Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE VĚ

ČESKOSLOVENSKÁ MIKROBIOLOGIE

ROČNÍK
2

ČÍSLO
3

NAKLADATELSTVÍ ČSAV

ČS. MIKROBIOL.
PRAHA, ČERVEN 1957 · STR. 129—192

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

ČESKOSLOVENSKÁ MIKROBIOLOGIE

Vedoucí redaktor: Akademik IVAN MÁLEK

Členové redakční rady:

Akademik DIONÝZ BLAŠKOVIČ, MIKULÁŠ BURGER, JOSEF DYR, MILOŠ HEROLD, CTIRAD JOHN, JAN KABELÍK, VÁCLAV KÁŠ, dopisující člen ČSAZV, JIŘÍ MÁLEK, JAROMÍR SEIFERT, JAROSLAV ŠTERZL

Členové redakčního kruhu:

KAREL BERAN, JIŘÍ MACURA, výkonný redaktor, ZDENĚK TRNKA

OBSAH

Šterzl J. a Trnka Z.: Urychlení tvorby protilátek u mláďat velkými dávkami antigenu a vliv tohoto zásahu na revakcinační odpověď v dospělosti 129

Říha I.: Působení antibakterijních protilátek v organismu se změněným stavem reaktivity. I. Narkotický spánek a infekce Salmonella paratyphi B u bílých krys 137

Iványi J., Iványi P. a Tomášková M.: Rozdelenie izoaglutinínov pri papierovej elektroforéze a hodnoty gama globulínu u séra s extrémne vysokým titrom 145

Johanovský J.: Význam delta lysinu pro choroboplodnost stafylokoků 151

Sošková L.: Indukce fága u bakterií Shigella flexneri II kyanidem 157

Ševčík V.: Charakter fenoloxydásy aktinomycety Streptomyces antibioticus a vliv povrchově aktivních látek na stanovení její aktivity 162

Čapek A., Hanč O. a Pavlů H.: Mikrobiální přeměny steroidů. VI. Studie přeměny steroidů druhy a kmeny rodu Aspergillus 168

Ševčík V., Podojil M. a Vrtišková A.: Použití papírové chromatografie při výzkumu nových antibiotik 175

Krátká původní sdělení

Musílek V.: Křížová antibiosa u aktinomycet 183

Čerkes L., Doskočil J. a Čerkesová J.: Příspěvek k metodě barevných otisků při bioautografii 185

Sošková L.: Sledování fágového antigenu během rozmnožování fága v infikované bakterii . . . 188

Hubáček J. a Málek I.: Granulární struktury u mykobakterií, korynebakterií a neacidorezistentního kmene získaného při přeměně tuberkulosních mykobakterií 190

Vychází šestkrát ročně * *Roční předplatné 39 Kčs* * *Jednotlivé číslo 6,50 Kčs*

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 2. (1957) — č. 3

Urychlení tvorby protilátek u mláďat velkými dávkami antigenu a vliv tohoto zásahu na revakcinační odpověď v dospělosti*

JAROSLAV ŠTERZL a ZDENĚK TRNKA

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 18. 1. 1957

V pokusech, v kterých jsme přenášeli intraperitoneálně králičím mláďatům buňky sleziny z imunisovaných nebo normálních zvířat (Šterzl 1955, 1957) se objevil problém, zda se protilátky netvoří za nějakých okolností jako aktivní odpověď mláďat na přítomný antigen. I když je mnoho prací, prokazujících neschopnost tvorby protilátek u mladých organismů (Freund 1930, Baumgartner 1934a, b, Sokolova a Kalegajeva 1947, Sirotinin 1950), nebylo dosud stanoveno, jak odpovídají mláďata krátce po narození na injekce různých množství bakterijního antigenu.

Práce chce zodpovědět, zda období, ve kterém se netvoří protilátky u mláďat, je podmíněno pouze sníženou citlivostí jejich organismu vůči cizorodému antigenu — kterou by bylo možno překonat nadměrnými dávkami — nebo zda jde o nevyzrálý metabolický stav, který neumožňuje mláďatům reagovat tvorbou protilátek na jakékoliv množství antigenu. Revakcinací těchto zvířat ve stáří 4 měsíců (v mládí imunisovaných velkými dávkami) jsme chtěli dát i odpověď na dosud nejednotně zodpověděnou otázku, zda je možné vyvolat útlum imunologické reakce vůči bakterijním antigenům.

Buxton (1954) po injekcích bakterijního antigenu *Salmonella pullorum* do kuřecích embryí zjistil při infekci dospělých zvířat útlum protilátkové odpovědi. Kerr a Robertson (1954) velkými intramuskulárními dávkami *Trichomonas foetus* mladým telatům vyvolali specifický útlum na další dávky v dospělosti. Naproti tomu Cohn (1956) po injekcích difterického toxoidu, bakteriofága a pneumokoků kuřecím embryím starým 14 dní nezjistil po další dávce téhož antigenu 2 měsíce starým kuřatům útlum tvorby protilátek. Podobně Smith a Bridges (1956), ačkoliv injekcemi serových bíkovin vyvolali útlum tvorby protilátek, nezjistili stejný jev u bakterijních antigenů.

Materiál a metody

Do pokusu jsme brali králičí mláďata těsně po narození až do stáří 5 dnů, štěňata ve stáří 2, 4, 8 a 13 dnů, jak je podrobně uvedeno v tabulkách a výsledcích.

Imunisovali jsme korpuskulárním antigenem *Salmonella paratyphi B* inaktivovaným teplem hodinu při 70 °C. Známý počet mikrobů v imunisační dávce jsme připravili ze základní suspense bakterií. Stálé množství v základní suspensi jsme vždy upravili fotometricky a ještě v neusmrcené suspensi jsme kontrolovali počet mikrobů ředěním a rozléváním na agarové půdy. Časový sled odběrů krve

* Zbyněk Šidák z Matematického ústavu ČSAV provedl statistické zhodnocení.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

kardiální punkcí je vyznačen v tabulkách; většinou byla krev odebírána ve dvou až třídenních intervalech. Krev po odběrech byla uchovávána 24 hod. při pokojové teplotě, poté serum slito a po centrifugaci uloženo při −30 °C. Teprve po ukončení všech odběrů byly u každé skupiny prováděny aglutinace s týmž antigenem, kterého jsme použili pro imunisaci. Před prováděním testů byla sera znovu centrifugována. Lipoidní sera jsme zbavovali tuku vytřepáváním s chloroformem (Šterzl 1955). Vhodnost použití chloroformu k odstranění lipoidních látek bez ovlivnění titru protilátek byla v poslední době potvrzena (Updyke a Conroy 1956). Aglutinace jsme ukládali do chladnice při + 2 až 4 °C a odečítali po 2, 4 a 6 dnech.

Všechna zvířata, která se dožila stáří 4 měsíců, jsme revakcinovali dávkou 10^7 bakterií *S. paratyphi B* intravenosně. V kontrolní skupině jsou králíčata, která nebyla v mládí imunisována a ve stáří 4 měsíců dostala stejnou dávku antigenu jako zvířata z pokusných skupin. Krev na stanovení protilátek byla odebrána 3 dny před revakcinační dávkou a 3., 6., 10., 14. a 21. den po revakcinaci u každého zvířete.

K statistickému zhodnocení bylo použito Wilcoxonova pořadového testu podle tabulek publikovaných Whitem (1952). Testováno bylo na 5% stupni významnosti.

Výsledky

Injekce různých dávek antigenu mláďatům krátce po narození

V prvých pokusech jsme intraperitoneálně injikovali 5 dní starým králičím mláďatům dávku, kterou imunisujeme dospělé králíky, t. j. 10^8 mikrobů. Zjistili

Tab. 1. Dny prvních zjištění protilátek v seru králíčat po injekci různých dávek antigenu *S. paratyphi B*. Skupina 4 . 10^9 a 6 . 10^9 je složena ze zvířat, z nichž část byla injikována 4 . 10^9 a část 6 . 10^9 mikrobů i. p.

5. den 10^8 i. p.	5. den 10^8 i. c.	Po narození až 1. den 2 . 10^9 i. p.		5. den 2 . 10^9 i. c.	5. den 4—6 . 10^9 i. p.	
29	21	14	24	14	9	23
29	21	14	24	17	10	23
> 29	21	14	24	17	10	23
> 29	> 21	14	24	19	11	23
> 29	22	14	31	19	13	23
> 29	29	14	31	21	14	26
> 29	29	17	45	22	14	
> 35	36	17	45	29	14	
38	36	17	45	29	14	
38	> 36	24	59		15	
38	> 36	24	> 59		15	
> 38	50	24	> 59		15	
	50	24	> 59		15	
	50	24	> 59		15	
		24			23	
M > 29	29 < M < 36	M = 24		M = 19	M = 15	

jsme (tab. 1), že toto množství antigenu nevyvolává u králíčat tvorbu protilátek nikdy před 25. dnem života. V průměru se objevují protilátky 29. den po narození. Stejných výsledků jsme dosáhli, byla-li tato dávka (10^8) injikována přímo do krevního oběhu. Neuplatňuje se tedy u mláďat způsob vpravení antigenu jako u zvířat dospělých (De Gaetani, Terranova a De Gregorio 1955).

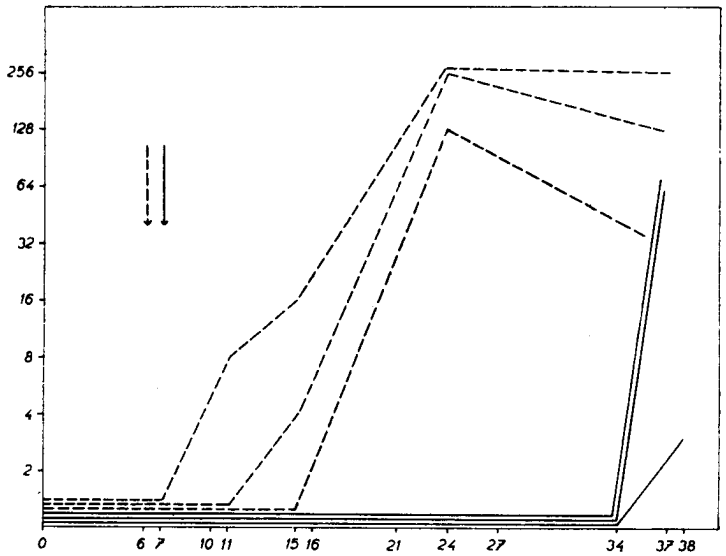
Když jsme injikovali 5 dní starým králíčatům intraperitoneálně nadměrné množství antigenu 4 . 10^9 a 6 . 10^9 mikrobů, zaznamenali jsme podstatné urychlení tvorby protilátek. U mláďat injikovaných těmito nadměrnými dávkami jsme zjistili v některých případech protilátky již 10. den života. Tento rozdíl mezi reakcí králičích mláďat na malou (10^8) a velkou dávku (4 . 10^9) antigenu charakterisuje obr. 1,

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

ve kterém je zaznamenána tvorba protilátek u králíčat jednoho vrhu, z nichž polovinu jsme injikovali malou dávkou a polovinu nadměrnou dávkou antigenu.

V dalších pokusech jsme snížili množství injikovaného antigenu na 2 . 10^9 mikrobů. Tuto dávku jsme injikovali 5 dní starým mláďatům do krevního oběhu a zjistili jsme, že snížením dávky jsme nedostávali tak výrazné urychlení tvorby protilátek jako při několikanásobně vyšších dávkách v předcházejících pokusech (tab. 1).



Obr. 1. Vrh králíčat, které jsme 6. den života imunisovali dvěma dávkami: plně — dávkou 10^8 mikrobů *S. paratyphi B*; čárkovaně — dávka 4 . 10^9 mikrobů *S. paratyphi B*. Osa x: stáří králíčat ve dnech od narození, vyznačeny dny odběru krve; osa y: titr protilátek udán ředěním sera; šipky označují imunisaci.

Domnívali jsme se, že množství antigenu (2 . 10^9 bakterií) bude dostatečné, vpravíme-li je králíčatům nikoliv 5 dní starým, nýbrž hned po narození. Ukázalo se však (tab. 1), že tato dávka sice urychluje tvorbu protilátek ve srovnání s dávkou 10^8, je však méně účinná než dávka 4 . 10^9 a 6 . 10^9 injikovaná králíčatům 5 dní starým. Stejné množství antigenu (2 . 10^9) injikované králíčatům jak těsně po narození, tak ve stáří 5 dní, se ve svém účinku nijak podstatně neliší.

Oprávněnost těchto závěrů potvrzuje statistické hodnocení. Rozdíl u 5denních králíčat po podání 10^8 mikrobů intraperitoneálně a intrakardiálně není statisticky významný. Naproti tomu se protilátky vytvářejí významně dříve po dávce 4 . 10^9 a 6 . 10^9 intraperitoneálně a 2 . 10^9 intrakardiálně u 5denních králíčat, než u stejně starých králíčat imunisovaných 10^8 mikrobů intraperitoneálně a intrakardiálně. První zjištění protilátek u králíčat imunisovaných ihned po narození dávkou 2 . 10^9 je významně pomalejší než ve skupině 5denních králíků injikovaných 4 . 10^9 a 6 . 10^9 intraperitoneálně. Nebyl však nalezen významný rozdíl mezi touto skupinou (ihned po narození 2 . 10^9) a skupinou 5denních králíčat injikovaných 10^8 intraperitoneálně i intrakardiálně a 2 . 10^9 intrakardiálně.

