschnitt der Absorptionsverminderung eine Tangente zogen und durch Extrapolation die Zeitdifferenz zwischen den Zeitpunkten feststellten, die einerseits zu dem als 100% angenommenen anfänglichen Lichtabsorptionsniveau (A), andererseits zu 20% dieses Wertes gehören; diesen letzteren Wert erreichte die Suspension selbstverständlich in Wirklichkeit niemals. Durch Multiplikation des Reziprokwertes dieser in Minuten ausgedrückten Zahl (t) mit 100 erhielten wir die Messzahl der in der schnellsten Phase, d. h. in der Anfangsperiode vorkommenden Keimungsgeschwindigkeit $\left(k = \frac{100}{t} \text{ min}^{-1}\right)$. Das *Minimum der Lichtabsorption* (M) wurde so festgestellt, dass wir die Lichtabsorption (m) des am niedrigsten verlaufenden waagerechten Abschnitts der Keimungskurve, gewöhnlich in der 60. Minute, im Prozentsatz des anfänglichen Absorptionswertes (A) (nach der Beimpfung) zum Ausdruck brachten. Das Verfahren ist auf Abb. 7 veranschaulicht.

Von den einzelnen M- and k-Werten der 5 parallelen Reagensgläser wurde der Durchschnitt genommen, ferner die mittlere Abweichung und die mittlere Abweichung des Mittelwertes errechnet.

Aus dem Lichtabsorptionsminimum errechneten wir die *Keimungsfähigkeit* (das Ausmass der Keimung) (G) in Analogie zur Mitteilung von HACHISUKA und Mitarbeitern [4] in bezug auf den Mittelwert der 5 Parallelangaben. Aus dieser Zahl geht hervor, welcher Prozentsatz der Sporen im Vergleich zur Kontrolle, deren Keimung nach den durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen praktisch 100% betrug, bei gegebener Behandlung keimte.

Die Keimungsfähigkeit wurde nach folgender Formel berechnet:

$$G = \frac{100 - \overline{M}}{100 - \overline{M}_c} \cdot 100$$

wo $\overline{M}$ den Mittelwert der relativen (auf die A-Werte bezogenen) Lichtabsorptionsminima, $\overline{M}_c$ hingegen dasselbe für die Kontrolle anzeigt.

Wirkung der Temperatur auf die Keimung

Vor der Durchführung der pH-Untersuchungen mussten wir die Abhängigkeit der Keimung des untersuchten Mikroorganismus von der Temperatur feststellen. Die Keimungsgeschwindigkeit musste nämlich nach Möglichkeit auf einen so geringen Wert eingestellt werden, dass sie so genau wie möglich gemessen werden konnte. Dies hofften wir am einfachsten durch Einstellung der Temperatur zu erreichen.

Die Grundnährlösung von beschriebener Zusammensetzung wurde nach pH-Einstellung, wie erwähnt, mit dest. Wasser auf das doppelte Volumen vermehrt, in Reagensgläsern in Wasserbäder von 15, 20, 25, 30, 35, 40 und 45° C gestellt und nach Beimpfung mit der Sporensuspension — im beschriebenen Verhältnis — die Veränderung der Lichtabsorption gemessen. Das pH wurde mit NaOH bzw. HCl so eingestellt, dass sein Wert *nach* der Beimpfung in einer Versuchsserie 7,0, in der anderen 5,1 war. Die Resultate sind aus Tabelle III und Abb. 8 ersichtlich. In allen Fällen wurden die sich aus 5 Parallelen ergebende mittlere Geschwindigkeit $(\overline{k})$ und mittlere minimale Lichtabsorption $(\overline{M})$ sowie die mittlere Abweichung der Mittelwerte ($s_{\overline{k}}$ bzw. $s_{\overline{M}}$) angegeben.

Tabelle III

Einfluss der Temperatur auf die Keimung bei zwei pH-Werten

Temperatur (°C)	pH = 5,1				pH = 7,0			
	$\overline{k}$ (min^{-1})	$s_{\overline{k}}$ (min^{-1})	$\overline{M}$ (%)	$s_{\overline{M}}$ (%)	$\overline{k}$ (min^{-1})	$s_{\overline{k}}$ (min^{-1})	$\overline{M}$ (%)	$s_{\overline{M}}$ (%)
15	*0,84*	0,039	*44,5*	1,06	*1,26*	0,042	*49,1*	2,43
20	*2,70*	0,230	*38,2*	0,59	*4,03*	0,103	*35,6*	1,07
25	*2,90*	0,077	*52,3*	1,15	*6,26*	0,117	*38,0*	0,47
30	*3,51*	0,171	*54,7*	0,89	*12,36*	0,034	*33,5*	0,61
35	*4,58*	0,263	*64,5*	2,95	*19,58*	1,665	*36,9*	0,71
40	*0,88*	0,016	*87,3*	0,84	*39,77*	0,974	*34,8*	0,76
45	*0*		*100*		*15,88*	3,177	*40,9*	0,90

Wie ersichtlich, ist die Temperaturveränderung zwischen 15 und 45° C im neutralen bzw. sauren Medium auf die Sporenkeimung von verschiedener

Wirkung. Während die Keimungsgeschwindigkeit bei pH 7,0 in Abhängigkeit von der Temperatur grosse Veränderungen aufweist, ist sie bei pH 5,1 von der Temperatur praktisch unabhängig. Demgegenüber wird die Keimungsfähigkeit (bzw. die minimale Lichtabsorption) bei pH 7,0 von der Temperatur kaum beeinflusst, während sie bei pH 5,1 stark von der Temperatur abhängig ist: bei 20° C ist die Keimungsfähigkeit am stärksten (der *M*-Wert am kleinsten), bei zunehmender Temperatur wird sie erheblich schwächer, bei 45° C hört die Keimung vollständig auf.

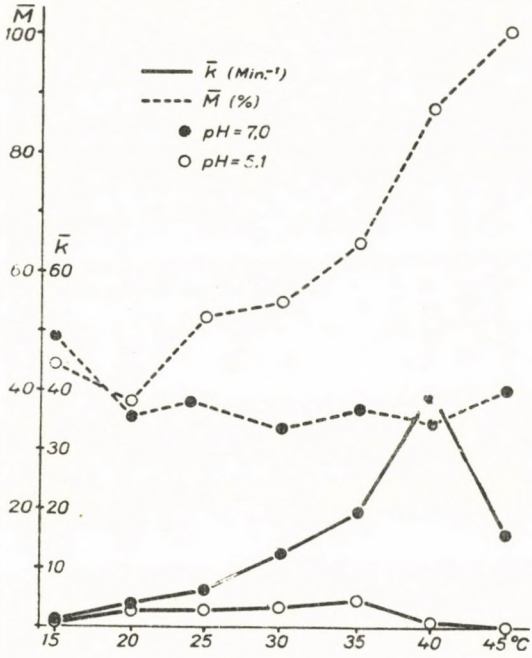


Abb. 8. Wirkung der Temperatur auf Geschwindigkeit und Ausmass der Sporenkeimung bei pH 5,1 bzw. 7,0

Wir untersuchten die Temperaturabhängigkeit der Sporenkeimungsgeschwindigkeit bei pH 7 und zeichneten den Logarithmus der Geschwindigkeitsmittelwerte als Funktion des Reziproks der absoluten Temperatur nach ARRHENIUS auf. Zwischen 20 und 40° C zeigte sich ein annähernd linearer Zusammenhang. Die Temperaturcharakteristik der Keimung (μ) ist unter Berücksichtigung der Angaben der in Abb. 9 dargestellten Ausgleichungsgeraden berechnet:

$$\mu = 2{,}3 \cdot R \cdot \frac{T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \cdot \log \frac{k_2}{k_1} = 2{,}3 \cdot 2 \cdot \frac{293 \cdot 313}{20} \cdot (1{,}56 - 0{,}58) = 21\,000$$

Den Temperaturkoeffizienten (Q_{10}) der Sporenkeimungsgeschwindigkeit errechneten wir folgendermassen:

$$\log Q_{10} = \frac{\log k_{40°C} - \log k_{20°C}}{2} = 0{,}49$$

$$Q_{10} = 3{,}1$$

Das Optimum der Keimungsgeschwindigkeit lag bei einer Temperatur von ungefähr 40° C.

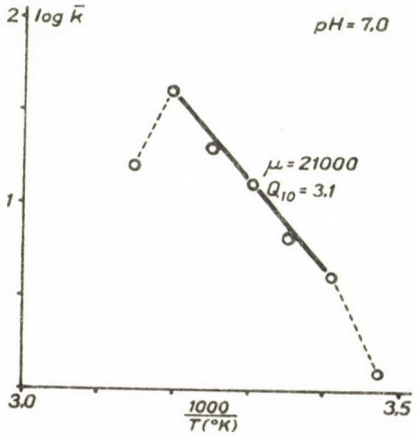


Abb. 9. Abhängigkeit der Sporenkeimungsgeschwindigkeit von der Temperatur (*Arrhenius*scher Zusammenhang)

Wirkung des pH auf die Keimung

Da wir zur Untersuchung der pH-Wirkung experimentelle Bedingungen benötigten, die im optimalen Nährmedium grosse Keimungsfähigkeit und gleichzeitig — im Interesse der Reproduzierbarkeit der Messungen — eine möglichst geringe Keimungsgeschwindigkeit ergaben, nahmen wir die Untersuchungen im weiteren bei 20° C vor.

Die Angaben über die Keimungsgeschwindigkeit *(k)* und das Lichtabsorptionsminimum *(M)* sind im Mittelwert von je 5 Parallelmessungen mit den mittleren Abweichungen des Mittelwertes auf Tabelle IV angegeben.

Auf Tabelle IV sind nicht nur die pH-Werte angeführt, bei denen die Untersuchung der Sporenkeimung erfolgte, sondern auch die Säuregehalte, deren Zugabe zwecks pH-Einstellung erforderlich war. Auf Abb. 10 und 11 sind die Mittelwerte der Sporenkeimungsgeschwindigkeit *(k)* bzw. Keimungsfähigkeit $(\bar{G})$ als Funktion des pH und der Säuredosierung dargestellt.

Wie die Abbildungen zeigen, hängen — die Essigsäure ausgenommen — Keimungsgeschwindigkeit und Keimungsfähigkeit im wesentlichen vom pH

Tabelle IV

Einfluss des pH und der Säurekonzentration auf die Keimung bei 20° C

Zugegebene Säure		pH	$\bar{k}$ (min^{-1})	$s_{\bar{k}}$ (min^{-1})	$\bar{M}$ (%)	$s_{\bar{M}}$ (%)
Benennung	Dosis (%)					
— (Kontrolle)	—	6,89	5,34	0,145	46,0	0,43
Salzsäure	0,042	4,06	0	—	98,3	0,28
	0,033	4,50	0,62	0,033	83,2	0,87
	0,028	4,78	1,63	0,029	59,1	0,59
	0,025	5,03	3,45	0,116	50,7	1,04
	0,014	6,02	4,35	0,011	44,8	0,59
	0,014	6,03	5,89	0,307	44,3	0,18
Phosphorsäure	0,115	4,00	0	—	100	—
	0,096	4,30	0,49	0,017	87,2	0,59
	0,082	4,60	1,15	0,032	82,7	0,84
	0,070	4,82	2,12	0,006	63,8	0,29
	0,063	5,05	3,36	0,096	56,2	1,74
	0,035	5,95	5,76	0,061	52,1	0,56
Milchsäure	0,174	4,00	0	—	104,7	0,17
	0,105	4,50	0,73	0,018	79,4	0,39
	0,083	4,73	1,71	0,071	62,2	0,66
	0,070	5,05	2,91	0,094	50,9	1,02
	0,037	5,98	5,44	0,190	47,9	0,47
	0,037	6,03	5,76	0,151	43,6	0,71
Weinsäure	0,113	4,03	0	—	97,9	0,47
	0,091	4,25	0,50	0,017	91,7	0,49
	0,074	4,52	1,36	0,031	67,9	0,68
	0,061	4,80	2,44	0,043	55,7	0,93
	0,052	5,06	3,13	0,085	50,3	0,86
	0,028	6,06	5,38	0,091	47,0	0,35
Zitronensäure	0,204	4,00	0	—	100,3	0,20
	0,114	4,47	0,55	0,022	83,8	0,77
	0,081	4,76	1,99	0,089	58,6	0,55
	0,067	5,00	3,47	0,084	50,5	0,58
	0,027	5,92	5,78	0,171	45,0	0,55
	0,026	6,06	5,81	0,083	43,3	0,62
Essigsäure	0,292	4,00	0	—	102,7	0,47
	0,167	4,27	0	—	101,2	0,38
	0,117	4,50	0	—	101,3	0,31
	0,071	4,75	1,20	0,027	68,0	0,35
	0,052	5,00	2,40	0,051	56,7	0,36
	0,021	5,98	6,07	0,243	51,4	0,62

ab. Bei gleichem pH ist, unabhängig vom Wert der zu seiner Erreichung benötigten Säuremengen, Keimung von ungefähr gleicher Stärke festzustellen.

Betrachten wir die zur gleichen Keimungshemmung erforderlichen Säuregehalte, so sehen wir, dass zu einer ungefähr 50%igen Hemmung der Keimungs-

geschwindigkeit am wenigsten von der Salzsäure benötigt wird und ständig zunehmende Mengen in der angegebenen Reihenfolge von nachstehenden Säuren : Essigsäure < Weinsäure < Phosphorsäure < Milchsäure < Zitronen-

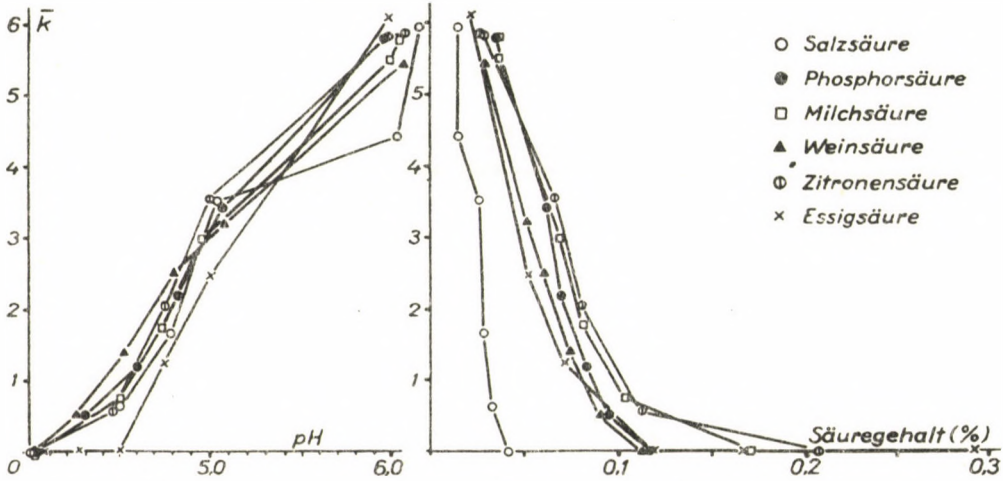


Abb. 10. Wirkung des mit verschiedenen Säuren eingestellten pH bzw. Säuregehalts auf die Sporenkeimungsgeschwindigkeit

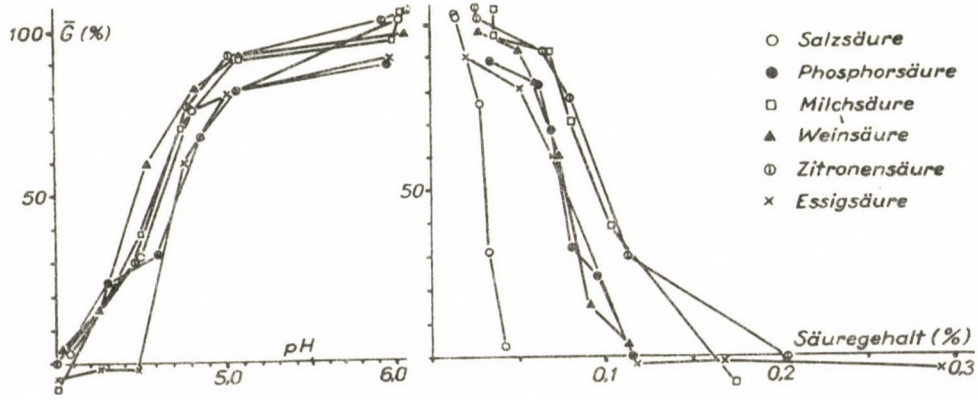


Abb. 11. Wirkung des mit verschiedenen Säuren eingestellten pH bzw. Säuregehalts auf die Keimungsfähigkeit

säure. (Zwischen den letzten drei Säuren bestand sonst in dieser Hinsicht kein grosser Unterschied.) Zur 50%igen Hemmung der Keimungsfähigkeit war die Reihenfolge der Säuren nach dem zunehmenden Säurebedarf folgende : Salzsäure < Phosphorsäure ≃ Essigsäure ≃ Weinsäure < Milchsäure < Zitronensäure.