Dávky antigenu, kterých jsme použili u 5 dní starých a právě narozených králíčat, se pohybují na hranici smrtelného endotoxického působení antigenu. Z tabulky 2 vyplývá, že jsme nemohli sledovat vliv nadměrného množství antigenu (4 . 10^9) u právě narozených králíčat, neboť z 34 nám po této dávce uhynulo 32; dále je zřejmé, že hynutí pokusných zvířat bylo značné po celou dobu trvání po-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

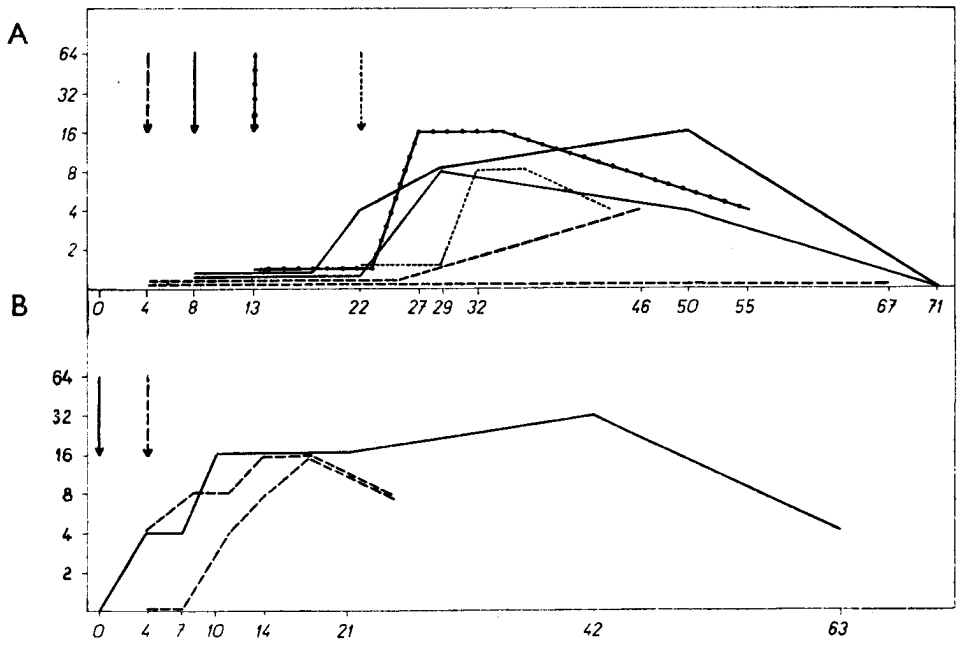
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

kusu. To bylo ovlivněno jak poškozením organismu antigenem, tak i častými odběry krve.

Imunisací štěňat jsme si ověřili, že urychlení tvorby protilátek nadměrnými dávkami neplatí pouze pro králíky. Po injekci malých dávek antigenu (10^8 na 1 kg intraperitoneálně) štěňatům 4., 8. a 13. den života se nevytvořily protilátky dříve než 20. den po narození. Naopak injekce nadměrné dávky antigenu (10^{10} na 1 kg intraperitoneálně) vpravené ihned po narození a 4. den života, vyvolaly okamžitou protilátkovou odpověď (obr. 2).

Tab. 2. Přežití mláďat po injekcích různým množstvím antigenu

Skupiny podle imunisační dávky	Stáří králíčat braných do pokusu	Počet králíčat braných do pokusu	Přežilo do prvního odběru	Procento přežitých do prvního odběru	Dožilo do revakcinace (4 měsíce)	Procento přežitých do revakcinace
10^8	5 dnů	53	46	86,8	9	17
10^9	5 dnů	18	18	100	9	50
$2 . 10^9$	5 dnů	23	18	78,2	1	4,35
$4-6-10 . 10^9$	5 dnů	41	17	41,4	11	26,8
$2 . 10^9$	0—1 den	149	45	32	21	14,1
$4 . 10^9$	0—1 den	34	2	5,87	2	5,87
Kontroly		34	29	85,3	17	50,0



Obr. 2. Tvorba protilátek po různých dávkách antigenu u štěňat jednoho vrhu. A — Imunisace dávkou 10^8 na 1 kg váhy. Touto dávkou byla imunisována štěňata (4. den čárkovaně), 8. den (plně), 13. den (plně s tečkami), 22. den (tečkovaně). B — Imunisace dávkou 10^{10} na 1 kg váhy. Touto dávkou byla imunisována štěňata ihned po narození (plně) a čtvrtý den života (čárkovaně). Osa x: dny života štěňat, vyznačeny dny odběru krve; osa y: titr protilátek udán ředěním sera.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Revakcinace

U všech králíčat, kterým jsme krátce po narození injikovali různé dávky antigenu, jsme provedli ve stáří 4 měsíců revakcinaci jednou dávkou paratyfového antigenu v množství 10^7 mikrobů (tab. 3). Chtěli jsme zjistit, jak předchozí dávky antigenu ovlivňují revakcinační odpověď.

U skupiny mláďat, kterým jsme v prvých dnech života vpravili nadměrné množství antigenu ($4 . 10^9$ a $6 . 10^9$) dochází po revakcinaci k nepatrnému zvýšení titru. Hladina protilátek se u nich téměř nezměnila ve srovnání s hladinou protilátek před revakcinační dávkou.

Skupina mláďat, kterým byl ihned po narození injikován antigen v menším množství ($2 . 10^9$), mají po revakcinaci všechny typy odpovědí od nepatrného zvýšení až k vysokému titru protilátek.

Statistické zhodnocení prokazuje, že králíčata, kterým jsme injikovali v mládí (od narození do 5. dne života) dávku $4 . 10^9$ a $6 . 10^9$ bakterií, mají po revakcinaci hladinu protilátek významně nižší než skupina kontrolní. Králíčata, která byla injikována po narození dávkou $2 . 10^9$, nemají statisticky významný rozdíl proti kontrolní skupině. Rozdíl mezi oběma skupinami pokusnými ($2 . 10^9$ a $4 . 10^9$ a $6 . 10^9$) je rovněž statisticky významný.

Tab. 3. Revakcinační odpověď čtyřměsíčních králíků, kterým jsme po narození injikovali různé dávky antigenu a revakcinovali dávkou 10^7 mikrobů *S. paratyphi B* intravenosně. V tabulce jsou uvedeny nejvyšší hladiny protilátek, které jsme stanovili během opakovaných odběrů (3, 6, 10, 14 a 21 dní) po revakcinaci.

1—5 dnů $4-6 . 10^9$ i. p.	0—1 den $2 . 10^9$ i. p.	Kontroly
8	32	32
8	32	32
8	32	32
8	32	64
16	64	64
16	64	64
16	64	64
16	64	64
32	128	128
32	128	128
32	128	128
32	256	128
32	256	256
	256	256
	512	256
		512
		512
M = 16	M = 64	M = 128

Diskuse

Z předložených výsledků je zřejmé, že narozená králíčata mají období, ve kterém za žádných z uvedených podmínek nedokazujeme protilátky v seru (do 10. dne života). Protože jim však byly nadměrné dávky vpraveny 5. den života a protilátky v seru se objevují 10. den, musí docházet k počátku tvorby protilátek již před 10. dnem. Reakce na antigen je však v tomto období tak snížená, že malé dávky tvorbu protilátek v tomto období nevyvolávají. Domníváme se, že další vývoj mláďat vede v souladu s morfologicko-funkčním vyzráním mesenchymální tkáně (Říman 1955) k postupnému zvyšování citlivosti vůči antigenu, která, jak vidíme z tabulky 1, je dostatečná i pro malé dávky mezi 25. a 30. dnem života. Jsme si vědomi, že působení nadměrného množství antigenu může mít též vliv na urychlení procesu vyzrání mesenchymální tkáně. Účinek velkých kvant antigenu se může tedy uskutečňovat jak tím, že překonává menší citlivost tkáně velkými dávkami, tak i tím, že pod vlivem silného antigenního podnětu se urychluje metabolicko-funkční vyzrání mesenchymu mláďat. Je zajímavé, že význam množství antigenu pro rozvoj protilátkové odpovědi mláďat nebyl dosud podrobně řešen.

Časová závislost vytváření protilátek v postnatálním životě je určena zralostí jednotlivých druhů zvířat při narození; na této skutečnosti závisí doba prvního objevení se protilátek i možnost aktivní anafylaktické sensibilisace (Sirotinin 1944, 1950). To dokládají i naše výsledky u štěňat, kde po injikování nadměrné dávky

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

dochází (proti králičatům) téměř k okamžité protilátkové odpovědi. Po injikování malých dávek antigenu se pak první protilátky objevují ve srovnání s králičími mláďaty rovněž dříve, již kolem 20. dne po narození.

V pracích, ve kterých se sleduje vliv antigenu podaného králíčatům krátce po narození, nebyly protilátky v prvém období života zjištěny (Hannan a Oyama 1954, Dixon a Maurer 1955, Cinader a Dubert 1955). V uvedených pokusech nebyly však ani soustavně sledovány. Tuto skutečnost, že nebyly protilátky zjištěny, je možno vysvětlit i jinou kvalitou antigenu užitého v našich pokusech. Antigen *S. paratyphi* B obsahuje kromě bílkovinných antigenů i komponentu endotoxickou. Z přehledu hynutí zvířat (tab. 2) je možno posoudit, jak podaný antigen mláďata poškozuje. Vpravený endotoxický antigen je velký mobilisující podnět, především ve směru rozvinutí obranných schopností organismu. Vpravuje-li se naopak i velké množství antigenu bez přímého poškozujícího působení, na př. serový albumin, nedochází v takovém rozsahu k podráždění a nezbytné imunitní odpovědi organismu. Patrně nebude bez významu i forma podávaného antigenu. V jiných dosud nepublikovaných pokusech jsme prokázali, že stejně jako u dospělých i u mláďat je korpuskulární antigen již v prvých hodinách vychytán z krve do vnitřních orgánů. Naproti tomu tekuté antigeny homologní i cizorodé (serové bílkoviny a protilátky) přetrvávají u mláďat v oběhu týdny (Wiener 1951, Barr, Glenny a Randall 1949, Dixon, Maurer 1955, Trnka a Říha 1957 — dosud nepublikováno). Současně sledujeme, jaký význam bude mít injikování tekutých bakterijních antigenů králičím mláďatům.

Útlum tvorby protilátek po revakcinační dávce ve stáří 4 měsíců jsme prokázali pouze u skupiny s nadměrným množstvím antigenu, které je na hranici smrtelné dávky. Výsledky práce Cohna (1956) a Smitha a Bridgese (1956), kteří nezjistili útlum, si vysvětlujeme tím, že injikovali v mládí zvířatům nedostatečná množství bakterijního antigenu. V našich pokusech již jenom částečné snížení množství antigenu vede při revakcinaci ke smazání rozdílů vůči kontrolám (tab. 3).

Již zmíněná otázka kvality antigenu ukazuje význam i ve vztahu k vytvoření útlumu. Antigeny málo dráždivé, krvinky a jiné tkáňové buňky (Billingham, Brent a Medawar 1953, Hašek 1953, 1954, Hašek a Hraba 1955, Simonsen 1955, Koprowski 1955, Toolan 1955), serové bílkoviny (Hanan a Oyama 1954, Dixon a Maurer 1955, Cinader 1955, Downe 1955) vyvolávají plnou „získanou toleranci" vůči další dávce stejného antigenu. V pokusech s bakterijními antigeny, které přímo poškozují funkci organismu, dochází k podobnému útlumu na množství antigenu, které organismus maximálně snáší. Neúplný útlum je možno vysvětlit i tím, že množství injikovaného bakterijního antigenu $2 \cdot 10^9$ mikrobů je váhově na sušinu pouze 0,28 mg. Jak nepatrné je to množství vpraveného antigenu, ukazuje srovnání s pokusy Dixona a Maurera (1955), kteří denně po 100 dní injikují 10 mg sera albuminu, a Cinadera (1955), který v prvé dávce po narození vpravuje 100—400 mg lidského albuminu.

Skutečnost, že jsme prokázali po nadměrných dávkách bakterijního antigenu v prvém měsíci života králíčat významné urychlení tvorby protilátek a po 4 měsících u týchž zvířat útlum tvorby protilátek po revakcinační dávce, nelze dosavadními představami o mechanismech imunologických útlumů plně objasnit. Jde-li o přetrvávání antigenu v tkáních v nezměněné antigenní formě nebo v podobě aktivních štěpů původních antigenů, současně experimentálně řešíme.

Souhrn

Po injekci antigenu *S. paratyphi B* 5 dnů starým králíčatům v dávce 10^8 bakterií do peritonea i do krevního oběhu se u nich vytvářejí protilátky teprve koncem prvého měsíce života.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Zvýšením této dávky na 4 . 10^9 a 6 . 10^9 bakterií intraperitoneálně se významně urychlí začátek tvorby protilátek. Protilátky prokazujeme u mláďat v průměru již 15. den života.

Ačkoliv menší množství antigenu (2 . 10^9 mikrobů) injikované právě narozeným králíčatům urychluje tvorbu protilátek ve srovnání s dávkou 10^8, je méně účinné nežli dávka 4 . 10^9 a 6 . 10^9 mikrobů, injikovaná 5 dní starým králíčatům.

Stejného urychlení tvorby protilátek injekcemi velkých dávek antigenu bylo dosaženo i u štěňat.

Všechna králíčata, která byla injikována po narození různými dávkami antigenu a dožila se 4 měsíců, byla revakcinována dávkou 10^7 mikrobů *S. paratyphi B*. Statisticky významný útlum tvorby protilátek po revakcinační dávce byl zjištěn pouze u králíků injikovaných v prvých dnech života dávkou 4 . 10^9 a 6 . 10^9. Skupina králíčat injikovaná ihned po narození 2 . 10^9 mikrobů nemá po revakcinaci statisticky významné snížení tvorby protilátek proti skupině kontrolní.

V diskusi je hodnocen význam kvality a množství bakterijního antigenu pro naše nálezy vzhledem k již publikovaným pracím o útlumu tvorby protilátek dosaženém antigeny jiného charakteru (tkáňovými buňkami, serovými bílkovinami).

Literatura

Barr, M., Glenny, A. T., Randall: *Concentration of diphteria antitoxin in cord blood and rate of loss in babies.* Lancet II : 324, 1949.

Baumgartner, L.: *Age and antibody production. I. Qualitative changes in antisera associated with age.* J. Immunol. 27 : 407, 1934a.

Baumgartner, L.: *Age and antibody production. II. Further observations on qualitative changes in antisera associated with age.* J. Immunol. 27 : 417, 1934b.

Billingham, R. E., Brent, L., Medawar, P. B.: *Actively acquired tolerance of foreign cells.* Nature 172 : 603, 1953.

Buxton, A.: *Antibody production in avion embryos and young chicks.* J. Gen. Microb. 10 : 398, 1954.

Cinader, B., Dubert, J. M.: *Acquired immune tolerance to human albumin and the response to subsequent injections of diazo human albumin.* Brit. J. Exp. Path. 36 : 515, 1955.

Cohn, M.: *The problem of specific inhibition of antibody synthesis in adult animals by immunizing the embryos.* Transpl. bull. 3 : 70, 1956.

Dixon, F. J., Maurer, P. H.: *Immunologic unresponsiveness induced by protein antigens.* J. Exp. Med. 101 : 245, 1955.

Downe, A. E. R.: *Inhibition of the production of precipitating antibodies in young rabbits.* Nature 176 : 740, 1955.

Freund, J.: *Influence of age to immunological reactions.* J. Immunol. 18 : 315, 1930.

De Gaetani, G. F., Terranova, T., De Gregorio, P.: *Sulla produzione degli anticorpi secondo la via d'introduzione dell'antigene.* Riv. Instit. Sieroterap. Ital. 30 : 1, 1955.

Hanan, R., Oyama, J.: *Inhibition of antibody formation in mature rabbits by contact with the antigen at an early age.* J. Immunol. 73 : 49, 1954.

Hašek, M.: *Vegetativní hybridisace živočichů spojením krevních oběhů v embryonálním vývoji.* Čs. biologie 2 : 265, 1953.

Hašek, M.: *Projevy vegetativního sblížení v adaptaci vyššího živočicha na cizorodé antigeny.* Čs. biologie 3 : 327, 1954.

Hašek, M., Hraba, T.: *Immunological effects of experimental embryonal parabiosis.* Nature 175 : 764, 1955.

Kerr, W. R., Robertson, M.: *Passively and actively acquired antibodies for Trichomonas foetus in very young calves.* J. Hygiene 52 : 253, 1954.

Koprowski, H.: *Actively acquired tolerance to a mouse tumor.* Nature 175 : 1088, 1955.

Říman, J.: *O postnatální metabolicko-morfologické ontogenese kostní dřeně.* Kandidátská disertační práce, Praha 1955.

Simonsen, M.: *Artificial production of immunological tolerance. Induced tolerance to heterologous cells and induced susceptibility to virus.* Nature 175 : 763, 1955.

Sirotinin, N. N.: *Pro anafylaksiju u novoronaroždenych.* Medič. Žurnal. (Kijev) 12, 13, 1944.

Sirotinin, N. N.: *Immunitet s točki zrenija obščej i sravnitelnoj patologiji. Problemy immuniteta i grippa.* Moskva 1950.

Smith, R. T., Bridges, R. A.: *Response of rabbits to defined antigens following neonatal injection.* Transpl. Bull. 3 : 145, 1956.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Sokolova, V. Ju., Kalegajeva, A. I.: *Aktivnaja immunizacija protiv šiga - dizenteriji razvivajuščichsja životnych.* Voprosy vozrastnoj imunologii. Leningrad 1947.
Šterzl, J.: *Průkaz a biologické vlastnosti tkáňového prekursoru serových protilátek.* Čs. biologie 4 : 321, 1955.
Šterzl, J.: *Tvorba protilátek isolovanými buňkami sleziny po smíšení s antigenem in vitro.* Čs. mikrobiologie 2 : 1, 1957.
Toolan, H. W.: *Attempts to produce tolerance in rats to human tumors by injection of these animals in utero human tissues.* Transpl. Bull. 2 : 103, 1955.
Updyke, E. L., Conroy, S.: *Classification of serum for storage in liquid or lyophile state.* J. Bact. 72 : 277, 1956.
White, C.: *The use of ranks in a test of significance for comparing two treatments.* Biometrics 8 : 33, 1952.
Wiener, A. S.: *The half-life of passively acquired antibody globulin molecules in infants.* J. Exp. Med. 94 : 213, 1951.

Ускорение образования у молодых животных антител с помощью больших доз антигена и влияние этого вмешательства на реакцию на ревакцинирование во взрослом состоянии

Я. Штерцль и З. Трнка

Резюме

После впрыскивания антигена S. paratyphi B в количестве 10^8 микробов в полость брюшины и в кровяное русло 5-дневным крольчатам антитела у них образуются только к концу первого месяца жизни. Увеличение этой дозы до 4—6 . 10^9 микробов в брюшину значительно ускоряет начало образования антител. Антитела у молодых животных в среднем могут быть найдены уже на 15-ый день жизни. Несколько меньшее количество антигена (2 . 10^9) при впрыскивании только что родившимся крольчатам оказывается менее эффективным, чем доза в 4—6 . 10^9 микробов, введенная 5-дневным крольчатам, — хотя и ускоряет образование антител в сравнении с дозой в 10^8 микробов. Такое же ускорение образования антител путем введения больших доз антигена было получено и у щенят. Все крольчата, привитые после рождения различными дозами антигена и дожившие до 4 месяцев, ревакцинировались дозой в 10^7 микробов S. paratyphi B. Статистически значимое подавление образования антител после ревакцинирующей дозы было отмечено только у кроликов, привитых в первые дни жизни дозой в 4—6 . 10^9. Группа крольчат, привитая немедленно после рождения дозой в 2 . 10^9 микробов, не выказывала после ревакцинации статистически значимого снижения способности к образованию антител в сравнении с контрольной группой. — Обсуждается значение качества и количества бактериального антигена для наблюдавшихся нами явлений в связи с опубликованными уже нами работами, касавшимися подавления образования антител, получаемого с помощью антигенов другого характера (клеток ткани, сывороточных белков).

Acceleration of Antibody Formation in Young Animals by Large Doses of Antigen and the Influence of This on the Revaccination Response in Adult Life

J. Šterzl, Z. Trnka

Summary

Following the intraperitoneal and intravenous injection of the antigen *Salmonella paratyphi B* in 5-day-old rabbits, in doses of 10^8 microorganisms, antibodies are not formed until the end of the first month of life. On increasing this dose to $4-6 \times 10^9$ micro-organisms, injected intraperitoneally, the commencement of antibody formation is significantly accelerated. Antibodies are demonstrated in the young animals on an average by the 15th day. A smaller amount of antigen (2×10^9 micro-organisms) injected immediately after birth, while accelerating antibody formation as compared with a dose of 10^8, is less effective than a dose of $4-6 \times 10^9$ micro-organisms injected in 5-day-old rabbits. The same acceleration of antibody formation, obtained by the injection of large doses of antigen, has also been achieved in puppies. All the rabbits which were given various doses of antigen after birth and reached the age of four months, were revaccinated with a dose of 10^7 micro-organisms of *S. paratyphi B*. Statistically significant inhibition of antibody formation following revaccination was found only in the rabbits injected in the first days of life with a dose of $4-6 \times 10^9$ micro-organisms. The group of rabbits given injections of 2×10^9 micro-organisms immediately after birth showed no statistically significant decrease in antibody formation after revaccination as compared with the control group. The discussion contains an evaluation of the significance of the quality and amount of bacterial antigen for the above findings, with reference to communications already published, dealing with the inhibition of antibody formation by antigens of a different character (tissue cells, serum proteins).

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 2. (1957) — č. 3

Působení antibakterijních protilátek v organismu se změněným stavem reaktivity. I.

Narkotický spánek a infekce *Salmonella paratyphi B* u bílých krys

IVAN ŘÍHA

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 27. 12. 1956

Jedním ze způsobů, jak je možné určit, zda se chová organismus při působení protilátek aktivně nebo pasivně, je měnit fysiologickou reaktivitu organismu a sledovat, jak se snížení nebo zvýšení odolnosti zvířete projeví na preventivním účinku vpravených protilátek. Ve své práci jsme vycházeli z předpokladu, že snížení účinku protilátek současně se snížením odolnosti pokusných zvířat bude důkazem aktivního podílu organismu při obranném působení protilátek.

V posledních letech se objevilo v Sovětském svazu mnoho prací, zkoumajících různé funkce organismu za stavu narkotického spánku. V imunologické literatuře představují tyto práce největší část pokusů, zjišťujících vliv nervového systému na různé imunitní pochody. Výsledky pokusů ukazují, že narkotickým spánkem je možno podstatně ovlivnit průběh infekce nebo intoxikace, a to jak ve směru zlepšení, tak i zhoršení, podle druhu studovaného materiálu. Poněvadž tento zásah podstatně mění reaktivitu organismu jak k toxinu, tak i k mikrobnímu činiteli, použili jsme narkotického spánku ke zjišťování vlivu změn fysiologického stavu organismu na působení protilátek. Mimo to starší práce studující vliv narkosy na působení protilátek (Georgievski a Cantacuzén — citováno podle Mečnikova 1913) uvádějí, že jejich účinek u zvířat v narkotickém stavu je potlačen. Souhlasně u nás zjistili Málek a sp. (1953), že je možno vyvolat urethan-barbitalovým spánkem intoxikaci difterickým toxinem i u zvířat s obsahem antitoxinu v krvi.

Nejdříve jsme sledovali vliv narkotického spánku na působení protilátek při infekci *Salmonella paratyphi B*. Výsledek tohoto pokusu měl zodpovědět otázku, zda je narkotický spánek vhodným modelem, nebo zda bude nutné hledat jiné řešení.

Materiál a metody

Pokusy jsme dělali na bílých krysách o váze 200—250 g, které jsou sice značně odolné k experimentální infekci, takže průběh infekce se liší od běžných přirozených infekcí, ale které jsou současně značně odolné k působení narkotika, takže je možné u nich vyvolat dlouhodobý spánek bez patrnějšího poškození.

Spánek jsme vyvolávali modifikací směsi Učitělové (Málek a sp. 1953), obsahující 10 % urethanu a 0,75 % barbitalu ve fysiologickém roztoku. Používanou dávku 0,7 ml směsi na 100 g váhy zvířat jsme vpichovali 2 hodiny před infekcí intramuskulárně do zadní končetiny. Spánek trvající po této dávce 6—10 hodin jsme prodlužovali polovičními dávkami urethan-barbitalové směsi vpichované těm zvířatům, u kterých se objevil zvýšený tonus svalstva, hlavně šíjového, a která na změnu polohy reagovala pohybem. Poslední dávky narkotika jsme podávali 40—44 hodin po první dávce. Spánek trval průměrně 50 hodin.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

K pasivní imunisaci jsme používali králičího antisalmonellového sera, získaného smícháním ser několika králíků imunisovaných teplem zabitou suspensí *Salmonella paratyphi B*. Poněvadž bylo pro každý pokus zapotřebí velké dávky sera, používali jsme vždy sera čerstvého. Z téhož důvodu jsme užili v posledním pokusu terapeutického antisalmonellového koňského sera (Bioveta).

Zvířata jsme infikovali suspensí *S. paratyphi B* ve fosfátovém fysiologickém roztoku v koncentraci 2 miliardy mikrobů v 1 ml (stanoveno turbidimetricky). Suspensi jsme vpravovali v různých dávkách intraperitoneálně.

Ke zjištění vnímavosti k endotoxinům jsme spícím a bdícím krysám vstřikovali teplem zabitou suspensi (70 °C po 1 hod.) *S. paratyphi B* v koncentraci 2 miliardy mikrobů v 1 ml v různých dávkách intraperitoneálně.

Přestup bakterií z peritonea do krve a vychytávání mikrobů z krve jsme stanovovali po intraperitoneálním nebo intrakardiálním vpichu infikující dávky mikrobů podle bakteriemie v krvi odebírané po odstřižení konečku ocasu z utvořené kapky v množství 0,01 ml, rozředěné v destilované vodě 200krát a 2000krát a počet mikrobů jsme stanovili kultivací.

Výsledky

Provedli jsme čtyři pokusy celkem na 322 bílých krysách, v nichž jsme zjišťovali vliv narkotického spánku na působení protilátek při infekci. Ve všech případech

Tab. 1. Vliv urethan-barbitalového spánku na působení králičího antisalmonellového sera u bílých krys. Pasivní imunisace byla provedena u jedné části krys 20 hodin před infekcí vpichem 1 ml sera podkožně (20 hod.), u druhé části krys vpichem 1 ml sera současně s infikující suspensí intraperitoneálně (s + i). Současně byla infikována i normální bdící a spící zvířata.
Infekční dávka byla vpichována do břišní dutiny, množství mikrobů je udáno v ml suspense (1 ml 2 miliardy mikrobů *S. paratyphi B*).