Das zur vollständigen Hemmung notwendige pH war bei Essigsäure 4,5. wozu 0,117% Essigsäure benötigt wurde; bei den anderen Säuren war das hemmende pH 4,0, das bei der gegebenen Nährlösung mit folgenden Mengen der einzelnen Säuren erzielt werden konnte: Salzsäure 0,042%, Weinsäure 0,113%, Phosphorsäure 0,115%, Milchsäure 0,175%, Zitronensäure 0,204%.

Interessanterweise entwickelten sich bei der pH-Veränderung Sporenkeimungsgeschwindigkeit und Keimungsfähigkeit nicht parallel zueinander. Von pH 6 abwärts bis pH 5 ist in der Keimungsfähigkeit keine ernsthaftere Veränderung zu beobachten, während zwischen pH 5 und 4 ein plötzlicher Abfall eintritt. Bei der Keimungsgeschwindigkeit kommt es demgegenüber

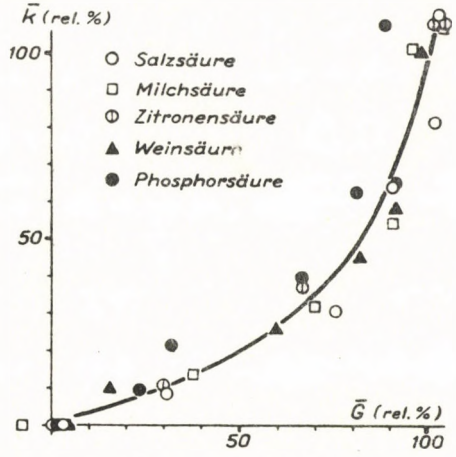


Abb. 12. Zusammenhang zwischen der Keimungsfähigkeit und der Veränderung der Keimungsgeschwindigkeit bei pH-Veränderung

bereits zwischen pH 6 und 5 zu einer ungefähr ebenso starken Senkung wie zwischen pH 5 und 4.

Die Zusammenhänge der nach pH-Veränderung in der Keimungsfähigkeit und Keimungsgeschwindigkeit zustande kommenden Veränderungen sind Abb. 12 zu entnehmen.

Hier haben wir die mit verschiedenen Säuren, bei unterschiedlichen pH gemessenen zusammengehörigen $\bar{k}$- und $\bar{G}$-Angaben im Prozentsatz (rel. %) der Kontroll-$\bar{k}$- und $\bar{G}$-Werte aufgezeichnet. Wie ersichtlich,

entspricht	der	10%igen	$\bar{G}$-Senkung	etwa	43%ige	$\bar{k}$-Abnahme		
„	„	20	„	„	„	53	„	„
„	„	30	„	„	„	65	„	„
„	„	50	„	„	„	80	„	„
„	„	70	„	„	„	90	„	„

Bewertung der Resultate

Wie im ersten Teil dieser Mitteilung nachgewiesen wurde, lässt sich die Tatsache, dass saure Lebensmittel durch Hitzebehandlung unter 100° C sterilisiert werden können, *quantitativ* nicht mit dem bei niedrigem pH in Erscheinung tretenden herabgesetzten Wert der Hitzetoleranz der Bakteriensporen erklären. Fassen wir diese Beobachtung mit den Ergebnissen des zweiten Teils unserer Mitteilung zusammen, so können wir feststellen, dass der niedrige Hitzebehandlungsbedarf der sauren Erzeugnisse durch die bei ungefähr pH 4 eintretende Hemmung der Sporenkeimung gut erklärt werden kann (zumindest in bezug auf aerobe, sporogene Bakterien; Untersuchungen mit anaeroben Keimen haben wir zwar nicht vorgenommen, doch ist von diesen ein ähnliches Verhalten zu erwarten).

Ferner konnten wir feststellen, dass pH 4,5 bei den meisten Säuren keine Sicherheit gegen die Sporenkeimung bietet und von den untersuchten Säuren nur bei Anwendung von Essigsäure ausreicht. Bei den anderen Säuren muss das Medium mindestens pH 4,0 aufweisen, damit die Keimung praktisch vollkommen gehemmt sei.

Zusammenfassung

Die Ergebnisse des ersten und zweiten Teils vorliegender Arbeit lassen sich folgendermassen zusammenfassen:

Die Veränderung der Hitzetoleranz von *Bac. cereus*-Sporen als Funktion des pH wurde in Phosphatgemischen zwischen pH = 3 und 7, ferner bei pH 3 auch im Milchsäure- und Zitronensäuremedium untersucht. Der Zusammenhang der dezimalen Reduktionszeit mit dem pH wird annähernd durch die Gleichung $D_{90} = 2{,}075\ \text{pH} - 1{,}684$ ausgedrückt. Bei pH 3 ergibt sich im zitronensäurehaltigen Medium dieselbe Hitzetoleranz wie im phosphorsäurehaltigen, dagegen ist die dezimale Reduktionszeit im milchsäurehaltigen Medium statistisch signifikant kürzer als im phosphorsäurehaltigen.

Die Wirkung der in der dezimalen Reduktionszeit auftretenden Senkung vermag vom Gesichtspunkt einer Verkürzung des Hitzebehandlungsbedarfes wegen der langsamen Hitzeeindringung in das Lebensmittel nur gehemmt zur Geltung zu kommen. Berücksichtigt man auch die Wärmeleitung, so kann eine ernsthaftere Senkung des Hitzebehandlungsbedarfes nur durch eine sehr starke Veränderung der dezimalen Reduktionszeit (z. B. 10- oder 100fache Senkung) hervorgerufen werden. Die vom Gesichtspunkt des Geschmacks bei einigen Lebensmitteln (z. B. grüne Erbsen, Lecsó) noch zulässige pH-Senkung (z. B. um 0,7) vermag unter Berücksichtigung der Hitzetoleranz der untersuchten Sporen keine beträchtliche Reduktion des Hitzebehandlungsbedarfes herbeizuführen.

Mit der die Verminderung der Lichtbrechungsfähigkeit der Bakteriensporen registrierenden POWELLschen Methode wurden unter den die Keimung der *Bac. cereus*-Sporen beeinflussenden Faktoren die Temperatur und Wasserstoffionenkonzentration in ihren Beziehungen zur Keimungsgeschwindigkeit und Keimungsfähigkeit untersucht. Zwischen 15 und 45° C wirkt die Temperaturveränderung bei verschiedenem pH unterschiedlich. Während die Keimungsgeschwindigkeit bei pH 7,0 als Funktion der Temperatur grosse Veränderungen aufweist, bleibt sie bei pH 5,1 praktisch unverändert. Die Keimungsfähigkeit ist demgegenüber bei pH 7,0 von der Temperatur unabhängig, verändert sich aber bei pH 5,1 stark mit dieser. Bei pH 7 ist im Bereich zwischen 20 und 40° C die Temperaturcharakteristik der Sporenkeimungsgeschwindigkeit $\mu = 21\,000$, ihr Q_{10}-Wert 3,1.

Die Wasserstoffionenkonzentration übt, bei 20° C untersucht, in der pH-Zone 4—7 auf die Sporenkeimung starken Einfluss aus. In Anwesenheit von Salzsäure, Phosphorsäure, Wein-, Zitronen- und Milchsäure sind Keimungsgeschwindigkeit und Keimungsfähigkeit praktisch nur vom pH abhängig, während bei Anwesenheit von Essigsäure auch eine spezielle Hem-

mungswirkung beobachtet werden kann. Im allgemeinen tritt die vollständige Hemmung bei pH 4 ein, in Anwesenheit von Essigsäure jedoch bereits bei pH 4,5.

Der geringe Hitzebehandlungsbedarf saurer Lebensmittelprodukte (z. B. Obstkonserven) ist nicht auf die niedrige Hitzetoleranz der Sporen bei kleinen pH-Werten zurückzuführen, sonderr auf die Hemmung der Sporenkeimung.

*

Auch an dieser Stelle danken wir Chemiker-Ingenieur L. NYESTE für die bei der Ausgestaltung des Kolorimeter-Reagensglasadapters gebotene Hilfe.

LITERATUR

1. BIGELOW, W. D. und ESTY, J. R.: J. Infect. Dis., **27**, 602 (1920).
2. CSIBA, L.: Élelmezési Ipar, **7**, 208 (1953).
3. HALVORSON, H. C. und ZIEGLER, N. R.: J. Bact., **25**, 101 (1932).
4. HACHISUKA, Y., ASANO, N., KATO, N., OKAJIMA, M., KITAORI, M. und KUNO, T.: J. Bact., **69**, 399 (1955).
5. MATHER, K.: Statistical Analysis in Biology, Methuen, London (1949) S. 129.
6. POWELL, J. F.: J. Gen. Microbiol., **4**, 330 (1950).
7. STUMBO, C. R., MURPHY, J. R. und COCHRAN, J.: Food Technol., **4**, 321 (1950).
8. TAGGART, R. und FARROW, F. D.: Food, **11**, 13 (1942).
9. VAS, K. und PROSZT, G.: Élelmezési Ipar, **8**, 230 (1954).
10. VAS, K. und PROSZT, G.: Acta Microbiol. Hung., **2**, 235 (1955).
11. VAS, K. und PROSZT, G.: erscheint demnächst.

A METHOD FOR THE EVALUATION OF THE QUANTAL RESPONSE OF MICROBIAL CULTURES TO CHEMICAL AND PHYSICAL AGENTS

By

K. VAS

Institute for Research in Canning, Meat Packing and Refrigeration, Budapest

(Received December 22, 1956)

Numerous methods are available for the evaluation of the action of chemical and physical agents on microorganisms. One of the main groups of these methods measures *quantitative* responses of the microbial cultures to these agents, *e. g.* changes in the number of viable cells or changes in growth rate, etc. The other group of methods uses *quantal* (alternative) responses of cultures, by determining doses which cause total destruction or inhibition (lack of growth), or doses which induce growth in (otherwise) deficient media, etc. The result of tests of the latter type is usually recorded by as + or — in the protocol.

In the study of such quantal responses, it is common experience that inconsistent results arise if the test is repeated several times : doses producing complete effect often show some variation. If the experiments are conducted by applying, at each dose level, a number of parallel samples (tubes, cans, etc.) it may be observed that between the doses showing no effect and total effect, resp., there are doses by which only a certain proportion of the identically treated samples are affected.

Evaluation of the results of such experiments was attempted by applying probit analysis [3].

The method was first employed in our laboratory for studying the combined effect of antibiotics and heat on the preservation of canned peas. Since sterilization of non-acid foods ($pH > 4{,}5$) may normally be carried out only at temperatures above 100° C, a procedure which causes undesirable organoleptic alterations, there were many attempts to reduce this heat treatment by the application of various chemicals. Recently, ANDERSEN and MICHENER [1] reported that peas may be sterilized at or below 100° C in the presence of minute amounts of the antibiotic subtilin. Although these claims could not be confirmed by other workers, they started a new line of research in canning technology. In the course of such experiments, it was found [6] that though many chemicals and antibiotics did not materially reduce the actual *heat resistance* of bacterial spores (as measured by the decimal reduction time), certain chemicals, nevertheless, increased the overall efficiency of heat treatment,

possibly by inhibiting, after processing, the germination of spores or the vegetative growth of germs [5].

In the present experiments the utilization of a nisin-like substance [4] was attempted. Since crystalline nisin was not available, a mixture of the culture fluids of KOOY and PETTE's *Str. lactis* strains R_1 and R_3 was applied. The strains were grown in doubly diluted sterilized milk for 1 day (1st Experiment) and for 3 days (2nd Experiment), resp., (1 : 1) mixtures of the cultures of strain R_1 and R_3 were then diluted with tap water in various proportions. These di-

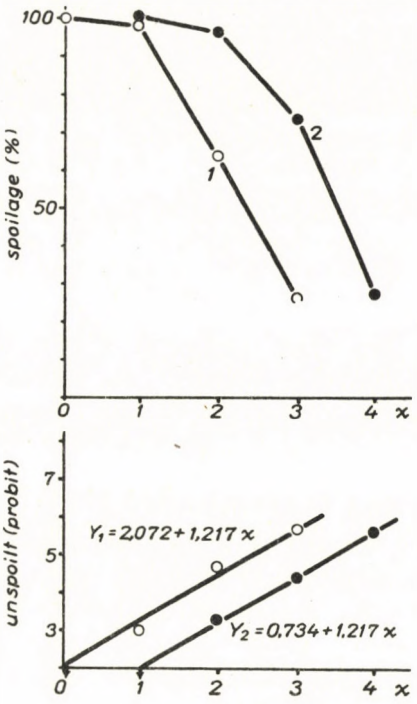


Fig. 1.

lutions were measured into test tubes containing 4,5 g of unblanched peas which have been shelled 24 hours previously, held at room temperature and thoroughly mixed in order to produce massive and uniform infection. In the completed tubes, the peas were covered with the above filling liquid. The dilutions were calculated so as to give concentrations of 1, 2, 4, 8 and 16 per cent of the original, mixed culture liquid in the samples. About 100 tubes were used at each dose level. All tubes, together with the controls (made up with pure tap water), were then plugged with cotton and steamed at 100°C for 35 minutes. pH determinations showed that — owing to the buffer capacity of peas — the culture liquids did not change the pH of the samples significantly. Even in the highest concentration of antibiotic, the pH was as high as 5,6, as compared

Table

	1 st Experiment				2 nd Experiment			
λ (%)	8	4	2	1	16	8	4	2
x (=$\log_2\lambda$)	3	2	1	0	4	3	2	1
n	100	100	100	100	100	100	101	108
r	74	37	2	0	72	27	4	0
p	74	37	2	0	72	27	4	0
S_{xx}	73,292				68,268			
S_{xy}	91,137				81,093			
S_{yy}	116,856				96,657			
Probit lines	$Y_1 = 2{,}072 + 1{,}217\,x$				$Y_2 = 0{,}734 + 1{,}217\,x$			
$\log_{10}ED_{50}$	0,724176				1,055095			
ED_{50}	5,30 %				11,35 %			
Relative potency (R)	2,14							
g	0,02							
95% fiducial limits of R	1,86 — 2,47							

Validity Tests:

1) *Linearity:* $S_{yy} - \frac{(S_{xy})^2}{S_{xx}}$

1 st Experiment : $3{,}528 = \chi^2_{(2)}$

2 nd Experiment : $0{,}328 = \chi^2_{(2)}$

Total : $3{,}856 = \chi^2_{(4)}$

2) *Parallelism:*

Pooled value : $3{,}965 = \chi^2_{(5)}$

Linearity component : 3,856

Parallelism : $0{,}109 = \chi^2_{(1)}$

Thus, deviations from linearity and parallelism are not significant. The calculations of ED_{50} and R are therefore valid.

Notation : λ: concentration of the antibiotic preparation in the samples (dose); x: logarithm (to base 2) of the dose; n: number of samples(tubes) at a given dose level; r: number of unspoilt samples; p the value of r in per cent.

with 6,4 in the controls. Thus, an interfering action of hydrogen ions was not to be expected.

The tubes were then incubated at 35°C for 3 months and subsequently held at room temperature for another 3 months. While a spoilage of 98—100 per cent occurred within 10—15 days in the two control series (70 per cent of the samples deteriorated in 2 days), samples treated with the antibiotic showed much less spoilage. Experimental data (as recorded after 6 months storage) and their probit analysis are given in the accompanying Table and Figure.

It may be seen that probit analysis of the data can be carried out and the relative potency of the two preparations can thus be estimated. It is clear that while in the first experiment 5,3 per cent of the antibiotic preparation would be sufficient to protect 50 per cent of the tubes from spoilage, in the second experiment 11,4 per cent would have been needed to secure the same level of protection. The culture liquid applied in the first experiment was about twice ($R = 2{,}14$) as active as that used in the second experiment.

It is known that, in the field of biological standardization [2], application of probit analysis is based on the assumption that the frequency distribution of tolerances (to a given drug) among individual subjects (laboratory animals, insects, etc.) is of the normal or, more frequently, of the log-normal type. In the case of the above experiment, it may be imagined that the observed log-normal distribution of "tolerances" of the tubes originates from a log-normal distribution of resistances — to heat and antibiotics — of the micro-organisms present in the uniformly infected samples.

A similar study of the effect and relative potency of other preservatives and preserving operations is in progress. It is to be expected that relative potencies of various preparations of the same antimicrobial agent may be established by the above procedure.

Acknowledgement: Thanks are due to G. PULAY of the Dairy Research Institute, Mosonmagyaróvár, for making available the strains of *Str. lactis* used in the experiments.

LITERATURE

1. ANDERSEN, A. A. and MICHENER, H. D.: Food Technol., **4**, 188 (1950).
2. BURN, J. H., FINNEY, D. J. and GOODWIN, L. G.: Biological Standardization, Oxford Univ. Press, 1952.
3. FINNEY, D. J.: Probit Analysis, Cambridge Univ. Press, 1947.
4. KOOY, J. S. and PETTE, J. W.: Netherl. Milk and Dairy J., **6**, 302, 317, 323 (1952).
5. VAS, K.: Élelmezési Ipar, **10**, 153 (1956).
6. VAS, K. and PROSZT, G.: Acta Microbiol. Hung., **2**, 235 (1955).