Počet zvířat	Spánek	Pasivní imunisace	Dávka 2miliardové susp. v ml	Uhynutí ve dnech po infekci				
				1.	2.	3.	4.	celkem
4			0,25					0
4			0,5	2	2			4
4			1,0	4				4
4			2,0	4				4
4		s + i	1,0					0
4		s + i	2,0	4				4
4		s + i	4,0	4				4
4		s + i	6,0	4				4
4		20 h						0
4		20 h	2,0	3	1			4
4		20 h	4,0	3	1			4
4		20 h	6,0	4				4
5	+		0,125	1	1		2	4
5	+		0,25	1	3			4
5	+		0,5	2	2		1	5
5	+		1,0	3	1		1	5
5	+	s + i	0,5	1	3			4
5	+	s + i	1,0	3	2			5
5	+	s + i	2,0	4	1			5
5	+	s + i	4,0	5				5
5	+	20 h	0,5	1	2			3
5	+	20 h	1,0	1	2		2	5
5	+	20 h	2,0	5				5
5	+	20 h	4,0	4			1	5

vedl urethan-barbitalový spánek trvající průměrně 50 hodin k podstatnému snížení odolnosti zvířat k infekční dávce, která se pohybovala u bdících zvířat mezi 1 až 2 miliardami mikrobů injikovaných intraperitoneálně a která klesala u spících zvířat o více než 50 %.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Kolísání smrtné dávky mikrobů bylo způsobeno jednak vlastností kultury, ze které byla suspense připravena, jednak dobou uplynulou od okamžiku suspendování mikrobů v pufrovaném fysiologickém roztoku do vpravení mikrobů krysám. Ve fysiologickém roztoku docházelo postupně k poklesu virulence kultury. Poněvadž bylo prakticky obtížné udržet tyto podmínky ve všech pokusech stálé, titrovali jsme raději současně v každém pokusu smrtnou dávkou.

Tab. 2. Vliv urethan-barbitalového spánku na působení koňského antisalmonellového sera (Biovetà) u bílých krys (označení viz tab. 1).

Počet zvířat	Spánek	Pasivní imunisace	Dávka 2miliardové susp. v ml	Uhynutí ve dnech po infekci			
				1	2	3	celkem
5			0,5	2			2
5			0,75	2			2
5			1,0	2	1		3
5		s + i	2,0				0
5		s + i	2,5		1		1
5		s + i	3,0	1			1
5		s + i	3,5	2	1		3
5	+		0,25		1		1
5	+		0,5	2	2		4
5	+		0,75	5			5
10	+	s + i	2,0	3	5		8
10	+	s + i	2,5	5	2		7
10	+	s + i	3,0	7	3		10
10	+	s + i	3,5	7	3		10

Ve třech pokusech jsme použili k pasivní imunisaci krys králičího antisalmonellového sera, které jsme vstřikovali buď subkutánně 20 hodin před infekcí, nebo jsme podávali serum smíšené s kulturou intraperitoneálně. Ve čtvrtém pokusu jsme použili koňského antisalmonellového sera, které mělo ve srovnání s králičím serem téměř dvojnásobný ochranný účinek. V množství 1 ml chránilo koňské serum při současném vpravení s mikroby intraperitoneálně 4 krysy z 5 při dávce 6 miliard mikrobů, při infekci 7 miliardami mikrobů uhynuly 3 krysy z 5. Králičí serum (1 ml) chránilo při současném vpravení s mikroby maximálně proti 4—5 miliardám mikrobů, v průměru proti 3 miliardám (tab. 1 a 2).

Tab. 3. Vliv narkotického spánku na toxické působení usmrcené kultury *S. paratyphi B.*
Dávky bakterií udány v miliardách, úmrtí v hodinách.

	Počet krys	Dávky mikrobů	Úmrtí v hodinách
Bdící	7	20	8, 8, 8, 11, 11, 11, 12
	7	12	8, 12, 12, 18, 23, —, —
	7	6	11, —, —, —, —, —, —
Spící	6	20	6, 14, 15, 16, 18, 18,
	7	12	13, 14, 14, 27, 48, —, —
	7	8	8, 41, —, —, —, —, —

Ve všech čtyřech pokusech se projevilo působení urethan-barbitalu u pasivně imunisovaných zvířat snížením smrtné dávky mikrobů. Ve třetím pokusu (tab.1), kde byla DLM u bdících pasivně imunisovaných zvířat 4 miliardy mikrobů, klesla u spících na 2 miliardy u obou způsobů pasivní imunisace.

Ve čtvrtém pokusu byly výsledky ještě výraznější. Koňské antisalmonellové

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

serum, chránící u bdících krys ještě při dávce 7 miliard mikrobů 2 krysy z 5, chránilo u spících při použití 4 miliard mikrobů jen 3 krysy z 10 (tab. 2).

Tab. 4. Vliv urethan-barbitalového spánku na bakteriemii bílých krys pasivně imunisovaných 20 hodin před infekcí. Infekce byla provedena vpichem 2 miliard mikrobů *S. paratyphi B* intraperitoneálně. Počet mikrobů byl stanovován v krvi kultivací. V tabulce je udáván počet mikrobů v 0,01 ml krve za 10, 30, 60, 180 a 360 min. po vpichu infekce.

		Počet mikrobů v krvi za minuty				
		10	30	60	180	360
Bdící	1.	26 200	1 000	3 200	132	—
	2.	2 600	800	1 000	264	0
	3.	5 800	0	24 000	400	532
	4.	7 600	1 600	97 000	2 640	—
	5.	800	0	800	0	—
Průměr		8 600	680	25 200	687	266
Spící	1.	9 000	5 000	162 000	13 040	—
	2.	80 200	82 800	176 400	2 520	640
	3.	21 600	255 000	89 600	800	640
	4.	0	5 800	10 000	400	—
	5.	64 200	26 800	71 800	132	—
Průměr		35 000	75 080	101 960	3 378	640

Tab. 5. Působení urethan-barbitalového spánku na bakteriemii krys pasivně imunisovaných vstříknutím antisera současně s infikující dávkou intraperitoneálně. Označení jako u tab. 4.

		Počet mikrobů v krvi za minuty			
		10	30	60	180
Bdící	1.	2 200	1 800	15 400	132
	2.	25 200	15 400	19 000	0
	3.	2 200	2 400	5 600	132
	4.	3 400	5 200	4 000	0
	5.	2 200	21 800	75 000	2 400
Průměr		7 040	9 320	23 800	532
Spící	1.	0	3 400	16 800	0
	2.	0	200	5 200	132
	3.	200	600	1 400	0
	4.	0	0	400	0
	5.	0	200	10 800	132
Průměr		40	880	6 920	52

Tab. 6. Působení urethan-barbitalového spánku na bakteriemii krys pasivně imunisovaných 20 hodin před infekcí po intrakardiálním vpichu suspense *S. paratyphi B*. Označení jako u tab. 4.

		Počet mikrobů v krvi za minuty		
		30	60	180
Bdící	1.	36 000	74 000	4 920
	2.	64 000	13 200	24 800
	3.	140 000	15 200	+
	4.	52 000	70 000	18 640
	5.	10 000	8 800	9 440
Průměr		60 400	36 240	14 450
Spící	1.	72 000	7 800	4 400
	2.	28 000	11 600	4 000
	3.	194 000	20 600	12 000
	4.	172 000	17 000	4 400
	5.	74 000	11 000	5 440
	6.	30 000	3 800	2 400
Průměr		95 000	11 966	5 440

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Vnímavost v endotoxickém působení usmrcené kultury *S. paratyphi B* je za spánku snížena, což se projevuje prodloužením doby uhynutí. Průměrná doba hynutí bdících krys po dávce 20 miliard bakterií byla 9,8 hod., u spících 14,5 hod. Po 12 miliardách hynuly bdící krysy v průměru za 14,6 hod. (uhynulo 5 krys ze 7) a spící za 23,2 hod. (uhynulo rovněž 5 ze 7). Dávku 6 miliard mikrobů přežila většina krys (tab. 3).

Průběh infekce jsme sledovali stanovováním bakteriemie. Celkem jsme provedli stanovení u 50 krys. U zvířat, která byla pasivně imunisována 20 hodin před infekcí (20 krys), bylo v krvi větší množství mikrobů u spících zvířat za 10, 30 a 60 minut, za 3 a 6 hodin již nebyl podstatný rozdíl (tab. 4). Při současném vpichu suspense a protilátek se objevuje v krvi jen velmi malé množství mikrobů v prvních 10 a 30 minutách, za 1 hodinu po infekční dávce rozdíl v množství mikrobů ve prospěch spících zvířat mizí (při širokém rozptylu hodnot). Za 3 hodiny je u obou skupin zvířat počet mikrobů stejný (tab. 5). Při vpravení infekční dávky intrakardiálně krysám pasivně imunisovaným 20 hodin před infekcí jsou rozdíly v mizení mikrobů z krve bdících a spících krys nepatrné (tab. 6).

Diskuse

Působení urethan-barbitalové směsi vyvolává jako nejnápadnější projev útlum centrálního nervového systému. Vedle toho však dochází i k ovlivnění celé řady dalších pochodů, a to jak prostřednictvím útlumu CNS, tak i bezprostředním působením. Urethan má na příklad význačný účinek na krvetvorbu; opakované podávání malých dávek urethanu vede ke snížení tvorby bílých krvinek, a proto se ho používá jako léku u leukemií. Stejně tak potlačuje urethan bujení nádorových buněk (Haddow a Sexton 1946). O tom, že urethan působí bezprostředně na dělící se buňky, svědčí antimitoxický účinek, který byl pozorován u rostlin po urethanu (Dustin 1947, Templeman a Sexton 1945).

Ve vyšších koncentracích má urethan účinky bakteriostatické až bakteriocidní (Weinstein a Donaldová 1946), ovšem v koncentracích (2—5 %) nepřicházejících v organismu v úvahu. Dále vyvolává urethan při delším podávání vznik plicních adenomů u myší (Smith a Rous 1948, Rogers 1951), pod vlivem urethanu se snižuje u erythrocytů jejich permeabilita (Anselmino a Hoenigová 1930). Vedle účinku na mesenchymální elementy jsou jistě velmi významné i změny pozorované na cévách. Větší dávky urethanu vyvolávají poškození jaterních sinusoidů i jaterního parenchymu (Doljanski a Rosin 1944).

Pro rozsáhlé účinky urethanu nepovažujeme za správné pokládat za přesvědčující průkaz účasti nervového systému v některém ději organismu to, že je možno děj podáním urethan-barbitalu ovlivnit. Chápeme změnu reaktivity vyvolanou urethan-barbitalovou směsí jako následek přímého nebo nepřímého působení urethanu na řadu tkání a jejich funkcí, s dominujícím účinkem na nervový systém.

Vnímavost krys k urethan-barbitalové směsi individuálně kolísala. Značnou roli hraje i otázka dávkování a subjektivní faktor hodnocení hloubky spánku a tedy i nutnost aplikace další dávky narkotika. Tyto důvody jsou asi hlavní příčinou, proč je někdy velice obtížné srovnávat výsledky získané různými autory. Infekce krys *S. paratyphi B* má částečně charakter intoxikace a liší se od přirozených infekcí. O tom svědčí již to, že k úmrtí dochází u normálních krys hlavně v prvních 24 a 48 hodinách po infekci, kdežto pozdější úmrtí jsou poměrně vzácná, ačkoliv je možno podle našich zkušeností zjistit živé mikroby v orgánech infikovaných zvířat ještě 25 dnů po infekci. Krysy jsou k infekci *S. paratyphi B* značně odolné, smrtná dávka se v našich pokusech pohybovala mezi 1—2 miliardami živých mikrobů, zatím co k usmrcení krysy teplem zabitými mikroby je třeba dávka jen 10—20krát vyšší (po intraperitoneálním vpravení).

Snížení odolnosti krys k paratyfu po urethan-barbitalu nelze připsat pouze na vrub narkosy, poněvadž narkosa jiným narkotikem zvyšuje odolnost k této infekci (Strigin 1953). Podobně u infekce vyvolané *Eberthella typhi* vyvolával urethanový spánek zhoršení průběhu u morčat a bílých krys, zatím co luminal u myší průběh infekce neovlivňoval (Sviridova 1955). Změny ve vnímavosti vyvolané narkotiky jsou závislé nejen na jejich charakteru, ale i na druhu použitého zvířete. Streptokoková infekce se po urethanu a luminalu zhoršuje u bílých myší, zatím co u morčat je průběh spíše zmirňován (Gres-Edelman, Žuk a Kitčenko 1955).

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Výsledky našich pokusů ovlivnit působení protilátek změnou stavu zvířete ukazují, že je možno urethan-barbitalovým spánkem skutečně snížit uplatnění preventivního účinku sera. Tyto výsledky potvrzuje i práce Palanta a sp. (1955), kteří rovněž pozorovali snížení účinku antibakterijních protilátek v urethanovém spánku. Podle našich pokusů dochází ke snížení účinku protilátek po urethan-barbitalu jak při rovnoměrném rozdělení protilátek v organismu (při podání sera 20 hodin před infekcí), tak i při současném vpravení protilátek s infikující suspensí intraperitoneálně; snížení probíhá současně s poklesem odolnosti k použitému mikrobu. U zvířat v bdícím stavu byla poměrně ostrá hranice účinnosti sera. Za spánku tato ostrá hranice chyběla, což je pravděpodobně následkem různé vnímavosti zvířat k urethan-barbitalovému spánku, projevující se i různou hloubkou a délkou spánku krys po stejné dávce narkotika.

K ochrannému působení sera je především třeba, aby došlo k reakci mezi antigenem a protilátkami přítomnými v seru. V pokusech, ve kterých jsme podávali serum 20 hodin před infekcí a kde došlo k vytvoření rovnováhy v koncentraci protilátek mezi tkáňovým mokem a krví, mohly vést změny v cevně tkáňové bariéře vyvolané urethanem k poruše přestupu protilátek z tkáňového moku do krve a z krve do peritoneální dutiny a tím i ke snížení množství protilátek reagujících s mikroby. Tomu nasvědčuje to, že u spících krys, které byly imunisovány 20 hodin před infekcí králičím antisallmonelovým serem, se objevují v krvi větší množství mikrobů nežli u bdících kontrol (tab. 4).

Porušení mobilisace protilátek není hlavní příčinou sníženého preventivního účinku sera v urethan-barbitalovém spánku, což dokazuje to, že k snížení dochází i při vpravení protilátek současně s mikroby, kdy přestup protilátek do tkání a z tkání do krve hraje minimální úlohu.

Změny ve vnímavosti k infekci *S. paratyphi B* vyvolané urethan-barbitalovým spánkem mohou být způsobeny buďto snížením antibakterijní obrany nebo zvýšením vnímavosti krys k endotoxinům. Výsledek pokusu s vnímavostí spících a bdících krys k toxickému působení usmrcené suspense *S. paratyphi B* ukazuje, že vnímavost k endotoxickému působení bakterií je za spánku spíše snížená, takže příčinou poklesu resistence krys k salmonellové infekci je zřejmě snížení antibakterijní obrany.

Význam přestupu mikrobů z peritoneální dutiny do krve a vychytávání z krve je názorně patrný z dalšího pokusu, ve kterém jsme stanovovali bakteriemii u normálních i pasivně imunisovaných bdících a spících krys.

Výsledky ukazují, že není podstatně ovlivněno vychytávání mikrobů z krve, poněvadž při intrakardiální infekci nejsou patrné rozdíly v mizení mikrobů (mezi bdícími a spícími), ale že hlavní rozdíl u obou skupin zvířat je v přestupu mikrobů z peritonea do krve. Přechod mikrobů z břišní dutiny je sice zpomalen, ale dosahuje poměrně brzo stejné úrovně u bdících i spících zvířat, a to v době, kdy ještě nemůže dojít k většímu pomnožení mikrobů.

Domníváme se, že rozdíly v prostupnosti peritonea a lymfatických cest, patrné v první hodině po infekci, nemohou vysvětlit rozdíly ve vnímavosti spících a bdících krys k usmrcené kultuře *S. paratyphi B* a že rozdíly v toxickém působení usmrcených mikrobů jsou důkazem snížení vnímavosti spících krys k endotoxickému působení antigenů použitého mikroba. Snížení vnímavosti k mrtvé kultuře při současném zvýšení vnímavosti k infekci ukazuje na to, že urethan-barbitalový spánek působí především na antibakterijní obranné mechanismy spících zvířat.

Souhrn

Narkotický spánek, vyvolaný vstřikováním urethan-barbitalové směsi a trvající 50 hodin, snižuje odolnost bílých krys k infekci *Salmonella paratyphi B*. Současně

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

narkotický spánek snižuje i letální dávku bakterií u krys, kterým bylo vpraveno antisalmonellové serum.

Vnímavost k endotoxickému působení usmrcené suspense *S. paratyphi B* se u krys v urethan-barbitalovém spánku snižuje.

U spících krys, kterým byla vstříknuta intraperitoneálně suspense bakterií současně s antiserem, je v první hodině v krvi značně nižší počet mikrobů než u bdících zvířat, naopak u spících zvířat pasivně imunisovaných 20 hodin před infekcí je přestup mikrobů z peritoneální dutiny do krve v první hodině větší než u bdících. Na mizení mikrobů z krve u krys, infikovaných intrakardiálně a pasivně imunisovaných 20 hodin před infekcí, narkotický spánek podstatnější vliv nemá.

Z výsledků uzavíráme, že narkotikum zvyšuje vnímavost zvířat k salmonellové infekci snížením jejich antibakterijní obrany a tím snižuje i ochrannou účinnost pasivně vpravených antibakterijních protilátek.

Literatura

Anselmino, K. J., Hoenig, E.: *Weitere Untersuchungen über Permeabilität und Narkose.* Pflüger's Arch. ges. Physiol. 225 : 56, 1930.

Doljanski, L., Rosin, A.: *Studies on the early changes in the livers of rats treated with various toxic agents, with especial reference to the vascular lesions. I. The histology of the rat's liver in urethane poisoning.* Am. J. Pathol. 20 : 945, 1944.

Dustin, P.: *Some new aspects of mitotic poisoning.* Nature 159 : 794, 1947.

Gres-Edelman, B. E., Žuk, A. C., Kitčenko, A. V.: *Vlijanije processov vozbuždenija i tormoženija CNS na tečenije streptokokovoj infekciji v eksperimente.* ŽMEI (2) : 8, 1955.

Haddow, A., Sexton, W. A.: *Influence of carbamic esters (urethanes) on experimental tumors.* Nature 157 : 500, 1946.

Málek, J., Houba, V., Prášilová, F., Slavík, R.: *Vliv narkotického spánku na infekce a mikrobiální intoxikace.* Čs. hyg. epid. mikrobiol. 2 : 210, 1953.

Mečnikov, I. I.: *Die Lehre von den Phagozyten und deren experimentelle Grundlagen.* Kolle und Wasserman's Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, díl II., část 1., str. 655, 1913.

Palant, B. L., Olejnikova, E. A., Fintiktikova, R. P., Mitelman, P. M.: *Roľ tormoženija i vozbuždenija CNS v razvitiji nekotorych infekcij i immuniteta.* ŽMEI (5) : 53, 1955.

Rogers, S.: *Age of the host and others factors affecting the production with urethan of pulmonary adenomas in mice.* J. Exp. Med. 93 : 427, 1951.

Smith, W. E., Rous, P.: *The neoplastic potentialities of mouse embryo tissues. IV. Lung adenomas in baby mice as result of prenatal exposure to urethane.* J. Exp. Med. 88 : 529, 1948.

Sviridova, T. A.: *Infekcionnyj i postinfekcionnyj immunitet k brjušnotifoznym bakterijam na morskich svinkach i javlenija allergiji i paraallergiji.* Sborník Voprosy aktivnoj immunizacii protiv kišečnych infekcij. Moskva 1955.

Strigin, V. A.: *Vlijanije ugnetenija nervnoj sistemy na infekciju i immunitet. Vlijanije dlitelnovo uretanoveronalovovo sna na produkciju brjušnotifoznych agglutininov pri revakcinaciji.* ŽMEI, (3) : 12, 19, 1953.

Templeman, W. G., Sexton, W. A.: *Effect of some aryl carbamic esters and related compounds upon cereals and others plant species.* Nature 156 : 630, 1945.

Weinstein, L., Donald, D.: *The action of urea and some of its derivates on bacteria. III. The effect of combining urea or urethan with penicillin on mixed cultures of gram-positive and gram-negative bacteria.* J. Immunol. 54 : 145, 1946.

Действие противобактерийных антител в организме с измененным состоянием реактивности. I.

Наркотический сон и инфекция Salmonella paratyphi B у белых крыс

И. Ржига

Резюме

Целью нашей работы было установить соотношение между действием противобактерийных антител в организме и состоянием реактивности подопытного животного. Мы производили опыты на белых крысах, устойчивость которых к экспериментальной инфекции микробом Salmonella paratyphi B мы снижали с помощью наркотического сна, вызываемого впрыски-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

ваниями раствора с 10% уретана и 0,75% барбитала в количестве 0,7 мл/100 г веса животного. Для пассивной иммунизации мы пользовались кроличьей или лошадиной антисалмонеллезной сывороткой. 50-часовый наркотический сон понижает летальную дозу микробов, вводимых спящим крысам в полость брюшины, более чем на 50%. В то же время у спящих пассивно иммунизированных крыс наблюдается понижение протективного действия сыворотки (табл. 1, 2), — как при пассивной иммунизации за 20 часов до инфекции, так и при одновременном введении в полость брюшины и микробов и сыворотки (табл. 1). У спавших крыс, которым впрыскивались различные дозы убитых путем прогревания микробов S. paratyphi B, время выживания бывало длительнее, чем у животных без наркоза (табл. 3). Уретан-барбиталовый наркоз оказывает влияние и на переход микробов из полости брюшины в кровь: у спавших крыс, которым в полость брюшины впрыскивалась взвесь живых микробов одновременно с противосывороткой, количество микробов в крови в течение первого часа бывало значительно ниже, чем у животных без наркоза (табл. 5); напротив, у спавших крыс, которым сыворотка впрыскивалась подкожно за 20 часов до заражения в полость брюшины, переход микробов из полости брюшины в кровь в течение первого часа бывал интенсивнее, чем у контрольных животных (табл. 4). Эти результаты мы объясняем ослаблением перехода антител из крови в полость брюшины у животных, иммунизированных пассивно за 20 часов до заражения, и понижением интенсивности перехода сенсибилизированных микробов из полости брюшины в кровь у животных, которым мы вводили микробы в брюшную полость одновременно с сывороткой. На очищение крови от микробов наркотический сон влияния не оказывает (табл. 6). Из своих опытов мы делаем вывод, что смесь уретан-барбитала повышает чувствительность в инфекции Salmonella в результате ослабления антибактерийной защиты у опытных животных, а тем самым и ослабления пассивного протективного действия введенных противобактерийных антител.

The Action of Antibacterial Antibodies in an Organism with a Changed State of Reactivity. I.

Narcotic Sleep and Infection with *Salmonella paratyphi B* in White Mice

I. Říha

Summary

The aim of the work was to ascertain the relationship between the action of antibacterial antibodies in the organism and the state of reactivity of the experimental animal. Experiments were carried out in white rats, in which resistance to experimental infection with the micro-organism *Salmonella paratyphi B* was reduced by narcotic sleep induced by the injection of a solution containing 10% urethane and 0.7% barbital (0.7 ml. solution/100 g. body-weight). Rabbit or equine anti-salmonella serum was used for passive immunisation.

Narcotic sleep, lasting 50 hours, reduced the lethal dose of micro-organisms, injected into the sleeping rats intraperitoneally, by more than 50%. At the same time, in sleeping, passively immunised rats a decrease also occurred in the protective effect of the serum (tabs. 1 and 2), both in the case of passive immunisation 20 hours before infection and also in the simultaneous intraperitoneal injection of micro-organisms and serum (tab. 1).

In sleeping rats injected with various doses of heat inactivated micro-organisms of *S. paratyphi B*, the period of survival was longer than in waking animals (tab. 3).

Urethane-barbital sleep also influences the penetration of the micro-organisms from the peritoneal cavity into the blood. In sleeping rats injected intraperitoneally with a suspension of living micro-organisms together with the antiserum, the number of micro-organisms in the blood in the first hour was considerably lower than in waking animals (tab. 5), whereas in sleeping rats in which serum was injected subcutaneously 20 hours before intraperitoneal infection, the penetration of micro-organisms from the peritoneum into the blood in the first hour was greater than in the control animals (tab. 4). These results are explained as being due to a decrease in the penetration of antibodies from the blood into the peritoneum in animals passively immunised 20 hours before infection and to a decrease in the penetration of sensitized micro-organisms from the peritoneum into the blood in animals injected intraperitoneally with micro-organisms and serum simultaneously. Narcotic sleep has no effect on the recovery of micro-organisms from the blood (tab. 6).

It is concluded from the results that a urethane-barbital mixture increases susceptibility to infection with Salmonella, by reducing the antibacterial defence of the experimental animals and thus also reducing the protective effect of passively administered antibacterial antibodies.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Československá
MIKROBIOLOGIE
ročník 2. (1957) — č. 3

Rozdelenie izoaglutinínov pri papierovej elektroforéze a hodnoty γ globulínu u séra s extrémne vysokým titrom

JURAJ IVÁNYI, PAVOL IVÁNYI a MILENA TOMÁŠKOVÁ

Ústřední biochemické laboratoře, Fakultní nemocnice, Praha
Přednosta prof. Dr J. Hořejší
Biologický ústav, lékařská fakulta, Karlova universita, Praha
Přednosta prof. Dr B. Sekla

Došlo 22. 11. 1956

Všeobecne sa uznáva, že je úzky vzťah medzi protilátkami a γ-globulínovou frakciou krvného séra. Potvrdzujú to početné údaje o shodnej elektroforetickej mobilite a zvyšování γ-globulínu počas imunizácie (Tiselius a Kabat 1939, van der Scheer a Wyckoff 1940, Peter a Hanser 1952). Na druhej strane niektorí autori lokalizovali protilátky aj na frakcie séra s väčšou mobilitou než γ-globulín a mnohé práce poukazujú na značnú disociaciu medzi hladinou γ-globulínu a titrom protilátok (Larson 1952, Peter a Hanser 1953, Hanan a Oyama 1954, Scheiffarth a Berg 1955). Tieto vzťahy sme sledovali u izoimunného králičieho séra s neobyčajne silnou biologickou aktivitou (jeho vstrekovaním sme mohli vyvolať akútny izotransfuzný šok a experimentálnu fetálnu erythroblastózu, Iványi a sp. 1956), s titrom kompletných izoaglutinínov 1 : 1 000 000 a inkompletných 1 : 126 000 000. U tohoto séra sme vyšetrovali elektroforetickú mobilitu kompletných a inkompletných protilátok na papieri, sledovali sme titer izoaglutinínov a hladinu γ-globulínu v priebehu reimunizácie. Predpokladali sme, že lokalizácia serologickej aktivity v elektroforetickom spektre a vzťah medzi γ-globulínom a titrom izoaglutinínov bude pri tomto extrémne vysokom titru výrazne vyznačený.