THE ROLE OF LIPIDS IN INDUCED CHLORAMPHENICOL RESISTANCE OF BACTERIA

By

L. VÁCZI, J. SZITA and V. CIELESZKY

State Institute of Hygiene, Budapest

(Received January 21, 1957)

Several recent data have indicated that the resistance induced *in vitro* to a single antibiotic makes the bacterium resistant to certain other antibiotics. This means that resistance would be non specific. Among *Staphylococcus pyogenes aureus* strains the incidence of *in vivo* resistance to several antibiotics was also repeatedly observed. Thus the phenomenon of cross resistance was demonstrated both *in vitro* and *in vivo* [2].

PANSY *et al.* [12] made an *E. coli* and a *Staphylococcus pyogenes aureus* strain resistant to chloramphenicol *in vitro*. They studied the appearance of aureomycin and terramycin resistance in connection with the increasing chloramphenicol resistance of these strains. After 7 passages in the presence of chloramphenicol the resistance of the *E. coli* strain exhibited a 21-fold increase to this substance, while an 11-fold and 6,5-fold increase of resistance was found to aureomycin and terramycin, respectively. Similar results could be obtained with the *Staphylococcus pyogenes aureus* strain. As to the possible cause of this cross-resistance, they supposed that the three substances might have a similar point of attack in the metabolism of bacteria. HERREL [8] demonstrated that *E. coli* and *Aerobacter aerogenes*, if resistant *in vitro* to terramycin, became also resistant to aureomycin and chloramphenicol, while no change could be observed in their streptomycin-sensitivity. GESON and FASAN [6] found unaltered sensitivity to neomycin in a chloramphenicol resistant *Staphylococcus pyogenes aureus* strain.

The present report summarizes the results of our studies concerning the specificity of resistance in chloramphenicol-resistant Gram-negative enteric bacteria *in vitro*, the cross-resistance and the sensitivity of resistant bacteria to desinfectants. Examination of ether soluble lipids of both sensitive and resistant bacteria was also carried out.

Materials and methods

Bacterium strains: *S. typhi*, *S. paratyphi B*, *E. coli* O : 111, *S. typhimurium* and *S. paratyphi C* strains were used.

Chloramphenicol resistance: At the beginning of our studies the chloramphenicol resistance of the strains used was about 2—2,5 μg/ml. To induce resistance to the strains, every

48 hours serial passages were made in bouillon containing increasing concentrations of chloramphenicol.

Testing of resistance to different antiobiotics. All tests were carried out in horse meat bouillon medium in 2 ml final volume. The actual antibiotic to be tested was added to the medium in twofold dilution series. As inoculum, 0,1 ml of a 1 : 100 dilution of a bouillon culture incubated for 24 hours was used. The results were read after 24 hours of incubation at 37° C.

Testing of desinfectants. The sensitivity of our strains to desinfectants was estimated according to the international standard method. As a stock, 1 : 100 dilution of phenol and 1 : 1000 of Nitrogenol *(hexacyedl pyridine bromide)* or Ryfen *(mercuri phenyl borate)* was made in meat extract bouillon. For testing, further dilutions were made, each in a volume of 10 ml and the tubes were incubated at 37° C for 18—20 hours. The result was now read by comparing the incubated tubes to uninoculated controls. Tubes exhibiting bacterial growth (turbidity) were designed as positive, those of unchanged appearance as negative.

Quantitative determination of the ether soluble lipid content of bacteria. Bacteria cultivated for 18—20 hours at 37° C on agar medium were washed off with saline and centrifuged at 3000 r. p. m. After two further washings in saline the final sediment was dried at 102° C for 24 hours and powdered.

The lipid content of the powder thus obtained was determined as follows. 0,5 to 1,0 g of powder dried to constant weight at 102° C was weighed in a defatted filter paper tube on analytic balance. The tube was then suspended in a modified Soxhlet apparatus and extracted with 20 ml of freshly distilled ethyl ether for 3 hours in a water bath of 50° C.

The extract was poured into a weighed cup. The Soxhlet flask was rinsed three times with about 5 ml of fresh ether each. The washings were added to the extract. After evaporation at room temperature, a solid, wax-like, yellowish material was obtained. The cup was now transferred to an exsiccator until its weight became constant and than weighed on a balance of $\pm 0{,}2$ mg accuracy.

Experimental

The chloramphenicol resistance of the strains described above could be gradually enhanced by repeated passages 48 hours each in bouillon containing increasing amounts of the drug. As a control, similar passages were carried out in bouillon with no chloramphenicol. Resistance to chloramphenicol and some other antibiotics (penicillin, terramycin, streptomycin) was determined after 6, 9, 12 and 18 passages. The results obtained with *S. paratyphi B* and *S. typhi* are presented in Tables I and II.

It was observed that, together with the chloramphenicol resistance of the strains, also the resistance to terramycin and penicillin exhibited some increase, while no such change occurred in the sensitivity to streptomycin. Aspecific resistance was found to increase slower than specific resistance. The sensitivity of the strains carried through the control passages was essentially unaltered.

Changes similar to those described above were also observed with chloramphenicol resistant strains of *S. typhimurium*, *S. paratyphi C* and *E. coli O* : 111.

The sensitivity of our chloramphenicol resistant strains to Nitrogenol and phenol was also examined. The results are presented in Table III.

The sensitivity of chloramphenicol resistant strains was decreased not only to some other antibiotics but also to the surface active desinfectant Nitrogenol. Sensitivity to phenol was increased.

Nitrogenol and other quaternary ammonium compounds are known to exert their effect by forming complexes with certain parts of the bacterial

Table I

Increase of resistance of S. paratyphi B by repeated passages in bouillon containing chloramphenicol

Antibiotic	Number of passages				
	0*	6	9	12	18
	Increase of inhibition expressed in multiples of the original				
Chloramphenicol	1	8	15	25	70
Penicillin	1	1	3	4,5	7
Terramycin	1	1	10	18	28
Streptomycin	1	1	1,5	1	0,75

* Original sensitivity of the bacterium.

chloramphenicol	2 μg/ml
penicillin	10 μg/ml
terramycin	25 μg/ml
streptomycin	16 μg/ml

Table II

Relative increase of resistance of S. paratyphi B by repeated passages in bouillon containing chloramphenicol

Antibiotic	Number of passages				
	0*	7	10	13	18
	Increase of inhibition expressed in multiples of the original				
Chloramphenicol	1	8	12	25	70
Penicillin	1	1	2	3	7
Terramycin	1	1	3	4	12
Streptomycin	1	1	0,5	1	0,5

* Original sensitivity of the bacterium.

chloramphenicol	2 μg/ml
penicillin	15 μg/ml
terramycin	2 μg ml
streptomycin	16 μg/ml

surface. This combination results in disintegration of the bacterial surface, with subsequent cytolysis, as demonstrated electronmicroscopically by SALTON *et al.* [14]. On the other hand, sensitivity to phenol is known to be connected

Table III

Sensitivity in vitro of chloramphenicol sensitive and resistant bacteria to Nitrogenol and phenol

Bacterium	Sensitivity	Bacteriostatic dilution 1 to	
		Nitrogenol	Phenol
S. paratyphi B	sensitive	17 000	600
	resistant	7 000	800
S. typhimurium	sensitive	17 000	600
	resistant	7 000	800
S. paratyphi C	sensitive	20 000	600
	resistant	15 000	> 800
S. typhi	sensitive	200 000	600
	resistant	70 000	> 1 400
E. coli O : 111	sensitive	100 000	400
	resistant	5 000	800

with the lipid content of the surface. The changes occurring in the Nitrogenol and phenol sensitivity of chloramphenicol resistant strains therefore suggest that the surface of bacteria, especially their lipid content, underwent certain changes in connection with the development of chloramphenicol resistance.

As it is known that bacterial phospholipids are precipitatable by protamine [10, 13], we studied the influence of this substance on some bacteria resistant to antibiotics *in vitro* or *in vivo*.

Table IV presents the chloramphenicol sensitivity of both resistant and sensitive forms of *E. coli O : 111* and *S. typhi 42A58* in the presence of 0 to 15 μg of protamine.

Table IV

Effect of protamine on the chloramphenicol sensitivity of E. coli O : 111 and S. typhi strains
(Effective concentration of the antibiotic in μg/ml)

Protamine concentration in μg/ml	S. typhi 42A58		E. coli O : 111	
	sensitive	resistant	sensitive	resistant
0	4,0	100	5,0	100
5	2,5	100	1,5	100
10	0,25	6	1,0	100
15	—	3	< 0,5	50

It was clearly observable that the effect of the antibiotic was enhanced by the presence of protamine. This synergetic effect was proportional to the concentration of protamine. In case of resistant strains more protamine was necessary.

Similar results are summarized in Table V, which presents changes observed in the sensitivity to different antibiotics of a resistant and a sensitive type of *E. coli O : 111* strain in the presence of 5 μg/ml protamine.

Table V

Changes in the antibiotic sensitivity of chloramphenicol resistant E. coli O : 111 strain in the presence of 5 μg/ml protamine

(Effective concentration of the antibiotic in μg/ml)

Antibiotic	Protamine in μg/ml	E. coli O : 111	
		sensitive	resistant
Chloramphenicol	0	5	100
	5	1,5	100
Penicillin	0	25	200
	5	10	200
Streptomycin	0	2,5	2,5
	5	2,5	2,5

It can be seen that by protamine the sensitivity of sensitive strains was enhanced not only to chloramphenicol but also to penicillin. No change was observed in the streptomycin sensitivity. The 5 μg/ml amounts of protamine were ineffective in influencing the antibiotic sensitivity of resistant strains.

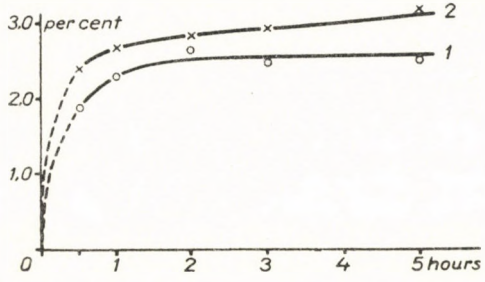
Table VI

Ether soluble lipid content of in vitro chloramphenicol sensitive and resistant bacteria

Bacterium	Sensitivity	Per cent lipid content
S. paratyphi B	sensitive	1,64
	resistant	3,64
S. typhimurium	sensitive	2,73
	resistant	3,19
S. paratyphi C	sensitive	2,8
	resistant	3,52
S. typhi	sensitive	3,19
	resistant	3,46
E. coli O : 111	sensitive	1,9
	resistant	2,3

The ether soluble lipid content of resistant and sensitive bacteria expressed in per cent of total dry weight, determined as described in the methodical part, is demonstrated in Table VI.

Of the strains tested, the resistant ones contained markedly higher quantities of lipid than the sensitive strains. The difference was the greatest in the case of *S. paratyphi B* (sensitive, 1,64 per cent ; resistant, 3,64 per cent) and the smallest in that of *S. typhi* (sensitive, 3,19 per cent ; resistant, 3,46 per cent). The error of our method, if carried out in duplicate under standardized circumstances, was ± 3 per cent. The total amount of lipids was extracted in 60 minutes and no further increasa of their amount was observed during the following two hours. Data concerning this observation are presented in the *Figure.*



abs.: time of extaction, ord.: lipid content —— × — ×: resist. strain — ○ —— ○: sensitive strain

Next, we examined the changes in the lipid content of bacteria in connection with the increase of their resistance to antibiotics. For that purpose a *S. paratyphi B* strain was tested at points when its resistance was increased 10, 25 and 70 fold. The results are summarized in Table VII.

Table VII

Relation of lipid content to degree of resistance in in vitro *chloramphenicol resistant S. paratyphi B*

Resistant strain		Sensitivity control
Degree of resistance in μg/ml	Lipid content in per cent of dry substance	
2	2,22	2,22
20	2,42	2,37
50	3,52	2,21
140	3,64	—

Parallel with the increase of chloramphenicol resistance, the lipid content of *S. paratyphi B* was found increased. No differences were found in the lipid content of sensitive bacteria of different control passages. Similar experiments were carried out with *S. typhi*. In this case the lipid content exhibited first a moderate decrease during the development of resistance. An increase of the amount of lipid started only after a marked loss of sensitivity had occurred. The lipid content of control bacteria passaged in common bouillon medium remained essentially unchanged as compared to the significant increase found in the resistant form of the same strain.

As to the lipids other than those extracted by ether, when ether extraction was followed by further extraction by chloroform an additional amount of lipid (1,5 to 2 per cent) was obtained. Further studies on the total lipid content and the composition of lipid fractions are in progress.

Discussion

The lipopolysaccharide-protein-lipid complex of Gram-negative enteric bacteria is known to be of basic importance in the biology of these organisms. All the S phase Gram-negative organisms tested have as far been found to produce the above complex in an essentially similar composition [7, 9, 11].

The lipopolysaccharide complexes of Gram-negative enteric bacteria contain two different lipid components. One is difficult to split *(lipid A)*, while the other is split easily *(lipid B)*. The latter was found by MORGAN and PARTRIDGE [11] to be a phosphatide soluble in ether and benzene. No definite biological activity of this lipid B has been demonstrated, though it seems most probable that it plays a certain role in the building up and permeability of the cell wall.

The quantitative and qualitative composition of the surface lipids of bacteria might have an influence on their antibiotic sensitivity. Studies by COGHILL *et al.* [3] and ABRAHAM *et al.* [1] on the activity of different types of penicillin have revealed similar facts, *i. e.* the activity of *azopenicillins* and that of *cephalosporin N* ran strictly parallel with their lipid solubility. According to COOPER [4], the penetration into the cell of an antibiotic may be enhanced by its lipid solubility. The same author suggests as possible causes of slowing down of penicillin binding in resistant bacteria, (i) the penicillin binding component (PBC) changes and becomes less reactive with penicillin ; (ii) the "steric hidrance" is more marked, thus adsorption becomes inhibited ; (iii) the permeability of the cell wall decreases, very probably because of changes occurring in the ratio of cell wall phospholipids, especially the lowering of lecithine content. Lecithine is supposed by FEW and SCHULMAN [5] to form the permeable layer for penicillin.

The increased lipid content of resistant bacteria is demonstrated further by the changes in their sensitivity to desinfectants. Thus the sensitivity of chloramphenicol resistant bacteria increases to the lipid soluble phenol, while against Nitrogenol, which exerts its action directly on the cell wall, sensitivity is decreased. The increased amount of lipids accumulates near, or on, the cell surface. As a result of protamine action the surface lipids are precipitated and the disorganized cell surface promotes the penetration of antibiotics. Tc achieve this effect, greater amounts of protamine are needed in the case of resistant bacteria. This supports the observation that the surface of resistant cells contains more lipid.

On the basis of the above we are inclined to suggest that, as a result of acquiring resistance to certain antibiotics, remarkable changes take place in the ether soluble lipid content *(lipid B)* of the cell. In the case of *S. paratyphi B*, the accumulation of lipids runs parallel with the increase of resistance. In *S. typhi* the lipid content is initially lowered while the strain is moderately resistant. Later, by acquiring resistance to amounts of more than hundred μg of the antibiotic substance, there is an increase of the lipid content.

Accordingly, quantitative, and perhaps also qualitative, changes occurring in the surface lipids governing the permeability of the cell wall are very probably responsible for the alteration lending resistance to the cells. Just in consequence of these changes is resistance non-specific, since at the same time they inhibit the entrance of a number of other materials. As chloramphenicol is known to exert its action on bacterial esterases, the alteration of cell lipids in connection with the developing of resistance is easily understood. This same mechanism seems, further, to give rise to cross-resistance, resulting in the formation of variants resistant to a considerable number of antibacterial substances.

As resistant bacteria seem to differ from sensitive ones only in the thickness of the surface lipid layer, one might suppose that the action of antibiotics on resistant bacteria might be enhanced by rendering these compounds more readily soluble in lipids.

Our results seem to testify the importance of certain changes in the surface lipid (especially *lipid B)* content of bacteria in connection with the development of resistance.

Summary

1) The chloramphenicol resistance *in vitro* of Gram-negative enteric bacteria was found to be aspecific. Bacteria adopted to chloramphenicol became resistant also to terramycin and penicillin, while their sensitivity to streptomycin was unchanged.

2) The sensitivity of chloramphenicol resistant bacteria to phenol (readily soluble in lipids) is enhanced while they are resistant to the action of the surface active Nitrogenol.

3) The effect of antibiotics (penicillin, chloramphenicol) is enhanced by protamine not only in the case of sensitive but also of resistant bacteria, though its amount must be higher in the latter case.

4) The ether soluble lipid content of resistant bacteria is higher than that of sensitive ones. The difference is the greatest in *S. paratyphi B* and the least in *S. typhi* strains.

5) The lipid fraction in question was completely extracted from bacteria by ether in 60 minutes and no further increase of its amount was observed after prolonged extraction.

6) The amount of lipids increased parallel with the development of resistance in *S. paratyphi B* strains while no such changes occurred in the control bacteria. The lipid content of *S. typhi* after an initial decrease exhibited an increase parallel with the development of resistance.

7) Our results suggest the basic importance of the increased surface lipid content of bacteria in the development of resistance. This problem has been discussed in detail.

LITERATURE

1. Abraham, E. P., Crawford, K., Newton, G. G. F., Burton, H. S. and Hale, C. W.: Nature **171**, 343 (1953).
2. Bergersen, F.: Nature **167**, 996 (1951).
3. Coghill, R. D., Stodola, F. H. and Wactol, J. L.: Chemical Modification of Natural Penicillins. Princeton University Press, Princeton N. Y., p. 680.
4. Cooper, P. D.: Bact. Rev. **20**, 28 (1956).
5. Few, A. M. and Schulman, I. H.: Biochem. Biophys. Acta **10**, 302 (1953).
6. Geson, A. M. and Fasan, D. M.: Science **114**, 422 (1951).
7. Goebel, W. F., Binkley, F. and Perlman, E.: J. Exp. Med. **81**, 315 (1945).
8. Herrel, W.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **53**, 488 (1950).
9. Miles, A. A. and Pirie, N. N.: Brit. J. Exp. Pathol. **20**, 83 (1939).
10. Morgan, W. T. J. and Partridge, S. M.: Biochem. J. **34**, 196 (1940); **35**, 1140 (1941).
11. Morgan, W. T. J. and Partridge, S. M.: Brit. J. Exp. Pathol. **23**, 151 (1942).
12. Pansy, F. E., Khan, P., Pagano, J. F. and Donovick, R.: Proc. Soc. Exp. Biol. **75**, 618 (1950).
13. Pittman, M.: J. Bact. **47**, 427 (1944).
14. Salton, M. R. J., Horne, R. W. and Cosslett, V. E.: J. Gen. Microbiol. **5**, 405 (1951).

SEROLOGICAL TYPING OF PROTEUS STRAINS. SENSITIVITY OF SEROTYPES TO ANTIBIOTICS*

By

B. LÁNYI

State Institute of Hygiene, Budapest

(Received February 26, 1957)

The author's studies on the occurrence of *Proteus hauseri* serotypes in the faeces of infants with enteritis and in faecal samples of other origin have been published earlier [1].

These examinations have shown that some serological types are much more frequently found in infantile enteritis than others, while the incidence of the emerging types is not more frequent in normal adults than that of other types.

These observations have called the attention to further problems. One of these was the resistance of faecal strains to antibiotics. Some of these drugs have widely been used in this country for years, and strains, especially the pathogenic ones, might easily have had chance to require resistance against them. Serological examination of strains from pathological materials other than faeces seemed to be another way to assess the pathogenic role of certain serotypes.

Materials and methods

1. Isolation of cultures. Pathological materials were sent to this laboratory for routine bacteriological examination by a number of hospitals and physicians. Samples of nonfaecal origin were streaked directly on plates of simple agar and blood agar and were inoculated into serum-broth. Depending on the origin of the material other media were also used. (Endo's-, brilliant greenand chocolate-agar, media for anaerobes, etc.)

2. Serological and biochemical methods. Determination of antigens and biochemical reactions were performed as previously described [1]. According to recent investigations, the separation of *Proteus* strains occurring in mixed culture is not always successful on bismuth sulfite agar. This technique has led to some incorrect results. The four indole producing *P. mirabilis* strains reported in our previous work were in reality mixtures of biochemically typical *P. mirabilis* and *P. morganii* strains. The successful separation of such cultures is possible by using desoxycholate citrate agar.

3. Determination of sensitivity to antibiotics. For determining sensitivity to *penicillin*, *streptomycin*, *chloramphenicol* and *oxytetracycline* the multiple plate technique of FÜRÉSZ *et al.* was used [2]. This method involves the preparation of blood-agar plates containing four or five different concentrations of each of the antibiotics.

To be able to test 8 different cultures on a single plate, the following procedure was carried out. Four diagonal lines were streaked across the surface of the agar by means of a

* Presented at the Staff Meeting of the State Institute of Hygiene, Budapest, October 8, 1956.

thin paint-brush. Prior to each stroke the brush was dipped into a saturated aqueous solution of silver nitrate. Thus silver compounds formed 3 to 6 mm wide stripes dividing the plates into 8 separate sectors and preventing the cultures from swarming from one sector over another [3]. Inoculations were made with a loopful of 1 : 100 diluted 24 hour broth culture onto the middle of each sector. Readings were made after an incubation of 20 to 24 hours at 37° C, considering the concentration of antibiotic completely inhibiting growth. Thus an organism was classified as follows.

Concentration inhibiting growth

	Penicillin unit/ml	Streptomycin μg/ml	Chloramphenicol μg/ml	Oxytetracycline μg/ml
Very sensitive (VS)	—	—	4	—
Sensitive (S).....	0,25	4	16	4
Moderately sensitive (MS)	1	16	64	16
Relatively resistant (RR)	16	64	—	64
Resistant (R)	>16	200	>64	>64
Highly resistant (HR).....	—	>200	—	—

The disc method served for testing sensitivity to *chlortetracycline*. The drug was impregnated into paper discs at concentrations of 5 μg, 10 μg and 30 μg. The paper discs were placed on the surface of an agar plate previously seeded with a 1 : 100 dilution of the 24 hour broth culture of the strain. Organisms were classified as follows. *Sensitive*, zones of inhibition around all discs ; *moderately sensitive*, zones of inhibition around discs with the higher concentrations ; *relatively resistant*, zone of inhibition around disc of highest concentration ; *resistant*, no zones of inhibition around any disc.

Results

1. *Results of examination of Proteus strains from pathological material other than faeces.* Proteus and related organisms were isolated from 363 different patients. Cultures were made often more than once and altogether 408 strains were isolated.

Table I records the occurrence of *Proteus* and other, additionally isolated pathogenic or potentially pathogenic organisms in various materials. Urinary and ear-nose-throat infections seem to be the commonest source of *Proteus*. Materials from the latter cases were mostly obtained from infections of the ear, and from a considerable number of them *Proteus* and *Pseudomonas pyocyanea* or other *Pseudomonas organisms* were simultaneously cultured. In urinary infections *Pseudomonas* was not common. These cases frequently yielded lactose-fermenting enteric bacteria *(Escherichia, Klebsiella)*, in addition to *Proteus*. Simultaneous occurrence of real pyogenic bacteria and *Proteus* was uncommon.

Table II shows the frequency of *Proteus* strains of different biochemical groups in urinary, ear-nose-throat and other specimens. Only strains isolated at the first examination of patients are included. *P. hauseri* strains were much more frequent than others. Within the *P. hauseri* group the incidence of *P. mirabilis* was considerably higher than that of *P. vulgaris*.

Table I

Incidence of Proteus in pure culture and in addition to other bacteria in pathological materials on first isolation*

Total number of patients, 363

Pathological material	No. of patients	Proteus in pure culture	Proteus in addition to				
			Pseudo-monas	Escherichia, Klebsiella	Staph. aureus haem.	Other organisms	Two or more organisms
Urine	136	55	5	70	1	1	4
Ear, nose and throat	136	33	64	14	11	1	13
Sputum	24	17	3	4	—	—	—
Duodenal juice ...	20	5	1	12	1	—	1
Pus	16	8	1	3	3	—	1
Wounds	14	3	2	3	2	—	4
Miscellaneous	17	9	1	2	3	—	2

* Including *Proteus vulgaris*, *mirabilis*, *morganii*, *rettgeri* and *Providencia*.

Table II

Frequency of Proteus and related organisms in pathological materials on first isolation

Total number of patients, 363

Biochemical group	No. of patients	Urine	Ear, nose and throat	Other materials
P. hauseri				
1. *P. vulgaris*	40	10	11	19
2. *P. mirabilis*.....	296	115	119	62
P. morganii	19	8	3	8
P. rettgeri	3	2	—	1
Providencia	5	1	3	1
Total	363	136	136	91

Of the *P. hauseri* strains from urine, 66,4 per cent ; from ear-nose-throat specimens, 78,4 per cent ; and from other materials, 55,5 per cent, could be typed according to KAUFFMANN and PERCH's antigenic schema.

From the data obtained by the serological typing of *P. hauseri* strains, Table III has been prepared. It shows the frequency of *P. mirabilis* strains belonging to the most often occurring O antigenic groups. *P. vulgaris* strains have been omitted, as the few strains belonged to relatively numerous antigenic types.

Only isolations at the first examination of patients have been included.

Table III

Distribution of the most frequently occurring P. mirabilis O groups on first isolation
Total number of patients, 296

O group	Urine	Ear, nose and throat	Other materials
O : 3	25	30	12
O : 6	7	4	1
O : 10	9	6	7
O : 13	10	13	4
O : 26	7	11	4
O : 28	4	16	4
Other O groups	53	39	30
Total	115	119	62

From Table III it is clear that O group 3 strains were more frequent than strains of any other O group. Among *P. hauseri*, 25 (20,0 per cent) out of 125 urinary strains, 30 (23,0 per cent) out of 130 ear-nose-throat strains and 12 (14,8 per cent) out of 81 strains of other origin belonged to O group 3. The latter strains were isolated from various materials shown in Table I. Because of the small number of such strains, their O group distribution has not been tabulated according to different pathological conditions. The above percentages concern *P. hauseri*. Considering the incidence of O group 3 strains among biochemical type *P. mirabilis*, the percentage frequencies were 21,7 for urinary, 25,2 for ear-nose-throat and 19,3 for other strains. O : 10, O : 13, O : 26 and O : 28 strains were also frequent in every material.

30 patients were subsequently examined on 2 to 5 occasions. The subsequent isolations yielded the same serological and biochemical type in 19 cases. From the remaining 11 patients other types were also isolated. The materials examined originated from institutions situated mostly in the area of Budapest. Urine specimens were obtained from 47, ear, nose and throat specimens from 39 different institutions. Generally, O group 3 strains were the commonest regardless of where the materials were sent from to this laboratory. This fact excludes the possibility of a virtual result due to nosocomial infection. In two hospitals, however, nosocomial infection was suspected. In one of them, 26 : 3 strains were isolated from 5 out of 18 patients. In another hospital, among 41 out-patients suffering from ear disease, 11 were infected with serotype 28 : 2. Unlike other 28 : 2 cultures, ten of the strains were highly resistant to streptomycin.

Table IV shows the result of the serological and biochemical analysis of 380 *P. hauseri* strains from non-faecal material. Table IV includes all strains

Table IV

P. hauseri serotypes from non-faecal material

Total number of strains, 380

Serotype	Biochemical type	No. of strains	Serotype	Biochemical type	No. of strains
1 : 1	1	1	26 : 3	2	23
3 : —	2	10	26 : ND	1	2
3 : 1	2	65	26 : ND	2	1
3 : 2	2	5	27 : 2	2	6
3 : 6	1	1	28 : —	2	1
4 : 1	1	1	28 : 2	2	22
6 : 3	2	14	28 : 3	2	2
9 : 1	2	1	28 : 6	2	1
10 : 1	2	13	30 : 1	2	3
10 : 2	2	6	30 : 2	2	2
10 : 3	2	4	31 : 1	1	2
10 : 4	2	2	31 : 2	2	12
11 : 3	2	1	32 : 1	1	1
12 : 1	1	3	33 : 1	2	1
13 : 1	2	14	33 : 2	2	1
13 : 2	2	8	33 : 4	2	1
13 : 3	2	4	33 : ND	2	1
13 : ND	2	1	38 : 6	2	1
15 : 1	1	1	ND : —	2	1
15 : 3	2	1	ND : 1	1	5
19 : 1	1	1	ND : 1	2	17
20 : 1	2	2	ND : 2	1	1
20 : 2	2	3	ND : 2	2	29
21 : 1	1	3	ND : 3	2	20
23 : 1	1	1	ND : 5	1	1
23 : 1	2	1	ND : 5	2	2
23 : 2	2	3	ND : 6	1	4
23 : 3	2	6	ND : 6	2	1
24 : 1	2	2	ND : 13	2	1
24 : 3	2	1	ND : ND	1	9
24 : 13	2	2	ND : ND	2	12
26 : —	2	2	Unstable in saline	1	3
			Unstable in saline	2	8

Key : Serotype = Numbers ahead of colon mean the O antigens, those after colon the H antigens.
Biochemical type 1 = *P. vulgaris*, 2 = *P. mirabilis*, ND = New antigens, not yet determined.

isolated on both the first and the subsequent examinations of patients. Of the strains, 253 (66,6 per cent) could be included in the KAUFFMANN—PERCH schema. 8 strains (2,1 per cent) fell into types representing new combinations of known O and H antigens. Of these types, 15 : 3, 28 : 6 and 33 : 2 were first isolated by the author from faeces [1]. Types 3 : 6, 33 : 1, 33 : 4 and 38 : 6 are new ones. 108 strains (28,5 per cent) contained new O and/or H antigens. 11 strains (2,8 per cent) were unstable in saline.

In addition to 380 *P. hauseri* strains, 28 strains were isolated, of which 19 belonged to *P. morganii*, 3 to *P. rettgeri* and 6 strains to the *Providencia* group.

On biochemical analysis, most strains gave typical reactions. Of the *P. morganii* strains 2 fermented xylose irregularly. Of the *P. mirabilis* strains 14 fermented xylose late or not at all, 3 did not produce H_2S. Of the *P. vulgaris* strains 1 fermented maltose late.

The result of the investigations further confirms that antigenic structure and biochemical properties of *P. hauseri* strains are strongly connected, that is, strains belonging to the same serotype have so far almost unexceptionally belonged to one biochemical type (PERCH [4], LÁNYI [1]). By the author, one exception has been found, namely strains of both biochemical type *(P. vulgaris* and *mirabilis)* belonging to serotype 23 : 1. In the course of the present investigations a strain was isolated which contained H antigen 2 and belonged to *P. vulgaris*. This is a very unusual finding, since so far both PERCH's and the author's strains containing H antigen 2 all belonged to *P. mirabilis*.

2. *Sensitivity of Proteus strains to antibiotics. Proteus* strains of faecal origin were isolated earlier from different examination groups. In the present work a number of strains isolated from healthy subjects mostly adults and from infants with enteritis were examined for susceptibility to *streptomycin*, *chloramphenicol* and *oxytetracycline*. All non-faecal strains isolated in the course of the present study were examined as to their behaviour against these antibiotics and, in addition, against *penicillin*, and *chlortetracyline*. Some other antibiotics effective against Gram negative bacteria were not widely available in Hungary in the past years and have therefore not been included. Table V presents a comparison of the sensitivity of *P. vulgaris*, *mirabilis* and *morganii* strains to three antibiotics.

Against *P. vulgaris* strains, *streptomycin* and *chloramphenicol* were almost invariably active. Many of the chloramphenicol sensitive strains were inhibited by this drug at a low concentration (4 μg per ml). A considerable part of *P. vulgaris* strains proved to be sensitive to *oxytetracycline*, but several resistant or relatively resistant cultures also occurred. The examination groups did not differ significantly in the susceptibility of *P. vulgaris* strains against any of the antibiotics tested.

There was a considerable difference between the normal and the pathological material regarding the sensitivity of *P. mirabilis* strains to *streptomycin*.

Table V

Antibiotic sensitivity of Proteus strains according to examination groups

Total number of strains examined, 899

Biochemical group	Examination group	Number of strains	*Streptomycin*				*Chloramphenicol*				*Oxytetracycline*			
			S	MS	RR, R	HR	VS	S	MS	R	S	MS	RR	R
P. vulgaris	Infants with enteritis .	28	24	1	1	2	11	16	—	1	17	2	4	5
	Normal individuals ...	44	42	1	1	—	23	20	1	—	20	3	12	9
	Non-faecal material ...	40	31	5	2	2	28	11	1	—	15	6	14	5
P. mirabilis	Infants with enteritis .	275	134	25	5	111	58	208	6	3	5	3	46	221
	Normal individuals ...	53	49	2	—	2	2	50	1	—	7	1	3	42
	Non-faecal material ...	340	144	75	7	114	33	270	32	5	7	3	5	325
P. morganii	Infants with enteritis .	70	29	2	7	32	2	40	24	4	64	1	1	4
	Normal individuals ...	30	30	—	—	—	9	19	2	—	26	—	—	4
	Non-faecal material ...	19	14	3	—	2	3	11	5	—	14	2	—	3

Abbreviations: VS = very sensitive; S = sensitive; MS = moderately sensitive; RR = relatively resistant; R = resistant; HR = highly resistant

Most *P. mirabilis* cultures from healthy individuals were sensitive to *streptomycin*, while 40,3 per cent of strains from cases of infantile enteritis and 33,5 per cent of strains from non-faecal material exhibited an extreme resistance to this antibiotic. No difference was found between the examined groups in the sensitivity of *P. mirabilis* to the two other antibiotics. Unlike *P. vulgaris*, most of the *P. mirabilis* strains were resistant to *oxytetracycline*.

Less than half of the *P. morganii* strains from infantile enteritis proved to be sensitive to *streptomycin*, while strains from healthy individuals were uniformly *streptomycin* sensitive. Most of the *P. morganii* strains were sensitive to *chloramphenicol* and *oxytetracycline*.