Materiál a metody

Pracovali sme bežnou serologickou metodikou, ktorú sme popísali v predchádzajúcom zdelení (Iványi, Tomášková a Vondrášková 1956). Imunizovali sme 50% suspenziou erythrocytov vo fyziologickom roztoku. Aglutinačné reakcie boli prevedené skumavkovou metódou. Na dôkaz inkompletných protilátok sme použili trypsínovou reakciu. Izoaglutiníny sme uvolňovali do fyziologického roztoku vo vodnom kúpeli pri 56 °C.

Bielkovinné frakcie séra a mobilitu protilátok sme určovali pomocou elektroforézy na filtračnom papieri. Používali sme vlhkú komôrku, veronal-Na pufr o pH 8,6. Nanášali sme 0,025 ml séra na papier Whatmann č. 4. Pri napätí 300 V sme sérum rozdelovali 8—12 hodín. Uložením filtračného pásu vyššie nad hladinu pufru dosiahli sme predlženie elektroforetického spektra na 15—16 cm. Bielkovinné frakcie sme vyfarbovali bromfenolovou modrou a hodnotili sme ich kolorimetricky po elucii podľa Pechara (1954).

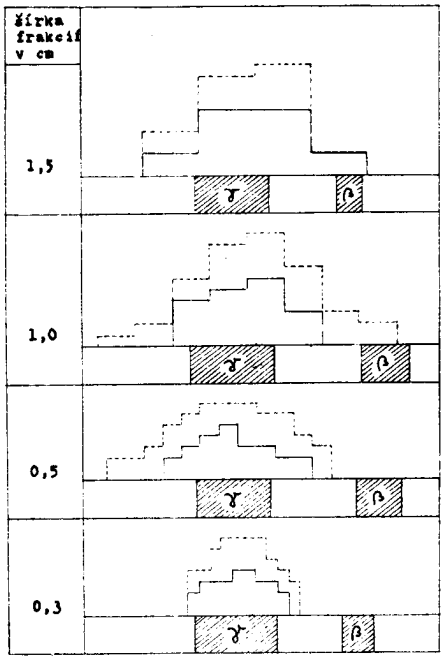
Elektroforetické rozdelenie protilátok sme zisťovali určením titru serologickej aktivity v jednotlivých častiach elektroforeogramu. Po rozdelení séra z filtračního pásku pozdĺžne odstrihneme pásik 1,5 cm široký, ktorý zafarbíme a zbytok 3,5 cm široký rozstriháme na 1 cm prúžky. Tieto eluujeme v 0,2 ml fyziologického roztoku. V eluáte sa aglutinačnou reakciou zisťuje titer protilátok, ktorý nanášame na ordinátu grafu, ktorého abscisu tvorí prúžok zafarbeného elektroforeogramu. Takto získaný elektroforeoaglutinogram nás názorne informuje o lokalizácii specifickej aktivity v elektroforetickom spektre.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Výsledky

Pri určovaní elektroforetického rozdelenia izoaglutinínov sme vo väčšine pokusov používali sérum králika s extrémne vysokým titrom. Výsledky ukázali (obr. 1), že serologicky aktívny úsek je značne široký a zahrňuje celú frakciu γ s priľahlými časťami spektra. Najvyšší titer — hrot serologickej aktivity — sme zistili v rychlejšej časti γ-frakcie a na jej rozhraní s intervalom γ—β. Táto lokalizácia izoaglutinínov (γ_1) súhlasí s literatúrou (Payne a Deming 1954).



Obr. 2. Lokalizácia hrotu serologickej aktivity izoaglutinínov v elektroforetickom spektre.

Pokúsili sme sa lokalizovať hrot serologickej aktivity na úsek čo najužší a preto sme rozstrihávali filtračný pásik na postupne menšie prúžky (obr. 2). Sérum sme niekoľkokrát súčasne delili na štyroch páskach, ktoré sme rozstrihali na 1,5, 1,0, 0,5 a 0,3 cm široké prúžky. Ukázalo sa však, že vo frakciach z úseku menšieho než 1,5—1 cm je rovnaký najvyšši titer prítomný súčasne v dvoch až troch sérovkách. Ak berieme do úvahy ešte titračnú chybu $\pm$ 3 sérovky, vidíme, že nie je možné lokalizovať hrot serologickej aktivity na frakciu užšiu než 1—1,5 cm.

Okrem aglutinačnej reakcie vo fyziologickom roztoku titrovali sme eluáty i s erytrocytmi natrávanými trypsínom na dôkaz inkompletných protilátok. Výsledky nám ukázali, že titer inkompletných protilátok je v každom úseku elektroforetického spektra vyšší než titer protilátok kompletných a že protilátky kompletné i inkompletné majú totožný hrot; že inkompletné protilátky majú širší specificky účinný úsek, ktorý presahuje až na β-globulín (obr. 1).

U králika č. 126 sme sledovali mobilitu protilátok počas reimunizácie. Z obrazu 3 vidíme, že mobilita hrotu izoaglutinínov v začiatočných fázach reimunizácie je mierne znížená voči mobilite na vrchole imunizácie. Keďže tento posun je v rámci chýb metodiky, nemôžeme robiť ešte konečné závery z týchto výsledkov, i keď súhlasia s niektorými údajmi literatúry (Fischer 1955).

Pretože sérum, ktoré sme používali, malo extrémne vysoký titer, mohli sme sa pokúsiť o lokalizáciu izoaglutinínov uvolnených do roztoku. Uvolnením izoaglutinínov zo shluklých erytrocytov do fyziologického roztoku vo vodnom kúpeli sme získali eluát o titru 1 : 120, ktorý sme elektroforetizovali. Roztok izoaglutinínov bol silne hemolytický, následkom čoho sa na elektroforeograme vytvorila hemoglobinová frakcia. V oblasti γ-frakcie sa bielkovina nevyfarbila, i keď serologická aktivita bola prítomná. Pomocou pripojeného elektroforeogramu séra, ktoré bolo súčasne delené, môžeme srovnať rozdelenie izoaglutinínov a hemoglobínu vo fyziologickom roztoku s rozdelením bielkovinných frakcií séra (obr. 4). Pre pomerne nízky titer kompletné protilátky sme dokázať nemohli, zatiaľ čo inkompletné mali rovnakú mobilitu ako v séru.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

U troch králikov sme sledovali, či dochádza ku kvantitatívnym zmenám v bielkovinnom spektre počas izoimunizácie (tab. 1). Séra boli vyšetrované pred imunizáciou, na vrchole a po poklese titru. Dvaja králici vytvorili protilátky v nízkom titru, zatiaľ čo králik č. 126 mal titer izoaglutinínov vo fyziologickom roztoku 1 : 1 000 000. Z tabuľky 1 vidíme, že hodnoty jednotlivých bielkovinných frakcií kolísajú iba v rámci fyziologických výkyvov, ktoré sú u králika dosť značné (Stürmer 1951). Nezistili sme žiadny vzťah medzi titrom izoaglutinínov a hladinou γ-globulínu, ktorá nestúpala ani u králika č. 126, keď titer izoaglutinínov dosiahol extrémne vysokej hodnoty.

Tab. 1. Bielkovinné frakcie séra počas izoimunizácie

Číslo králika	Dátum odberu	Titer séra	Bielkoviny séra v %				
			Alb.	$alfa_1$	$alfa_2$	beta	gama
126	13. IX. 55	0	61,8	7,7	12,5	13,7	14,5
	27. IX. 55	1 000 000	64,2			9,2	14,5
	3. X. 55	1 000 000	59,1	8,3	6,8	10,6	14,7
	2. III. 56	2000	64,5	6,2	6,4	10,7	12,3
	29. III. 56	120	65,8	5,1	6,2	10,2	12,5
16	13. IX. 55	0	63,1	4,7	1,9	13,7	16,3
	3. X. 55	240	59,0	8,7	6,6	10,0	15,7
	21. XI. 55	16	54,2	6,7	5,6	12,9	18,2
127	13. IX. 55	0	59,7	7,5	3,1	12,4	17,4
	3. X. 55	64	64,1	6,5	6,4	10,2	13,4
	23. XI. 55	4	66,5	10,4		9,3	13,7

Na obraze 5 môžeme porovnať Tiseliove krivky séra od králika neimunizovaného a králika s extrémne vysokým titrom izoaglutinínov. I keď v hodnote celkového γ-globulínu nie je kvantitatívny rozdiel, vidíme u králika č. 126 rozštepenie γ-frakcie, ktoré by mohlo byť podmienené vysokým titrom izoaglutinínov. Pre nedostatok séra sme podrobnejšie vyšetrenie nemohli previesť.

Diskuzia

Papierová elektroforéza bola v poslednej dobe použitá na určenie elektroforetického rozdelenia hemaglutinínov, antibakterijných i orgánových protilátok (Payne a Deming 1954, Illés a Balla 1956, Scheiffarth a Berg 1955). Filtračný pásik sme rozstrihávali na rovnako široké úseky na rozdiel od niektorých autorov (Jankovic 1953, Fischer 1955), ktorí rozstrihávali podľa bielkovinných frakcií, čo pokladáme za menej dôsledné vzhľadom na prítomnosť serologickej aktivity aj v medzifrakciach. Na rozdiel od Laurellové (1955) sme titry eluátov nanášali v aritmetickej rade a nie v geometrickej, lebo tým by sa obraz elektroforeoaglutinogramu skresľoval, najmä pri vyšších titroch.

Izoaglutiníny sa nachádzajú v Cohnovej ethanolickej frakcii III-1 (Enders 1944) a majú elektroforetickú mobilitu γ_1 (Deutsch a Alberty 1946). Payne a Deming (1954) nenašli žiadne rozdiely v mobilite prirodzených a imunných hemaglutinínov, ani závislosť na skupinových vlastnostiach krve. Králičie izoaglutiníny lokalizoval Fischer (1955) do frakcie s mobilitou γ-globulínu a hemoglobínu. V našich pokusoch sme potvrdili mobilitu γ_1 pre králičie izoaglutiníny. Serologickú aktivitu vykazoval pomerne široký úsek začínajúci 1—2 cm pred γ-frakciou a siahajúci až k β-globulínu, čo je dokladom značnej elektroforetickej heterogennosti protilátok. Pozorovali sme, že so stúpajúcim titrom deleného séra sa rozširuje serologicky aktívny úsek elektro-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

foretického spektra. Je samozrejmé, že súčasne závisí šírka serologicky aktívneho úseku od zriedenia, ktoré nastane v priebehu elektroforetického rozdelovania, teda od objemu nanášeného séra, od objemu fyziologického roztoku použitého na elúciu jednotlivých frakcií a od šírky týchto frakcií. Väzba specifickej aktivity u hyperimunného séra na úseky elektroforetického spektra priľahlé ku γ-globulínu a na β-globulín teda zrejme nie je spôsobená tvorbou protilátok s inou elektroforetickou mobilitou pri hyperimunizácii, ale ide o heterogennosť protilátok, ktorá je prítomná aj pri nízkom titru, pri ktorom sa ovšem pre značné zriedenie nedá dokázať. Podobne môžeme predpokladať, že na okrajoch serologicky aktívneho úseku, kde sme dokázali iba inkompletné protilátky, boli prítomné aj kompletné a nedokázali sme ich pre nízky titer v týchto partiach. Značná elektroforetická heterogennosť protilátok možno spôsobila, že údaje jednotlivých autorov o lokalizácii protilátok na bielkovinné spektrum sú často nejednoznačné. Myslíme, že pod pojmom elektroforetickej mobility protilátky by sa mala rozumieť mobilita hrotu serologickej aktivity, ktorá sa nemení v závislosti na titru použitého séra.

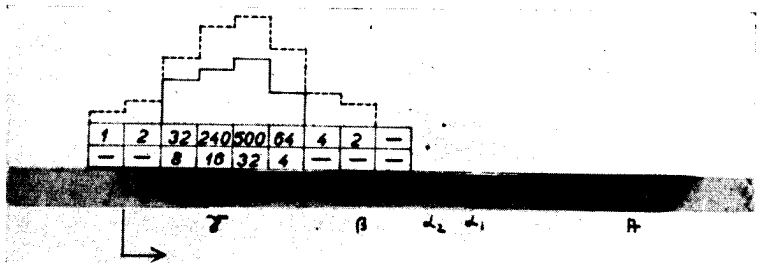
Neni možné na tomto mieste podrobnejšie rozoberať problematiku kompletných a inkompletných protilátok. Zistenie, že hrot izoaglutinínov určených trypsínovou reakciou je totožný s hrotom vo fyziologickom roztoku, súhlasí s nálezmi Stürmera a Prokopa (1952) a Jankovica (1953) a podporuje názor o látkovej totožnosti izoaglutinínov. Na druhej strane Cann a Brown (1951) a Wiener (1954) udávajú pre inkompletné protilátky rozdielne elektroforetické mobility; Witebskymu (1948) sa podarilo pomocou dialýzy séra voči vode oddeliť niekoľko frakcií, do ktorých izoloval rôzne Rh protilátky.