Only non-faecal strains were examined for sensitivity to *penicillin* and *chlortetracycline*. Five out of 40 *P. vulgaris*, 169 out of 340 *P. mirabilis*, and 2 out of 19 *P. morganii* strains were relatively resistant to *penicillin*. The remain-

Table VI

Streptomycin sensitivity of Proteus strains belonging to the most frequently occurring P. mirabilis O groups

Examination group	O group	Number of strains	*Streptomycin*			
			S	MS	RR, R	HR
Infants with enteritis	O : 3	93	24	8	3	58
	O : 10	18	15	3	—	—
	O : 13	28	19	8	1	—
	O : 26	51	—	—	—	51
	Other	85	76	6	1	2
Normal individuals	O : 3	4	3	1	—	—
	O : 10	10	10	—	—	—
	O : 13	9	9	—	—	—
	O : 26	2	—	—	—	2
	Other	28	27	1	—	—
Non-faecal material	O : 3	80	12	12	1	55
	O : 10	25	19	6	—	—
	O : 13	27	13	13	—	1
	O : 26	26	5	1	—	20
	Other	182	95	43	6	38

Abbreviations : S = sensitive
MS = moderately sensitive
RR, R = relatively resistant or resistant
HR = highly resistant

ing cultures were all *penicillin* resistant. The action of *chlortetracycline* on the various strains was very similar to that of *oxytetracycline*.

The antibiotic sensitivity of *P. hauseri* strains was compared with their serological behaviour. The examinations showed that antibiotic sensitivity and antigenic structure of *P. vulgaris* cultures was not connected in any way. As to *P. mirabilis*, no such connection could be demonstrated among the various serotypes as to their sensitivity to *chloramphenicol* and the *tetracyclines* ; however, a striking association was found between serological behaviour and streptomycin sensitivity.

Table VI shows the streptomycin sensitivity of *P. mirabilis* strains belonging to different O antigenic groups. It is clear that a high percentage of O group 3 strains, and most strains belonging to O group 26, were highly resistant to that drug. The number of O group 3 and 26 strains isolated from normal faecal samples was too small to allow any satisfactory conclusions. It was impossible, however, to examine more *P. mirabilis* O : 3 and O : 26 cultures from normal faeces, since no more such strains had been isolated during the author's previous work from as much as 7521 samples. Among faecal strains other than O : 3 and O : 26, practically none was highly resistant to *streptomycin*. Among those originating from non-faecal material, however, a number of streptomycin resistant strains were encountered which belonged to neither of these serotypes.

Further remarkable observations were made by examining the type distribution and streptomycin sensitivity of O group 3 strains. In O group 3 most of the non-motile strains and strains possessing H antigen 1 were highly resistant to *streptomycin* (28 out of 33 *3 : —* strains and 83 out of 123 *3 : 1* strains). On the contrary, out of 21 only 2 strains were found to be resistant within antigenic type 3 : 2.

It should be noted that O : 3 strains corresponded to the extended O antigenic formula 3*a*, 3*b*, while O : 26 strains to the formula 26*a*, 3*b*. Accordingly, strains of O group 3 and 26 were related, sharing a common O antigen, 3*b*.

Discussion

In the author's previous and present studies of *P. hauseri* strains from various pathological materials those belonging to O groups 3 and 26 were most frequently isolated.

Of 880 *P. hauseri* strains from infantile enteritis, 32,1 per cent belonged to O group 3 ; 20,6 per cent to O group 26. In faeces from normal adults the corresponding percentages were 3,0 for the O : 3, and 2,5 for the O : 26 group. From a small number of faeces from normal infants neither of these strains were isolated. In non-faecal material, O group 3 strains were most commonly met with, the percentage frequencies being in urinary infections 20,0; in ear-

nose-throat infections 23,0 ; in other infections 14,8. From the non-faecal specimens O group 26 strains were less frequently isolated.

Being very often resistant to streptomycin, *Proteus* strains belonging to the two antigenically related serogroups O : 3 and O : 26, considerably differed from others. Within these groups only serotypes 3 : —, 3 : 1 and 26 : 3 were frequently streptomycin resistant. The occurrence of these three types in faeces from healthy adults was very low (altogether 2,0 per cent). On the contrary, from cases of infantile enteritis they were isolated in 48,7 per cent. In non-faecal materials also these types dominated among O : 3 and O : 26 strains.

The occurrence of *Proteus* serotypes has been studied by some workers, but little attention has been paid to their frequency in well-defined groups of pathological materials. Thus a comparison between our results and those in the literature can hardly be made. KAUFFMANN and PERCH demonstrated O group 3 strains in 4,5 per cent of their cases [5], chiefly from faecal specimens. Of WINKLE's 961 *Proteus* strains 58 can be regarded as belonging to O group 3 [6, 4]. Strains corresponding to O group 3 were not unfrequently found by BELYAVIN *et al.* among a comparatively small number of *Proteus* cultures from non-faecal material [7].

A considerable number of reports give figures for the antibiotic sensitivity of *Proteus* ; few of them distinguish, however, between the various biochemical groups. Only PERCH has carried out such examinations on a larger scale, considering the sensitivities according to both biochemical groups and serotypes [8]. She worked with strains isolated before the era of antibiotics and found them uniformly sensitive to streptomycin and chloramphenicol. As to other drugs, she found a difference between the behaviour of *P. vulgaris* and *mirabilis* to oxy- and chlortetracycline. This finding is in accordance with the result of the present work. PERCH has pointed out that strains belonging to the same serotype behaved similarly against tetracyclines. In the present work no such clear associations could be demonstrated.

The frequent occurrence of *Proteus* O group 3 strains in pathological materials seems to indicate that they are more frequently concerned in various infections than other serogroups. The fact, however, that members of the O group 3 are mostly resistant to streptomycin, must not be ignored.

Some hypotheses can be advanced to explain this behaviour of O : 3 strains. Being pathogenic organisms, O group 3 strains might more often have met with streptomycin than other *Proteus* strains. Having once developed resistance, these resistant strains may cause further infection. Alternatively, the frequent occurrence of O : 3 and O : 26 strains may be explained by the possibility that they were isolated from patients receiving streptomycin treatment However, O : 3 strains, which were less frequently resistant to streptomycin were more frequently isolated than the nearly always resistant O : 26 strains Secondly, O : 3 strains were more frequent in the faeces from infants with en

teritis than from other infections, although more of the latter cases had probably been treated with streptomycin. Thirdly, it is questionable why exactly O group 3 and 26 strains have developed resistance, although the possibility of a difference between serotypes in this respect cannot be excluded.

As to the clinical use of antibiotics against *Proteus* infection, the present sensitivity tests suggest that chloramphenicol is the therapeutic agent of choice in patients with this type of infection. To streptomycin the strains are either resistant or probably easily develop resistance against it. The tetracyclines may be regarded as active only against the rarely occurring *P. vulgaris* and *morganii* infections.

From the present investigation it may be concluded that more work must be done before the aetiological role of certain *Proteus* serotypes can be determined.

Summary

A biochemical and serological study of 408 *Proteus* strains isolated from non-faecal materials from 363 patients has been carried out. Of *P. hauseri* strains from urinary infections, 20,0 per cent; from ear-nose-throat infections, 23,0 per cent; and from other infections, 14,8 per cent belonged to O antigenic group 3.

Antibiotic sensitivity testing of 899 faecal and non-faecal *Proteus* strains showed that strains belonging to *P. mirabilis* O : 3 and O : 26 groups were mostly highly resistant to streptomycin, while strains of other O groups were markedly less frequently resistant to this antibiotic. The possibility of the pathogenic role of certain *Proteus* serotypes has been discussed.

LITERATURE

1. Lányi, B.: Acta Microbiol. Hung. **3**, 417 (1956).
2. Fürész, I. and Kubinyi, M.: Orvosi Hetilap **95**, 7 (1954).
3. Sulyok, D.: Personal communication.
4. Perch, B.: Acta path. Scand. **25**, 703 (1948).
5. Kauffmann, F. and Perch, B.: Enterobacteriaceae (Kauffmann), Ejnar Munksgaard, Copenhagen, 1954. p. 308.
6. Winkle, S.: Zbl. Bakt. **151**, 494 (1944—45).
7. Belyavin, G., Miles, E. M. and Miles, A. A.: J. gen. Microbiol. **5**, 178 (1951).
8. Perch, B.: Acta path. Scand. **35**, 278 (1954).

ELECTRONMICROSCOPIC EXAMINATION OF COMPLETE AND INCOMPLETE INFLUENZA VIRUS PARTICLES

By

I. HOLLÓS

State Institute of Hygiene, Budapest

(Received March 18, 1957)

The term incomplete influenza virus is used as a definition of particles possessing haemagglutinating and enzymatic activities [3], while essentially lacking infectivity. In the ultracentrifuge the sedimentation of incomplete particles was found to be slower than that of the complete virus [1, 2]. No such difference was observed between infective and inactivated, though haemagglutinating complete virus particles [6]. The antigenic structure is the same of both the complete and incomplete viruses; but the latter is able to interfere with the formers multiplication [4], while its mouse toxicity is only moderate [5*a*, *b*]. Virus suspensions of high incomplete particle content contain less ribonucleic acid [7] and more lipid [8] as compared to a suspension of complete virus.

Incomplete particles seem to represent a certain phase of the intracellular virus multiplication process and are supposed to be transformed into complete virus under normal conditions [11, 12]. Extracellular appearence of incomplete particles in higher concentration is achieved only by the use of certain special inocula [9, 10].

The electronmicroscopic studies of BIRCH—ANDERSON cited by UHLER and GARD [8] did not reveal any difference between complete and incomplete particles. On the other hand, WERNER and SCHLESINGER [13] observed that the diameter of incomplete particles was longer and their electron density lower than those of complete virus. Also pleomorphism and flattening of incomplete particles was found. Similar observation was made by VOSS and WRENGEL [14]. Numerical data have been published only concerning the diameter of different particles and none are available on their electron density.

In the studies presented below we measured the diameter and electron density of complete virus and of two differently prepared types of incomplete particles. Examinations were also carried out to establish whether these characteristics of the complete virus could be changed by inactivation at 37°C. As to the differences observed in the electron density of different particles, the role of their flattening during preparation and that of some possible other factors were also studied.

Materials and methods

Virus strains. The strains *PR*8 (Influenza A), *Lee* (Influenza B) and *Budapest (Bp)* /449 (Influenza A prime) [15] were used. Strains have been maintained for years by serial allantoic passages in our laboratory. The passage numbers given represent only the passages made during the present experiments.

Standard complete virus (St). To obtain St virus, 0,1 ml of a 10^{-3} dilution of the passage material was inoculated into the allantoic cavity of 11 day old embryonated eggs. Infected eggs were incubated at 35° C for 20 hours if PR8, for 24 hours if Lee, and for 22 hours if Bp 4/49 strains were used. After chilling overnight the allantoic fluids were harvested separately to avoid eventual bacterial contamination. Material characterized by an infectivity/haemagglutination ratio (I/HA) of 10^6 or higher was looked upon as St virus.

Incomplete particles (IC). a) Several allantoic passages were made with 0,5 ml each of undiluted allantoic fluids virus. The incubation was 28 hours, independently of the actual strain used. Materials characterized by an I/HA ratio of less than 10^4 were looked upon as incomplete virus particle.

b) To an undiluted St virus suspension inactivated at 37° C for 144 hours fresh St virus was added in a ratio of 1 : 5000. This mixture was inoculated into the allantoic cavity of embryonated eggs, 0,5 ml in each. Independently of the strain, the incubation period was 28 hours. The I/HA ratio of harvest was 10^4 or less. This material was designed as heat inactivated passage material (HIP).

Heat inactivation. Heat inactivation of St virus was made by incubating St_{25}, St_{72} and St_{144} at 37° C for 25, 72 and 144 hours, respectively.

Titration of infectivity. Infectivity titrations were carried out by the HORVÁTH rotating drum method [16]. Calculation of the titres was made according to REED and MUENCH [17].

Haemagglutination titration. This test was carried out by TAKÁTSY's spiral loop method [18], using a 1 per cent washed suspension of chicken RBC. The titration end point obtained directly or by interpolation was the virus dilution giving a 2+ haemagglutination.

Purification of virus. Only the Bp 4/49 strain was used in a purified form. Purification was made essentially according to TAKÁTSY [19*a*, *b*], with the only modification that precipitation by distilled water was repeated once more.

The electronmicroscope used was an EM 3 USSR (1951) apparatus, rebuilt and modified by HOLLÓS and BARNA [23].

Preparation for electronmicroscopy. All the preparations were fixed by 1 per cent buffered OsO_4 solution at 4° C, according to PALADE [20].

The purified, fixed material was carried onto a microscreen with a small loop. After washing with distilled water the preparations were dried in air.

Most of our examinations were made on chicken red blood cell (RBC) adsorbed virus. A similar method of preparation was used by HEINMETS [21] with human RBC. The RBC were preparated according to the method of DAWSON and ELFORD [22], as follows. To a 10 per cent suspension of RBC in saline a 5 per cent saponine solution was added in a 1/50 volume ratio. After complete haemolysis the cell membranes were washed 3 or 4 times with chilled saline, centrifuging at 2000 r. p. m. for 5 minutes. The final sediment was made up to a 2 per cent suspension. The suspension was examined electronmicroscopically to judge its applicability for further purposes. The virus adsorption was made by mixing equal volumes of the above RBC membrane suspension with the supernatant of a freshly titrated virus suspension centrifuged at 4000 r. p. m. for 20 minutes. The mixture was allowed to stand in an ice bath for 25 minutes with occasional shaking. This was followed by rapid centrifugation, and the supernatant was replaced by OsO_4 solution. After fixation, the material was washed in a centrifuge 3 to 4 times with chilled distilled water. The final sediment was made up to a slightly opalescent suspension and it was mounted onto collodium membrane. As a control, RBC membranes treated in a similar way were used.

Shadowing of preparations was made by gold or palladium.

Photos were taken at 40 KV potency with an externally adjustable objective aperture of 40 μ [23] and a magnification of 4600 on "Forte Bromodia" plates. Conditions of taking and developing of micrographs were standardized as far as possible.

Measuring of diameters. Measurings were made on contact diapositive copies by a Zeiss comparator. Particle diameters vertical to the shadowcasting were always measured, disre-

garding whether the narrower or the wider diameter was observed. Filamentous forms were not measured.

Measuring of density. The real electron density of single particles could not be measured. Nevertheless certain data concerning the relative density of particles could be obtained by taking the photos under fairly standardized conditions. To meet the above requirements, the diapositives were selected according to the density of the background, *i. e.* only photos presenting a background of 30 to 40 microlumen transparency were used with RBC adsorbed preparations and those of 50 to 60 microlumen with purified virus particles. Transparency was measured by means of the densitometer presented in Fig. 1. Using this apparatus the magnification (20000 times) and the photocelldiaphragm diameter (2 mm) was chosen in such a way that the picture of a single virus particle should cover the entire diaphragm field. The transparency of the actual background and that of single virus particles could be thus compared. The light source and the densitometer were supplied by alternating current stabilized to $\pm$ 1 per cent.

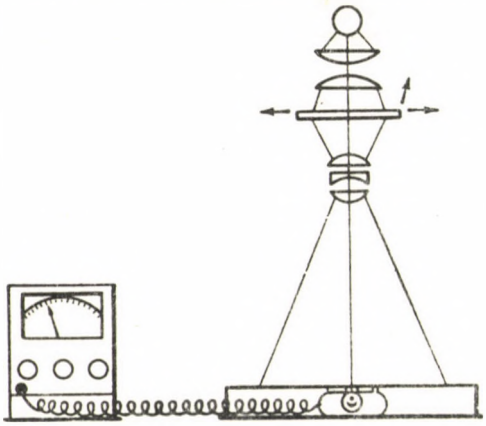


Fig. 1. Scheme of densitometer

Explanations: The light of a 250 watt bulb is collected by a condensor onto a horizontal, transparent plate. A lense system magnifies the pictures obtained. The light enters the photocell through a diaphragm 2 millimeter in diameter. The magnified picture lies exactly in the level of the diaphragm. The measuring apparatus is on the left, together with the switch and the button for adjusting sensitivity

Statistical evaluation

a) *Measuring of the diameter.* A major, a medium and a small particle was selected. Their diameters were measured 50 times each. The values obtained were of normal distribution. The S value was between 2,29 to 2,88 mμ. Calculating with a probability of 5 per cent, the error was $\pm$ 5,63 to 7,58 per cent. This was within the $\pm$ 10 per cent limit of error of electronoptical measuring methods stated by WILLIAMS [24].

b) *Measuring of density.* The density of each particle adsorbed onto the surface of a RBC was measured 4 times in random series to avoid subjective factors arising from repeated measuring of the same particle. The error with 5 per cent probability was calculated as $\pm$ 21 per cent.

c) *Statistical evaluation.* In the statistical evaluation of our results the t method was used. Only differences less than 0,1 per cent were taken as significant. In cases of wider distribution FISHER'S F quotient method was used. A 5 per cent fiducial limit was taken as significant.

Results

1. *Direct evaluation of micrographs*

a) *Control micrographs.* On photos taken from control RBC membranes influenza virus like particles were very rarely present (photos 1 and 2).

b) *Unshadowed preparations.* It was apparent from direct inspection that the density of St and IC particles was different (photos 3 to 6). The density of St, St_{25}, St_{72} and St_{144} particles seemed to be closely similar (photos 3, 7, 10, 11). A similar relation was found between HIP and IC particles (photos 6, 12, 13).