Mnohé nejasnosti v lokalizácii protilátok by sa dali vysvetliť, keby sa potvrdilo zistenie niektorých autorov, že mobilita protilátok sa mení v priebehu imunizácie. Tiselius a Kabat (1939) a podobne Deutsch (1948) našli zvýšenú mobilitu antibakterijných protilátok a antitoxínov v pozdejších fázach imunizácie. Laurell (1955) zistila, že Wassermanovo reagens má v prvom štádiu syfilis mobilitu γ-globulínu, v druhom štádiu γ alebo β_2 a v treťom štádiu až na malé výnimky mobilitu β_2-globulínu. Fischer (1955) udáva, že pri prvoimunizácii stúpajú protilátky viazané na γ-globulín, zatiaľ čo pri následných imunizáciach sa zvyšuje koncentrácia „voľných" protilátok, prítomných v medzifrakcii $\beta-\gamma$. Z týchto údajov vyplýva, že v priebehu imunizácie sa zväčšuje elektroforetická mobilita protilátok. Naznačovali to aj niektoré naše výsledky u králičích izoaglutinínov. Predpokladáme, že zmeny, ktoré tu nastávajú, sú veľmi malé a preto na ich presné a reprodukovateľné zaznamenanie naša metodika pre titračnú chybu $\pm$ 3 sérovky nie je dostatočne priekazná.

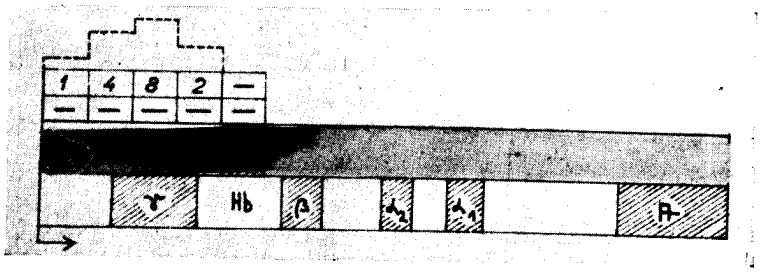
Údaje literatúry o zmenách v bielkovinnom spektre počas izoimunizácie sú pomerne chudé. Stürmer a Prokop (1952) po imunizácii dobrovoľníc Rh antigenmi nenašiel zvýšenie hladiny γ-globulínu. Schleyer (1954) nezistil žiaden rozdiel v hladine γ-globulínu po absorpcii izoaglutinínov. U králikov našiel Fischer (1955) iba štatisticky hodnotitelné zvýšenie γ a β-globulínovej frakcie. U našich výsledkov treba brať do úvahy, že králici boli vyšetrovaní počas reimunizácie, u ktorej podľa Fischera (1955) stúpanie hladiny γ-globulínu často nie je prítomné. Zatiaľ u heteroimunizácie udávajú Peter a Hanser (1953), že pri následných imunizáciach hladina γ-globulínu stúpala ďalej až o 40 %, zatiaľ čo titer protilátok sa už nezvyšoval. Sérum s titrom 1 : 1 000 000 sme niekoľkokrát vyšetrili papierovou elektroforézou a pre kontrolu Tiseliovou elektroforézou a hodnotu γ-globulínu pomocou rivanolu (Kořínek 1955). Ani jednou metodikou sme nezaznamenali významné stúpnutie γ-globulínovej frakcie. Jedným z faktorov, ktoré sa tu uplatňujú, môže byť to, že pri izoimunizácii nevzniká nespecifický globulín, ktorý pri heteroimunizácii tvorí pravdepodobne časť zvýšenej γ-globulínovej frakcie (Boyd 1937). Bodon (1956) predpokladá, že tvorba protilátok nemusí byť podmienená kvantitatívnym zmnožením γ-globulínu, ale jeho kvalitatívnou zmenou. Prítomnosť izoaglutinínov v ethanolickej frakcii III-1 s elektroforetickou mobilitou γ_1 a antibakterijných

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6



Obr. 1. Elektroforetická mobilita kompletných a inkompletných izoaglutinínov králika. Titer vo fyziologickom roztoku je vyznačený plnou čiarou, číselne v dolnom riadku. Titer trypsínovej reakcie čiarkovane, číselne v hornom riadku.



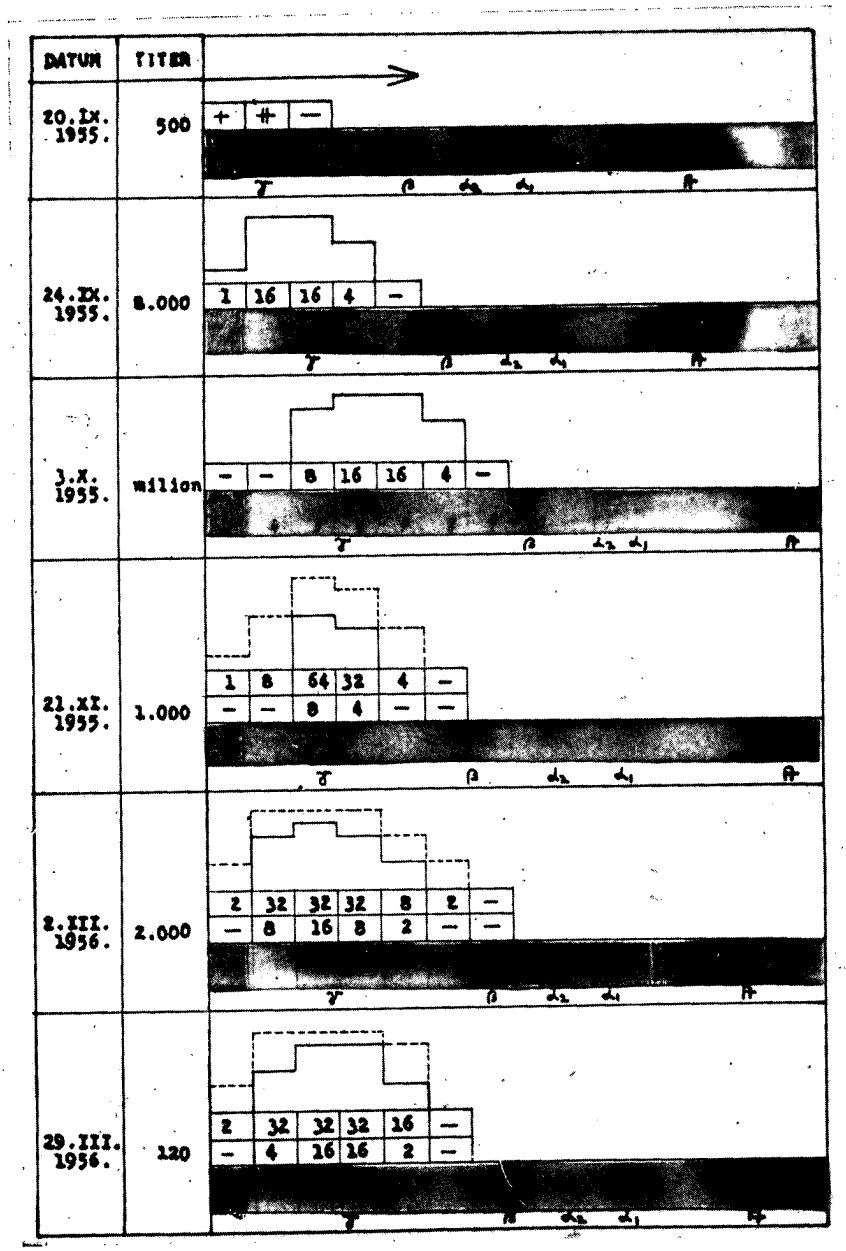
Obr. 4. Mobilita izoaglutinínov uvolnených do fyziologického roztoku.

a *b*

Obr. 5. Elektroforetická krivka a) králika neimunizovaného, alb. 54,10, α 10,15, β 13,05, γ 22,70, A/G 1,18, b) králika č. 126 s titrom izoaglutinínov 1 : 1 000 000, alb. 55,90, α 8,70, β 13,03, γ_1 6,25, γ_2 15,95, A/G 1,26.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6



Obr. 3. Mobilita izoaglutinínov v priebehu imunizácie.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

protilátok vo frakcii II s mobilitou γ_2 (Deutsch 1946) ukazuje na možnosť, že tu ide o protilátkové molekuly odlišného charakteru. Zatiaľ čo antibakterijné séra majú výrazne zvýšený γ-globulín, množstvo izoaglutinínov sa v kvantite bielkovinnej frakcie neprejaví, ako to dokazujú údaje literatúry, negatívny výsledok u séra s extrémne vysokým titrom a prítomnosť specifickej aktivity v medzifrakciach elektroforetického spektra. Potvrdzuje to aj náš pokus, v ktorom sme delili roztok izoaglutinínov vo fyziologickom roztoku, keď serologická aktivita bola prítomná, zatiaľ čo bielkovina γ-globulínu sa nevyfarbila. Tieto výsledky sú v súhlase s názorom Edsallovym (1947), že specifická aktivita izoaglutinínov sa viaže na nepatrné kvantum bielkovinného substrátu.

Súhrn

U králičieho séra s extrémne vysokým titrom izoaglutinínov sme lokalizovali hrot specifickej aktivity do frakcie γ_1. Šírka sérologicky aktívneho úseku elektroforetického spektra je závislá na titru použitého séra. Pri extrémne vysokom titru sme našli izoaglutiníny s mobilitou až β-globulínu. U inkompletných protilátok je serologicky aktívny úsek širší, má vyšší titer a hrot má mobilitu vždy shodnú s kompletnými protilátkami. Rozdelenie izoaglutinínov uvolnených do fyziologického roztoku a v séru je shodné. U králika, ktorý po reimunizácii mal titer izoaglutinínov kompletných 1 : 1 000 000 a inkompletných 1 : 126 000 000, sme nenašli zvýšenú hladinu γ-globulínu.

Literatúra

Bodon, L., Richter, J.: *Development of immunity to foot-and-mouth disease in cattle.* Acta veterinaria hung. 6 : 211, 1956.

Boyd, W. C.: *Quantitative changes in antibodies and globulin fractions of rabbits injected with several antigens.* J. Immunol. 33 : 111, 1937.

Cann, J. R., Brown, R. A.: *Fractionation of Rh antiserum by electrophoresisconvection.* J. Immunol. 66 : 137, 1951.

Deutsch, H. F., Alberty, R. A.: *Separation and purification of a new globulin from normal human plasma.* J. Biol. Chem. 165 : 21, 1946.

Deutsch, H. F.: *Fractionation studies of normal and immune horse serum.* J. Biol. Chem. 176 : 797, 1948.

Edsall, J. T.: Advances in protein chemistry New York 3 : 447, 1947.

Enders, J. F.: *The concentration of certain antibodies in globulin fractions derived from human blood plasma.* J. Clin. Invest. 23 : 510, 1944.

Fischer, K.: *Papierelektrophoretische Serumeiweiss-Untersuchungen bei experimentell erzeugter Kaninchen-Erythroblastose.* Zschr. f. Hygiene 141 : 517, 1955.

Hanan, R., Oyama, I.: *Inhibition of antibody formation in mature rabbits by contact with the antigen at an early age.* J. Immunol. 73 : 49, 1954.

Illés, E., Balla, L.: *Comparative analysis of immune sera by paper electrophoresis combined with serological test.* Acta veterinaria hung. 6 : 201, 1956.

Iványi, P., Tomášková, M., Vondrášková, E.: *Experimentálny transfuzný šok.* Čas. lék. čes. 95 : 1321, 1956.

Iványi, P., Smetana, K., Tomášková, M.: *Experimentálna fetálna erythroblastóza u králikov.* Čs. biologie 5 : 319, 1956.

Jankovic, B.: *Serological activity of globulin fractions of anti-D sera separated by paper electrophoresis.* Nature 171 : 982, 1953.

Kořínek, J.: *Kvantitativní stanovení gama globulinu v krevním seru pomocí rivanolu.* Čas. lék. čes. 94 : 1170, 1955.

Larson, D. L.: *The relation of the level of serum proteins to antibody production.* J. Lab. Clin. Med. 39 : 129, 1952.

Laurell, A. B.: *On antibodies separated by paper electrophoresis with special reference to the Wassermann reagens.* Acta pathol. microbiol. Scand. Suppl. 103, 1955.

Payne, R., Deming, Q.: *Electrophoretic mobility in paper of isoagglutinins.* J. Immunol. 73 : 81, 1954.