Particles belonging to the St group were well defined, with clear margins and a dense, homogeneous inner structure (photo 3, 8).

IC particles, on the other hand, being less dense and having less defined margins, were more confluent with their background (photos 6, 9). This feature was even more remarkable with purified IC particles (photo 5).

c) *Shadowed preparations.* Generally, St particles were spherical or slightly ellipsoid bodies equal in size (photos 14, 15, 20). Particles from purified suspensions seemed to be a little more flattened than those adsorbed on RBC (photos 14, 15, 16). Heat inactivated particles exhibited very little morphological differences, as compared to the St bodies (photo 18). IC and HIP particles could not be differentiated morphologically, both were irregular and markedly flat (photos 17, 19, 21).

2. *Quantitative evaluation of micrographs*

The diameter of 3759 and the density of 4132 particles was measured. Both the diameter and the density exhibited logarithmic distribution. The figures were constructed accordingly.

Tables I and II present the geometric mean values of virus diameters in $m\mu$ and those of the densities in microlumen. In Table III we summarized the numbers of diameter and density measurements, the geometric means of the logarithms of these data, and the s^2 values.

Table I

Geometric means of virus diameters in $m\mu$

Designation	Strain			
	RBC adsorbed			Purified Bp 4/49
	PR8	Lee	Bp 4/49	
St	92	108	106	114
St_{25-72}	100	99	99	121
St_{144}	99	101	101	
IC	127	123	114	140
HIP	109	121	111	

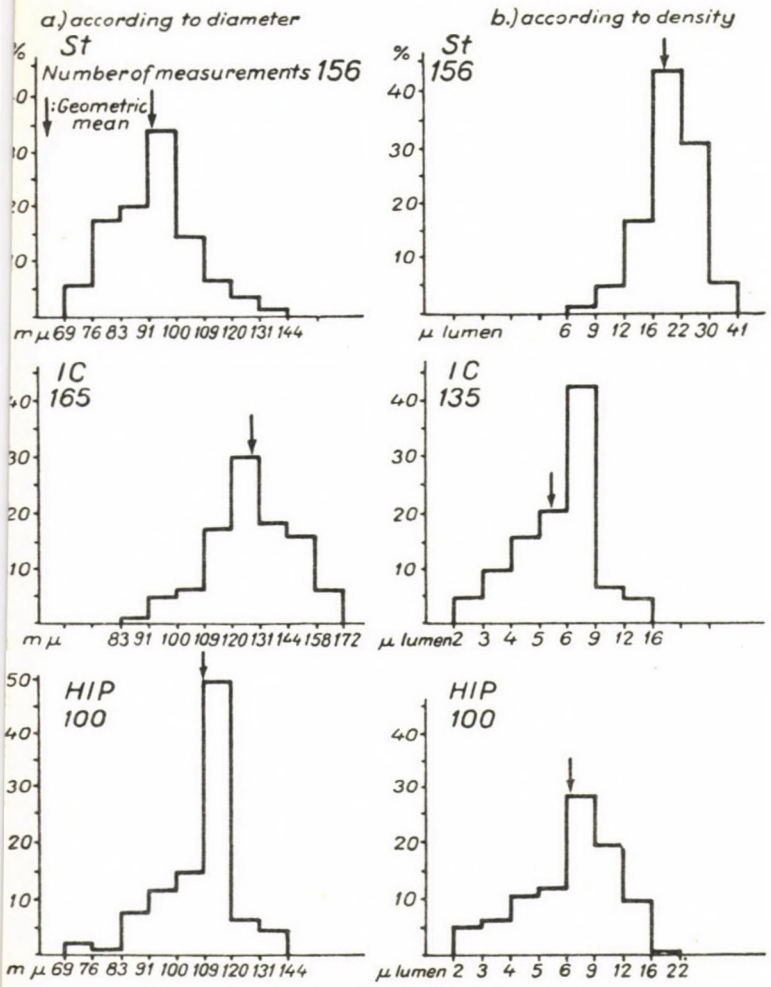


Fig. 2. Distribution of PR8 virus particles

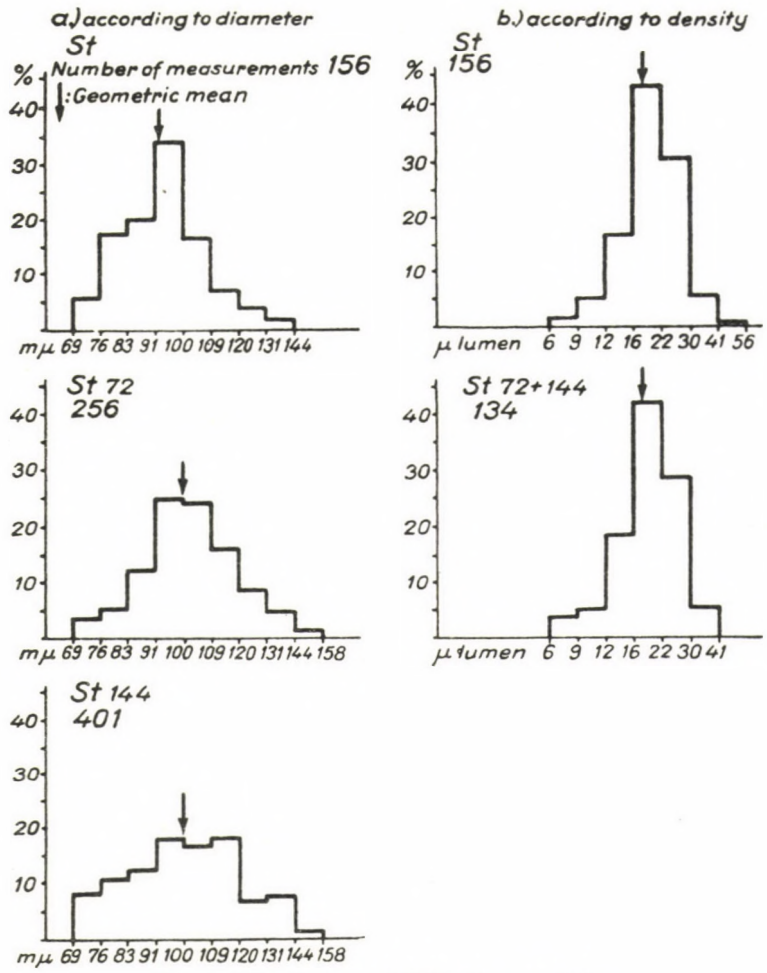


Fig. 3. Distribution of PR8 virus particles

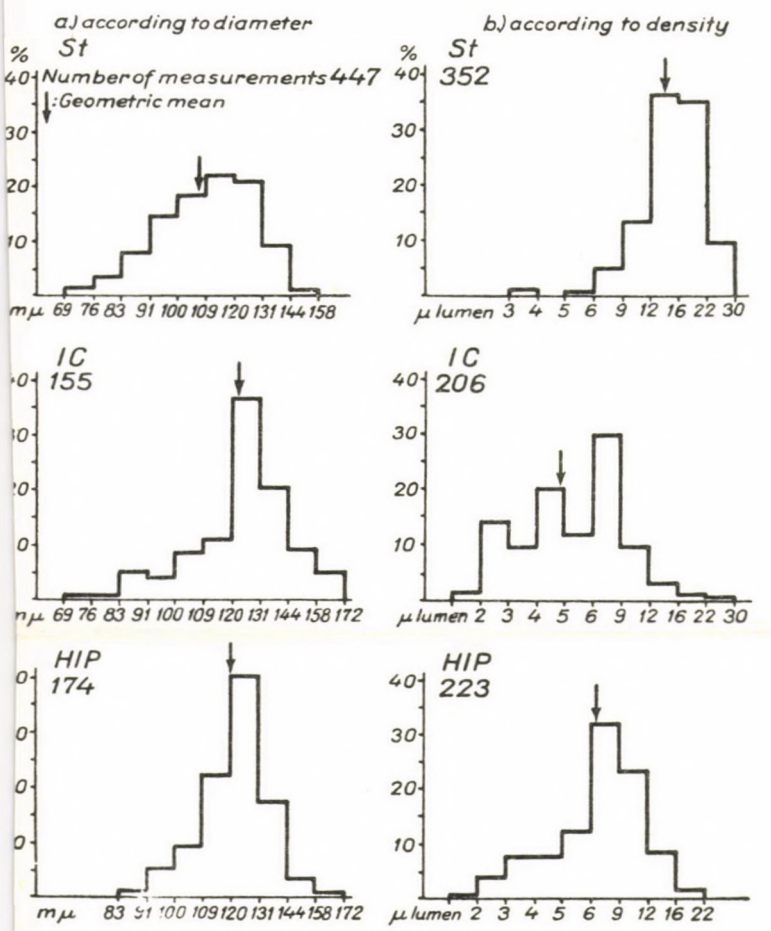


Fig. 4. Distribution of Lee virus particles

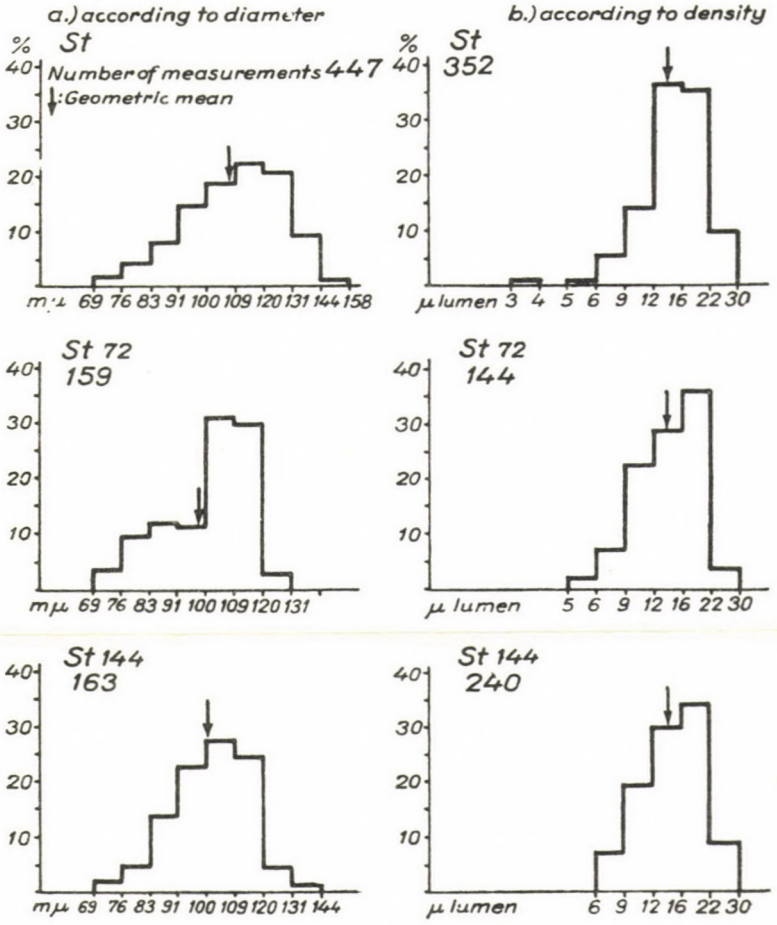


Fig. 5. Distribution of Lee virus particles

Fig. 2—5. Diagrams presenting the data of diameter and density measurements carried out on electronmicrographs of RBC adsorbed virus particles

Explanations: Distribution is given in per cent. Number of measurements is presented separately. The arrow points to the geometric mean. Diameters are given in mμ, densities in microlumen. For the abbreviations used in the figures, see text (Materials and methods).

Table II

Geometric means of density values in microlumen

Designation	Strain			
	RBC adsorbed			Purified Bp 4/49
	PR8	Lee	Bp 4/49	
St	18,8	14,6	22,8	12,9
St_{25-72}	18,1	13,3	20,4	16
St_{144}		14	15,5	
IC	5,4	4,8	7,2	6,4
HIP	6,2	6,5	6,7	

Fig. 2 presents the distribution of diameter and density values of St, IC and HIP groups of PR8 strain viruses. The number of measurements made are given and the incidence of the values is expressed in per cent. Diameters are given in mμ and densities in microlumen. The geometric mean is indicated by a small arrow.

If the diameter and density diagrams of St and IC particles are compared, we can see that the diameter diagram of IC particles was shifted right and its density diagram to left, *i. e.* the diameters increased while the density decreased. The diameter and density diagrams of HIP particles are closely related to those of IC particles, though they seem to be shifted slightly towards the values of the St virus diagrams. We suppose, therefore, that the HIP preparation might contain numerous particles of a higher degree of completeness, similar to the St virus, but essentially lacking infectivity.

In Fig. 3 a comparison of St and heat inactivated viruses is presented. No difference was found in the density diagrams of St and heat inactivated particles. On the other hand, the more prolonged was heat inactivation, the wider was the distribution of diameter values.

Fig. 4 presents the data concerning the St, IC, and HIP groups of Lee virus. As compared to the St virus, the diameter diagrams of IC and HIP particles have shifted to right and their density diagram to left. The density diagram of the IC particles revealed 3 peaks decreasing from right to left, while that of the HIP particles exhibited only one maximum corresponding to that of IC. The HIP diagram, as compared to that of IC, was shifted to the right. The lack of uniformity of the IC particles was more marked with Lee than with PR8 virus.

Table III

Logarithms of virus diameter and density values

Designation	Virus strains											
	RBC adsorbed									Purified Bp 4/49		
	PR8			Lee			Bp 4/49					
	N	$\overline{X}$	s^2	N	$\overline{X}$	s^2	N	$\overline{X}$	s^2	N	$\overline{X}$	s^2
A) Diameter												
St	156	1,9646	0,0037	447	2,0331	0,0038	306	2,0262	0,0046	150	2,0561	0,0043
St_{25-72}	256	2,0026	0,0047	159	1,9972	0,0017	167	1,9947	0,0037	155	2,0841	0,0036
St_{144}	401	1,9976	0,0068	163	2,0006	0,0029	186	2,0040	0,0048			
IC	165	2,1052	0,0044	155	2,0896	0,0044	227	2,0550	0,0039	165	2,1958	0,0053
HIP	100	2,0362	0,0033	174	2,0816	0,0021	123	2,0431	0,0044			
B) Density												
St	156	1,2741	0,0179	352	1,1651	0,0184	462	1,3589	0,0320	541	1,1107	0,0260
St_{25-72}	134	1,2570	0,0196	144	1,1235	0,0192	141	1,3109	0,0114	155	1,2034	0,0695
St_{144}				240	1,1471	0,02010	122	1,1913	0,0277			
IC	135	0,7331	0,0372	206	0,6853	0,0627	483	0,8589	0,0641	419	0,81	0,0181
HIP	100	0,7941	0,0478	223	0,8185	0,0499	119	0,6731	0,0479			

Explanations: N = number of measurements
X = logarithms of the values measured

$$\overline{X} = \frac{\Sigma x}{N}$$

$$s^2 = \frac{\Sigma (x - \overline{x})^2}{N - 1}$$

Fig. 5 presents a comparison of St and heat inactivated particles of Lee virus. The differences found were opposite to those summarized in Fig. 3, *i. e.* the longer heat inactivation lasted a narrower distribution in the diameters of heat inactivated particles compared to the St ones.

The flattening of the St virus diameter diagram might be explained by the probable presence of hate inactivated par ticles produced during th comparatively long incubation of Lee infected eggs. Attention was drawn on the

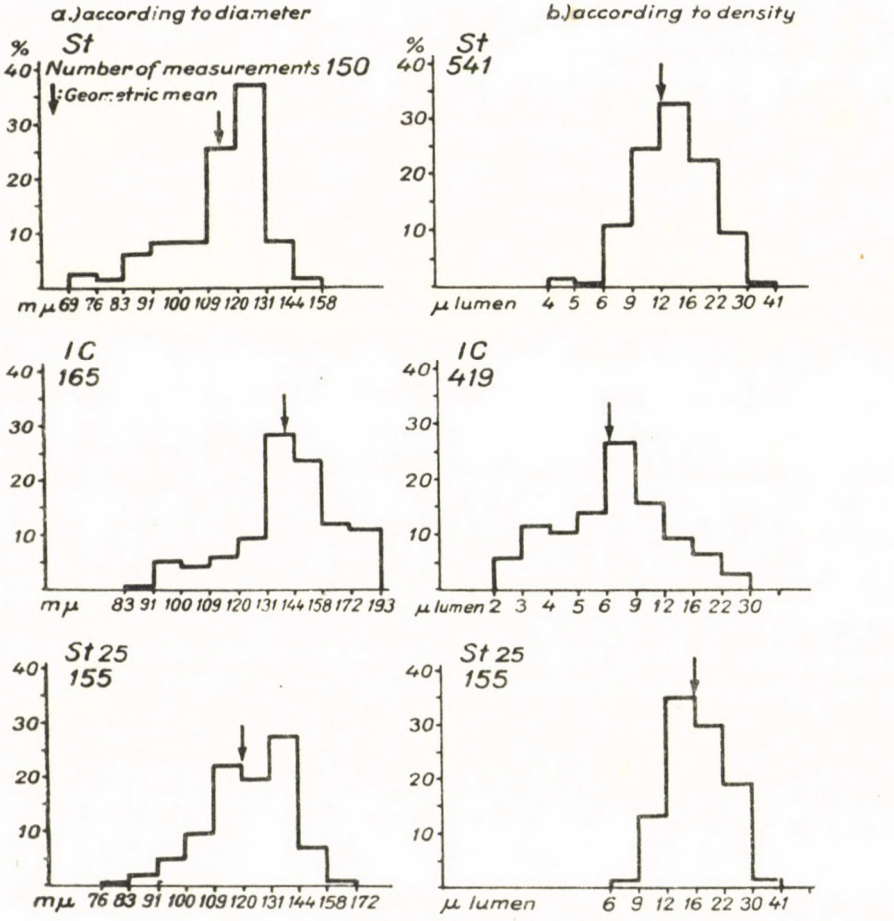


Fig. 6. Diagrams presenting the data of diameter and density measurements carried out on electron micrographs of virus particles purified according to TAKÁTSY. Distribution of Bp. 4/49 virus particles

Explanations: Distribution is given in per cent. Number of measurements is presented separately. The arrow points to the geometric mean. Diameters are given in mμ, densities in microlumen. For the abbreviations used in the figures, see text (Materials and methods)

great heat sensitivity of Lee virus by HORSFALL [25]. Density diagrams did not reveal any difference.

Examinations made with the Bp 4/49 strain yielded results essentially similar to those obtained with the two other strains. Nevertheless, the difference in the diameters of IC and St particles was less marked. There was no

significant flattening of the diameter diagrams of heat inactivated particles, as compared to that of the St virus.

Results of our experiments with Bp 4/49 virus purified according to TAKÁTSY [19*a*, *b*] are presented in Tables 1 and 2 and summarized below. The geometric mean diameter of purified St particles was 114 mμ. This means, as compared to the 106 mμ found with RBC adsorbed St particles, a significant (7,5 per cent) increase. We suppose that the conditions during purification might render the particles more inclined to flattening. The increase in the di-

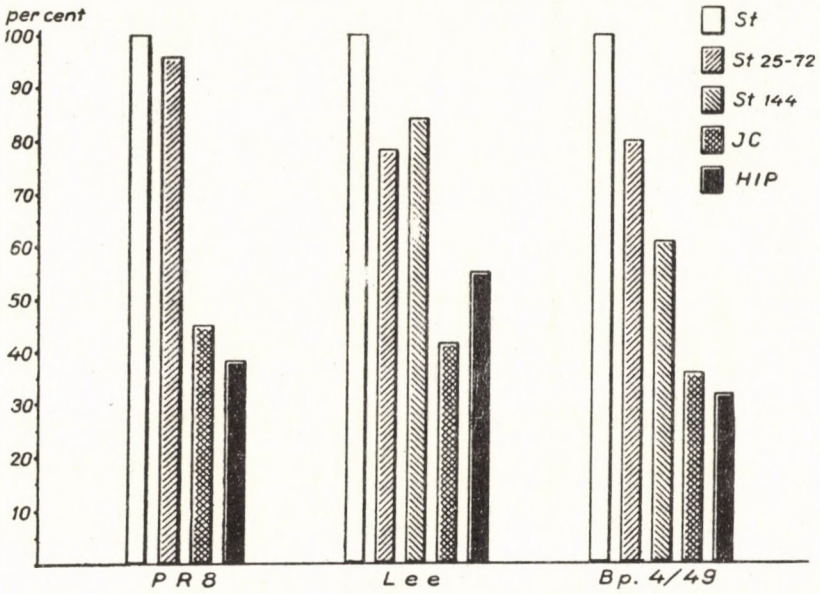


Fig. 7. Relative density

Explanations: The column diagrams represent the relative density of particles of RBC adsorbed PR8, Lee and Bp 4/49 strains in per cents. The ratio for the St group of the actual strains was taken as 100 per cent. The ratios were obtained by multiplying the square of the geometric mean of the diameters by the mean of the densities. In the case of diameters shorter than 100 mμ they were counted for that value. For abbreviations in the figure, see text (Materials and methods)

ameter of the more sensitive IC particles during purification was found to be 22 per cent (114 to 140 mμ). No significant difference was found in the distribution F quotient of purified and RBC adsorbed particles, neither of the St nor of the IC type.

The decrease in the density of particles flattened as a result of purification is not to be compared to the differences observed in the density of St and IC particles of all the strains studied. Thus, the latter cannot be explained simply by flattening.

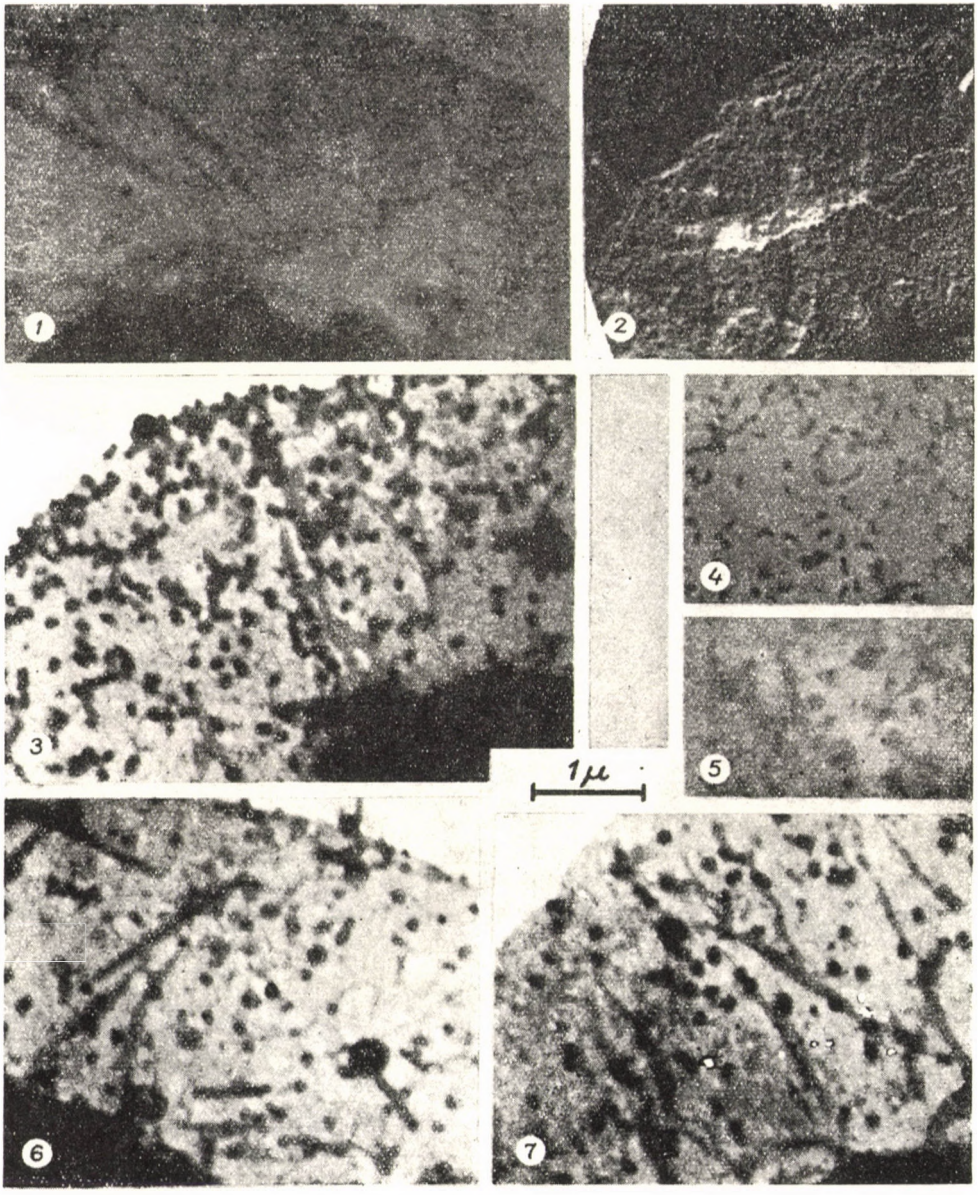


Photo 1—7

(Expl. see on p. 471)

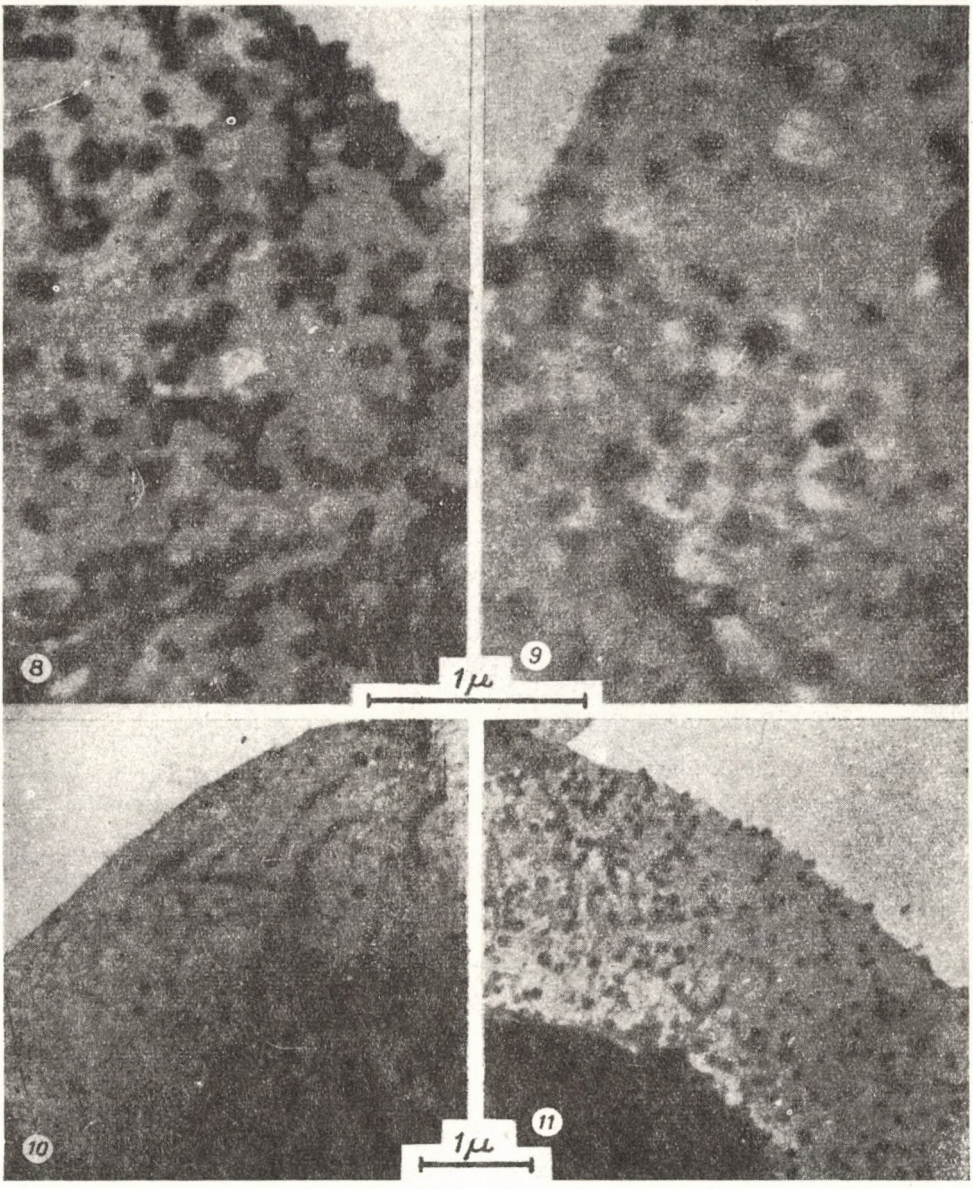


Photo 8—11

(Expl. see on p. 471)

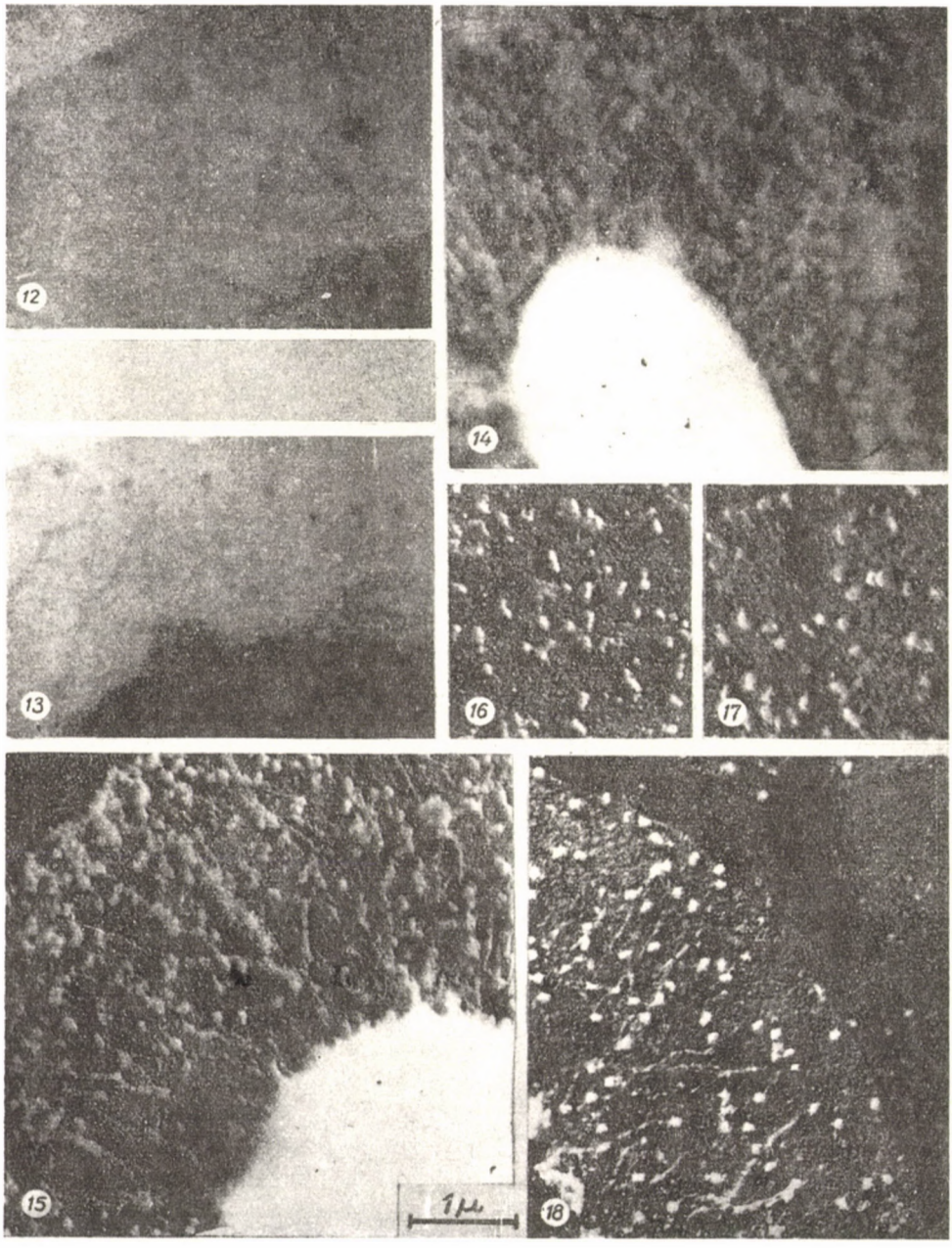


Photo 12—18

(Expl. see on p. 471)

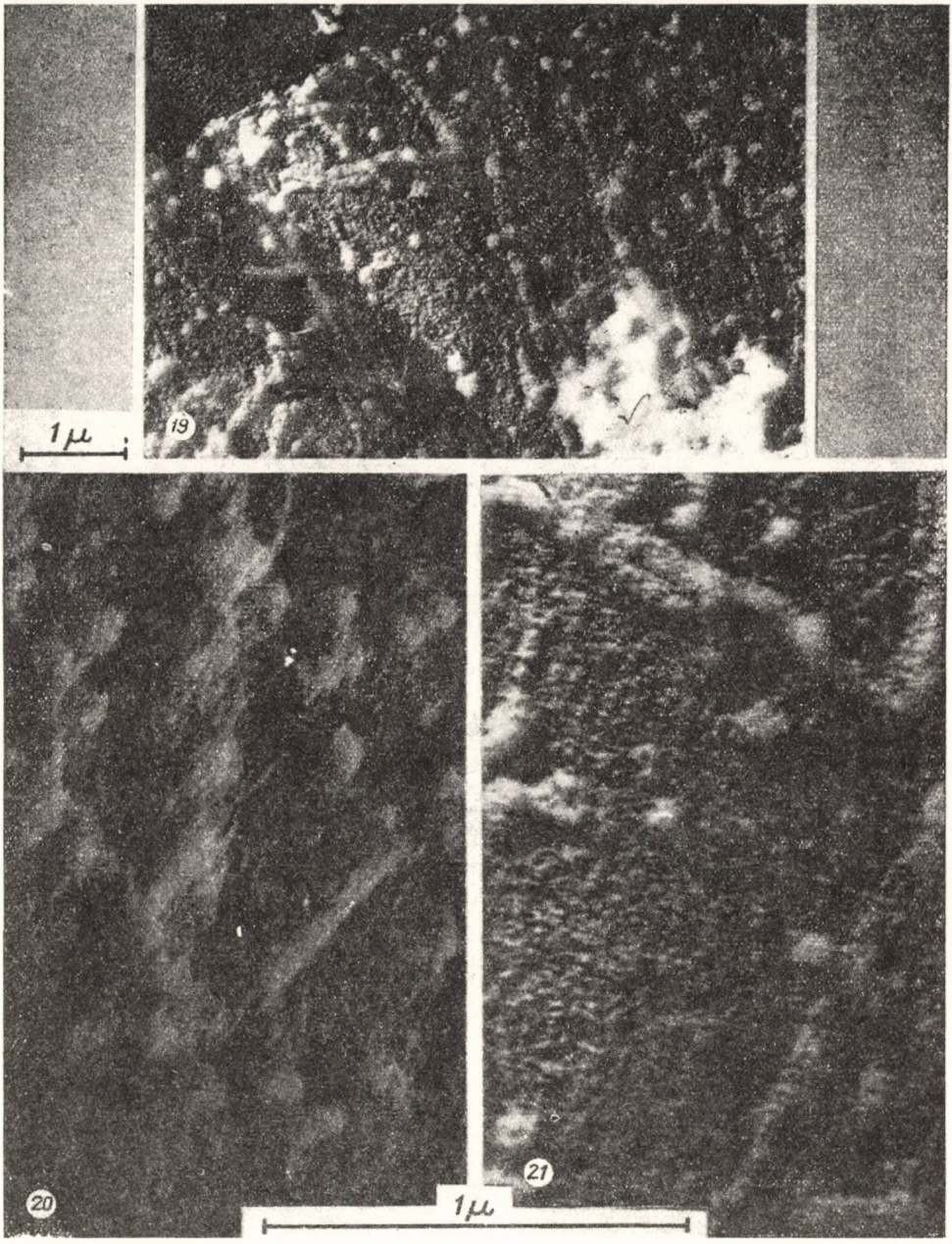


Photo 19—21

(Expl. see on p. 471)

Explanations to the micrographs

Photo 1—7, p. 467

Photo 1. (No. 1532) Control chicken RBC membrane. Nucleus bottom left, cell margin top right. Spots of higher density unmistakable for virus particles are seen. OsO_4 fixation, unshadowed. Magnification, about × 15 000 — *Photo 2. (No. 1714)* Control chicken RBC membrane. OsO_4 fixation, palladium shadowed. Magnification, about × 15 000 — *Photo 3. (No. 461)* RBC adsorbed St particles of Bp 4/49 strain. The irregularly distributed particles of marked density have well-defined margins and a spherical or a slightly ellipsoid shape. OsO_4 fixation, unshadowed. Magnification, about × 15 000 — *Photo 4. (No. 544)* St particles of Bp 4/49 strain purified according to TAKÁTSY. The readily aggregating particles are less dense than the RBC adsorbed St particles of the same strain. OsO_4 fixation, unshadowed. Magnification, about × 15 000 — *Photo 5. (No. 572)* IC particles of Bp 4/49 strain purified according to TAKÁTSY. Particles of moderate density and uncertain margins, markedly inclined to aggregation. OsO_4 fixation, unshadowed. Magnification, about × 15 000 — *Photo 6. (No. 491)* RBC adsorbed IC particles of Bp 4/49 strain. The round, elongated or irregular particles of random distribution have uncertain margins and are of moderate density. OsO_4 fixation, unshadowed. Magnification, about × 15 000 — *Photo 7. (No. 1583)* St particles of Bp 4/49 strain inactivated for 72 hours at 37° C and adsorbed onto RBC membranes. The particles are essentially similar to those of St virus presented in Photo 3. OsO_4 fixation, unshadowed. Magnification, about × 15 000

Photo 8—11, p. 468

Photo 8. (No. 461) Part of photo 3, higher magnification. The clear margins and the marked density of particles is demonstrated also at higher magnification. Magnification, about × 32 000 — *Photo 9. (No. 491)* Part of Photo 6, higher magnification. The moderate density and poorly defined margins of particles render the magnified micrograph unevaluable. Magnification, × 32 000 — *Photo 10. (No. 1594)* St particles of PR8 strain inactivated for 72 hours at 37° C and adsorbed onto RBC membranes. The particles are essentially similar to those presented in Photos 3 and 7. OsO_4 fixation, unshadowed. Magnification, about × 15 000 — *Photo 11. (No. 1918)* St particles of Lee strain inactivated for 144 hours at 37° C and adsorbed onto RBC membranes. The density of the particles is less than that of the St and heat inactivated St types of Bp 4/49 and PR8 viruses adsorbed onto RBC. OsO_4 fixation, unshadowed. Magnification, about × 15 000

Photo 12—18, p. 469

Photo 12. (No. 1902) HIP particles of Bp 4/49 strain adsorbed onto RBC membrane. No difference was found between these and the IC particles presented in Photo 6. OsO_4 fixation, unshadowed. Magnification, about × 15 000 — *Photo 13. (No. 1906)* HIP particles of PR8 strain adsorbed onto RBC membranes. (See Photo 12) OsO_4 fixation, unshadowed. Magnification, about × 15 000 — *Photo 14. (No. 393)* St particles of Bp 4/49 strain adsorbed onto RBC membranes. A great number of randomly distributed round or ellipsoid St particles. OsO_4 fixation, gold shadowed. Magnification, about × 15 000 — *Photo 15. (No. 396)* St particles of Bp 4/49 strain adsorbed onto RBC membranes. OsO_4 fixation, gold shadowed. Magnification, about × 15 000 — *Photo 16. (No. 648)* St particles of Bp 4/49 strain purified according to TAKÁTSY. OsO_4 fixation, gold shadowed. Magnification, about × 15 000 — *Photo 17. (No. 598)* IC particles of Bp 4/49 strain purified according to TAKÁTSY. The particles are more irregular and flat than those of St virus. OsO_4 fixation, gold shadowed. Magnification, about × 15 000 — *Photo 18. (No. 1738)* St particles of PR8 strain inactivated for 144 hours at 37° C and adsorbed onto RBC membranes. The margins of the particles are somewhat less defined than those presented in Photos 14 and 15. OsO_4 fixation, palladium shadowed. Magnification, about × 15 000

Photo 19—21, p. 470

Photo 19. (No. 386) IC particles of Bp 4/49 strain adsorbed onto RBC membranes. Particles are flattened and very often pleomorphic. Two particles resembling St virus are indicated by arrows. OsO_4 fixation, gold shadowed. Magnification, about × 15 000 — *Photo 20. (No. 396)* Part of Photo 15, higher magnification. Magnification, about × 60 000 — *Photo 21. (No. 386)* Part of Photo 19, higher magnification. Magnification, about × 60 000

Discussion

By means of our method described above we were able to measure and express numerically the differences observed directly in the density of St and IC particles on our micrographs. Naturally, these figures do not represent absolute electron density values.

It has been established that by heat inactivation of St virus no like IC particles are obtained. Heat inactivated St virus inoculated into the allantoic cavity of embryonated eggs was not found in the harvest, while particles undistinguishable from IC were present.

In the case of Bp 4/49 strain the diameter differences of St and IC particles could be explained by flattening of the latter. St particles flattened as a result of purification had diameters similar to that of adsorbed IC particles. The mean diameter values of IC particles as compared to that of St virus, exhibited an increase of 28,14 and 7,5 per cent in PR8, Lee and Bp 4/49 strains, respectively. These facts support the view that increase in the diameter of IC particles is but an artefact.

It has been established that the diameter diagrams of heat treated St particles were more flat than those of St virus. The greater number of wider particles appeared as a result of a flattening of particles injured by heat treatment, while the smaller ones were supposed to have lost volume by dissolution of material from the particle or by fragmentation. This is also supported by the observation that the density of heat treated particles was not less than that of St virus (Fig. 6). Beyond a certain limit of heat treatment further changes occurred in the diameter distribution, very probably because the most injured particles lost their ability to adsorb onto RBC.

The density diagrams revealed close relations between the groups of St and heat treated St and those of HIP and IC particles, respectively. The multiple peaks observed on the density diagrams of IC and HIP particles are supposed to be caused by the presence of particles representing different phases of development. Apparently similar characteristics of incomplete particles were found by BURNET *et al.* [26] by essentially different methods.

Data of Tables I and II suggest that the differences found in the diameters of St and IC particles are not sufficient to explain the very marked difference in their density only by flattening. We are inclined to suppose that the density differences observed might be the result of a different composition of particles.

To verify also numerically our above supposition, we made use of a ratio characterizing the mean density of a single particle in the different groups. The value of this ratio equals the actual density measured in microlumen, in the case of particles with a diameter of 100 mμ or less. For particles wider than 100 mμ the ratio was obtained by multiplying the density measured at a diaphragm diameter of 100 mμ by the quotient, square of the real diameter

100 mμ. Fig. 6 presents these ratios calculated for particles adsorbed onto RBC. The ratio for St virus was taken as 100. Nevertheless, we do not claim our data accurately to demonstrate the relations between the electron density values of different particles, as we disregarded the logarithmic nature of the extinction curve and took the relation for linear. Moreover, the density of particles with a diameter wider than 100 mμ was measured in their central area where they were most dense. These failures of the method could not be regarded as influenc. ing the validity of our results as they could only diminish the differences observed in the density of St and IC particles. Nevertheless, these differences seemed to be marked enough to support our view that there was a difference in the composition of St and IC particles.

Summary

From a statistical evaluation of data obtained by measuring the diameter of 3759 and the density of 4132 particles of PR8, Lee and Bp 4/49 virus in form of complete, heat inactivated and two types of incomplete particles, the following conclusions were drawn.

1. The longer diameter of incomplete particles as compared to that of complete virus is a result of flattening.

2. The markedly decreased density of incomplete particles cannot be explained only by flattening, but a difference in their composition seems to be most probable.

3. The above statements are valid for both types of incomplete particles, *i. e.* those produced with concentrated inocula of live virus and with heat inactivated plus live virus inocula. IC particles thus obtained seem to represent a mixture of incomplete virus particles of different phases of development.

4. No significant differences were found in the density of heat inactivated particles as compared to St virus, while the moderate alteration of diameters during heat inactivation is a result of flattening, fragmentation and selection by injury.

Acknowledgements. The author is indebted to Dr. GY. BARSY for his valuable help in the statistical evaluation of results. For lending the Zeiss comparator, the author expresses his thanks to the Institute of Biochemistry of the Hungarian Academy of Sciences.

LITERATURE

1. FRIEDEWALD, W. F. and PICKELS, E. G.: J. Exp. Med. **79**, 301 (1944).
2. VON MAGNUS, P.: Acta Path. Microbiol. Scand. **28**, 278 (1951).
3. SVEDMYR, A.: Brit. J. Exp. Path. **30**, 237 (1949).
4. VON MAGNUS, P.: Incomplete forms of influenza virus, in SMITH, K. M. and LAUFFER, M. A., Advances in virus research, Vol II. Academic Press, New York (1954).
5. a. BERNKOPF, H.: J. Immun. **65**, 571 (1950).
5. b. MCKEE, A. P.: J. Immun. **66**, 151 (1951).
6. GARD, S., VON MAGNUS, P., SVEDMYR, A. and BIRCH—ANDERSON, A.: Arch. Ges. Virusforsch. **4**, 591 (1952).
7. ADA, G. L. and PERRY, B. T.: Nature **175**, 209 (1955).
8. UHLER, M. and GARD, S.: Nature **173**, 1041 (1954).
9. VON MAGNUS, P.: Acta Path. Microbiol. Scand. **30**, 311 (1952).
10. HORSFALL, F. L.: J. Exp. Med. **100**, 135 (1954).
11. LIU, O. C., PAUCKER, K. and HENLE, W.: J. Exp. Med. **103**, 777 (1956).
12. HENLE, W., LIU, O. C., PAUCKER, K. and LIEF, F. S.: J. Exp. Med. **103**, 799 (1956).
13. WERNER, G. H. and SCHLESINGER, R. W.: J. Exp. Med. **100**, 203 (1954).
14. VOSS, H. and WRENGEL, E.: Zbl. Bakt. Orig. **162**, 225 (1955).
15. FARKAS, E. and TAKÁTSY, GY.: Népegészségügy **30**, 402 (1949).

16. Horváth, S.: Acta Microbiol. Hung. **1**, 481 (1954).
17. Reed, L. J. and Muench, H.: Amer. J. Hyg. **37**, 493 (1938).
18. Takátsy, Gy.: Acta Microbiol. Hung. **3**, 191 (1955).
19. a. Takátsy, Gy.: Acta Med. Hung. **3**, 185 (1952).
19. b. Takátsy, Gy.: Acta Microbiol. Hung. **1**, 35 (1954).
20. Palade, G. E.: J. Exp. Med. **95**, 285 (1952).
21. Heinmets, F.: J. Bact. **55**, 823 (1948).
22. Dawson, I. M. and Elford, W. J.: J. Gen. Microbiol. **3**, 298 (1944).
23. Hollós, I. and Barna, Á.: Unpublished data.
24. Williams, R. C.: Electronmicroscopy of viruses, in
Smith, K. M. and Lauffer, M. A.: Advances in virus research. Vol. II. Academic Press, New York, pp. 183—236 (1954).
25. Horsfall, F. L. Jr.: J. Exp. Med. **102**, 441 (1955).
26. Burnet, F. M., Lind, P. E. and Stevens, K. M.: Austr. J. Exp. Biol. Med. **33**, 127 (1955).

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója Műszaki felelős: Farkas Sándor

A kézirat nyomdába érkezett: 1957. VIII. 15. — Terjedelem: 9,25 (A/5) ív, 59 ábra, 1 melléklet

43134/57 — Akadémiai Nyomda, Budapest, V., Gerlóczy u. 2. — Felelős vezető: Bernát György

The *Acta Microbiologica* publish papers on microbiological subjects in English, German, French and Russian.

The *Acta Microbiologica* appeat in parts of varying size, making up one volume.

Manuscripts should be addressed to

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Correspondence with the editors should be sent to the same address.

The rate of subscription to the *Acta Microbiologica* is 110 forints a volume. Orders may be placed with »Kultúra« Foreign Trade Company for Books and Newspapers (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Account No 43-790-057-181) or representatives abroad.

Les *Acta Microbiologica* paraissent en français, allemand, anglais et russe et publient des travaux du domaine de la microbiologie.

Les *Acta Microbiologica* sont publiés sous forme de fascicules qui seront réunis en un volume.

On est prié d'envoyer les manuscrits, destinés à la rédaction, à l'adresse suivante:

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

Toute correspondance avec la rédaction doit être envoyée à cette même adresse.

Le prix de l'abonnement est de 110 forints par volume.

On peut s'abonner à l'Entreprise pour le Commerce Extérieur de Livers et Journaux »Kultúra« (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Compte-courant No. 43-790-057-181) ou à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

«*Acta Microbiologica*» публикуют трактаты из области микробиологии на русском, немецком, английском и французском языках.

«*Acta Microbiologica*» выходят отдельными выпусками разного объема. Несколько выпусков составляют один том.

Предназначенные для публикации рукописи следует направлять по адресу:

Acta Microbiologica, Budapest, Keleti Postahivatal, Postafiók 64.

По этому же адресу направлять всякую корреспонденцию для редакции.

Подписная цена «*Acta Microbiologica*» — 110 форинтов за том. Заказы принимает предприятне по внешней торговле книг и газет «*Kultúra*» (Budapest, VI., Népköztársaság útja 21. Текущий счет № 43-790-057-181) или его заграничные представительства и уполномоченные.

28,— Ft

INDEX

Serény, B.: Experimental Keratoconjunctivitis Shigellosa 367

Kiszel, J. und *Füzi, N.:* Untersuchung des Leptospirenbefalls der Haustiere in einer südostungarischen Gemeinde 377

Lovas, B., Egyessy, D. M. und *Alföldi, L.:* Elektronenmikroskopische Untersuchung der Pseudomonas pyocyanea-Bakteriophagen 391

Fekete, L., Nemes, Gy., Kleeberg, J. and *Ábrahám, E.:* Complement Titres in Subjects with Differing Uptakes of Dietary Protein, with Special Reference to Antibody Formation in Dependence on Diet 405

Vas, K. und *Proszt, G.:* Die Rolle des pH bei der Sterilisierung von Konserven 413

Vas, K.: A Method for the Evaluation of the Quantal Response of Microbial Cultures to Chemical and Physical Agents 433

Váczi, L., Szita, J. and *Cieleszky, V.:* The Role of Lipids in Induced Chloramphenicol Resistance of Bacteria 437

Lányi, B.: Serological Typing of Proteus Strains. Sensitivity of Serotypes to Antibiotics 447

Hollós, I.: Electronmicroscopic Examination of Complete and Incomplete Influenza Virus Particles 459