Pechar, J.: *Elektroforesa bílkovin na papíře.* Sbor. pathofysiol. trávení a výživy 8 : 165, 1954.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Peter, H., Hanser, A.: *Der Ausdruck eines „reinen" Immunisierungsprozesses im elektrophoretischen Serum-Eiweissbild.* Zschr. Immunforsch. 109 : 383, 1952.
Peter, H., Hanser, A.: *Elektrophoretische Untersuchungen an Kaninchen bei der Herstellung von Anti-M- und Anti-N-Seren.* Z. Exp. Med. 121 : 419, 1953.
van der Scheer, J., Wyckoff, R.: *The electrophoretic analysis of several hyperimmune horse sera.* J. Immunol. 39 : 65, 1940.
Scheiffarth, F., Berg, G.: *Die Lokalisation von Organ-Autoantikörper in präparativ aufgetrennten Serumproteinfraktionen.* Klin. Wschr. 33 : 711, 1955.
Schleyer, F.: *Papierelektrophoretiche Untersuchungen über Blutgruppen-Antikörper in Serumeiweissfraktionen.* Klin. Wschr. 32 : 730, 1954
Stürmer, K.: *Quantitative Mikroelektrophorese von normalem Kaninchenserum.* Z. Exp. Med. 117 : 359, 1951.
Stürmer, K., Prokop, O.: *Klinische und experimentelle Untersuchungen bei Graviden mit Blutgruppenincompatibilität.* Klin. Wschr. 30 : 974, 1952.
Tiselius, A., Kabat, E. A.: *An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations.* J. Exp. Med. 69 : 119, 1939.
Wiener, A. S.: *Rh-Hr blood types.* New York 1954.
Witebsky, E.: *Studies on Rh antibodies.* J. Lab. Clin. Med. 33 : 1353, 1948.

Разделение изоагглютининов при бумажном электрофорезе и показатели гамма глобулина в сыворотках с крайне высоким титром

Ю. Ивани, П. Ивани и М. Томашкова

Резюме

У кроличьей сыворотки с крайне высоким титром изоагглютининов зубец специфической активности локализовался во фракции гамма$_1$. Широта сарологически активного участка электрофоретического спектра зависит от титра применяемой сыворотки. При крайне высоком титре мы находили даже изоагглютинины с подвижностью бета глобулинов. У неполных антител серологически активный участок бывает шире и отличается более высоким титром, а подвижность зубца всегда отвечает полным антителам. Разделение изоагглютининов, переходящих в физиологический раствор, и изоагглютининов в сыворотке — одинаково. У кролика, у которого титр полных изоагглютининов после реиммунизации был 1 : 1,000.000, а неполных — 1 : 126,000.000, мы не отмечали повышения уровня гамма-глобулина.

Separation of Isoagglutinins in Paper Electrophoresis and Values of Gamma Globulin in Serum with an Extremely High Titre

J. Iványi, P. Iványi, M. Tomášková

Summary

In rabbit serum with an extremely high titre of isoagglutinins, the peak of specific activity was localised in the gamma$_1$ fraction. The extent of the serologically active sector of the electrophoretic spectrum is dependent on the titre of the serum used. In the presence of an extremely high titre, isoagglutinins with mobility as great as that of beta globulin were found. In incomplete antibodies, the serologically active sector is broader, the titre is higher and mobility of the peak is always the same as for complete antibodies. The separation of isoagglutinins freed in physiological saline and serum is the same. No increase in the level of gamma globulin was found in a rabbit in which, after reimmunisation, the titre of complete isoagglutinins was 1 : 1,000,000 and of incomplete isoagglutinins 1 : 126,000,000.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Československá
MIKROBIOLOGIE
ročník 2. (1957) — č. 3

Význam δ lysinu pro choroboplodnost stafylokoků

JIŘÍ JOHANOVSKÝ

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 7. 12. 1956

Stafylokokový δ lysin byl popsán a určen před několika lety (Williams, Harper 1947, Elek, Levy 1950, Marks, Vaugham 1950). Je zřejmě totožný (Marks 1951) s dříve popsaným α_2 toxinem (Morgan, Graydon 1936). V tomto sdělení chceme odpovědět na otázku, jaký význam má δ lysin pro choroboplodnost stafylokoků. Dosavadní literární údaje jsou kusé a nejednotné a tato otázka nebyla dosud předmětem zvláštního zkoumání.

Materiál a metody

Pro pokusnou infekci byly vybrány kmeny vhodných vlastností, t. j. shodující se v tvorbě α toxinu a ostatních vlastnostech, avšak lišící se výrazně v tvorbě δ lysinu. Infikovali jsme 4hodinovou kulturou smytou s krevního agaru a standardisovanou fotometricky. Toxické vlastnosti použitých kmenů jsme určovali v toxinu připraveném kultivací na celofánu. Titr α toxinu byl zjišťován podle hemolysy králičích krvinek, titr δ lysinu podle hemolysy morčecích krvinek v přítomnosti jedné jednotky stafylokokového antitoxinu (Johanovský 1957b). Jako stafylokokového antitoxinu jsme použili koňského sera (Biogena) s obsahem 200 j/ml. Koagulásu, shlukovací faktor, fibrinolysin a hyaluronidásu jsme zjišťovali běžnými metodami.

Myšky jsme infikovali intraperitoneálně, morčata a králíky intradermálně. Antitoxin a čerstvé králičí serum nebo fysiologický roztok jsme smísili s infekční dávkou vždy bezprostředně před vstříknutím. Stanovení smrtelné dávky pro myšky a hodnocení zánětlivých a nekrotických reakcí u králíků a morčat bylo prováděno jako v dřívějších pracích (Johanovský 1956, 1957c).

Výsledky

V infekčních pokusech k průkazu významu δ lysinu jsme vyšli ze dvou skutečností: δ lysin není specificky neutralisován stafylokokovým antitoxinem a je částečně nespecificky neutralisován normálními čerstvými sery (Marks, Vaugham 1950, Marks 1951). Proto jsme mohli vyhodnotit jeho význam podle rozdílného výsledku infekce, vyvolané kmeny s různou tvorbou δ lysinu při měnění těchto dvou podmínek pokusu.

V prvých pokusech jsme použili sedmi stafylokokových kmenů, u kterých jsme určili velikost smrtelné dávky pro myšky při prosté infekci, při infekci se současným vstříknutím 20 jednotek antitoxinu a při infekci se součaným vstříknutím antitoxinu a 1 ml normálního králičího sera. Výsledek ukazuje v přehledu tabulka 1.

Při infekci stafylokokovými kmeny, tvořícími převážně jen α toxin, vede současné podání antitoxinu ke zvýšení odolnosti: k smrtelnému výsledku infekce je potřeba

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

několikanásobně větších dávek mikrobů. Naproti tomu u kmenů tvořících vedle α toxinu i větší množství δ lysinu nevede aplikace velkých dávek antitoxinu k účinné ochraně a k vyvolání smrtelné infekce stačí jen nepatrně zvýšená dávka mikrobů. Jestliže současně s antitoxinem vstříkneme myškám též normální králičí serum, dojde u nich při infekci kmeny tvořícími pouze α toxin k prudkému snížení odolnosti.

Tab. 1. Změny choroboplodnosti stafylokoků u myšek při použití antitoxinu a normálního sera u kmenů s různou tvorbou δ lysinu.

Označení kmene	Tvorba α toxinu	Tvorba δ lysinu	Celkem myšek	Velikost smrtelné dávky v mil. mikrobů		
				Prostá infekce	Infekce + antitoxin	Infekce + antitoxin + norm. serum
84	5120	5	85	150	600	150—200
621	1280	0	43	60—120	> 400*)	150
SB	2560	10	54	160	600	100—150
W	2560	80	64	500	800	> 1500*)
648	10240	80	49	300—400	400—500	800
SA	5120	160	45	200	200	> 500*)
332	1280	80	72	150	200	400

*) = všechna zvířata přežívají danou dávku infekce, pokus s vyšší dávkou nebyl proveden

Tab. 2. Výsledky stafylokokové infekce myšek při použití kmenů o různé tvorbě δ lysinu. V tabulce uvedeno procento uhynuvších myšek.

Titr δ lysinu	Počet kmenů	Celkem myšek	Prostá infekce %	Infekce + antitoxin %	Infekce + antitoxin + norm. serum %
0—10	3	105	67	32	82
40—160	5	161	78	77	37

Tab. 3. Zánětlivé a nekrotické reakce u králíků na vstříknutí 20 milionů stafylokoků spolu s různým množstvím antitoxinu a nespecifické neutralisaci δ lysinu. Vysvětlivky: N = nekrosa, R = erythem, r = slabý a krátkodobý erythrem, I = infiltrát; číselný údaj znamená průměr reakce v mm. Odečítáno za 24 a 48 hod., uvedené hodnoty znamenají průměrný výsledek ze čtyř pokusů

Množství antitoxinu	Kmen 84 (α)		Kmen W (α + δ)	
	+ fysiol. roztok	+ králičí serum	+ fysiol. roztok	+ králičí serum
0	RI 18 N 3	RI 16 N 3	RI 20 N 8	RI 10 N 2
0,4 j	RI 10	RI 8	RI 10 N 3	r 8
4 j	r ±	±	RI 10	—
40 j	—	—	r 10	—

Při infekci kmeny tvořícími α toxin a δ lysin k podobnému poklesu odolnosti nedochází, naopak velikost smrtelné dávky se nejméně dvojnásobně zvyšuje.

Tyto rozdíly odolnosti po vstříknutí normálního sera jsou často velmi výrazné. V jednom z pokusů jsme na příklad dospěli k těmto výsledkům: kmen SA (α + δ)

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

při infekci dávkou 400 milionů stafylokoků a vstříknutí antitoxinu: 7 myšek uhynulo, žádná nepřežila; při vstříknutí antitoxinu a normálního sera: 1 myška uhynula, 6 přežilo. Kmen 621 (pouze α toxin) při dávce 300 milionů stafylokoků a vstříknutí antitoxinu: žádné uhynutí, 7 myšek přežívá; při vstříknutí antitoxinu a normálního sera: 6 myšek uhynulo, 1 přežívá.

Tyto pokusy jsme opakovali s 8 dalšími kmeny, s tou změnou, že jsme používali dávky pouze 0,5 ml králičího sera. Myšky jsme infikovali dávkami individuálně vytitrovanými pro každý jednotlivý kmen (toutéž dávkou všechny pokusné skupiny u jednotlivých kmenů) a výsledek vyjadřujeme v procentu uhynulých myšek. Výsledky zcela potvrdily předchozí závěry (tabulka 2).

Tab. 4. Výsledky intradermální infekce stafylokokovými kmeny s různou tvorbou δ lysinu u morčat imunisovaných δ lysinem a kontrolních. Výklad symbolů jako v tab. 3.

	Infekce v dávce 200 milionů mikrobů kmeny			
	84 (α)	621 (α)	648 (α + δ)	W (α + δ)
Imunisovaná morčata				
312	RI 10 N 3	RI 15 N 7	RI 12 N 6	r 8
232	RI 12 N 5	RI 20 N 10	RI 12 N 4	r 15
451	RI 8 N 4	RI 16 N 8	RI 6 N 2 × 3	r 10
Kontrolní morčata				
441	RI 10 N 4	RI 15 N 8	RI 25 N 15	RI 15 N 5
439	RI 12 N 5	RI 20 N 6	RI 20 N 11	RI 20
442	RI 12 N 3	RI 20 N 6	RI 25 N 10 × 8	RI 15
12	RI 10 N 3	RI 18 N 8	RI 16 N 8	RI 10 N 2
30	RI 10 N 4	RI 20 N 10	RI 20 N 10	RI 15 N 3
35	RI 8 N 2	RI 15 N 5	RI 25 N 7	RI 20
Průměr imunisovaných	RI 10 N 4	RI 17 N 8	RI 10 N 4	r 11
Průměr kontrolních	RI 10 N 3,5	RI 18 N 7	RI 22 N 10	RI 16 N 1,5

V dalších pokusech jsme si nalezené vztahy ověřovali na intradermální infekci u morčat a králíků. Výsledek jednoho z typických pokusů ukazuje tabulka 3. Králíkům albínům byla vstříknuta intradermálně směs 0,1 ml stafylokokové suspense, 0,2 ml buď fysiologického roztoku nebo normálního králičího sera a 0,2 ml různého ředění stafylokokového antitoxinu. Kmen tvořící α toxin i δ lysin je ve svém účinku neutralisován jen částečně, podobně působí i normální králičí serum, při spoluúčasti obou látek nevzniká ani nekrosa ani zánět. U kmene tvořícího pouze α toxin je normální serum bez vlivu a antitoxin sám stačí k zabránění vzniku nekrosy i zánětu. Při pokusech na morčatech jsme obdrželi výsledky zcela stejné a rozdíly ještě výraznější, bylo však možno hodnotit pouze změny rozsahu a vymizení nekrosy, poněvadž samo králičí serum vyvolávalo při intradermálním vstříknutí zánětlivou reakci. Králičí serum samo bez antitoxinu stačilo u morčat při infikování kmenem, tvořícím větší množství δ lysinu, zabránit vzniku nekrosy velikosti více než 5 mm v průměru.

Řadu morčat jsme imunisovali intraperitoneálně opakovanými injekcemi malých dávek δ lysinu. Část zvířat zhynula postupně s obrazem δ intoxikace, u morčat,

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

která přežila, byly provedeny testy odolnosti vstříknutím δ lysinu a infekcí několika stafylokokovými kmeny intradermálně. Výsledek jednoho z pokusů ukazuje tabulka 4. Infekce kmeny tvořícími pouze α toxin probíhá stejně u morčat normálních a morčat imunisovaných δ lysinem. Kmeny, které tvoří vedle α toxinu i δ lysin, vyvolávají rozsáhlejší zánětlivé a nekrotické reakce u morčat neimunisovaných. To znamená, že snížená intensita reakcí u morčat imunisovaných je způsobena tím, že se neuplatní patologický účinek δ lysinu.

Diskuse

Stafylokokový δ lysin se vyskytuje jak u kmenů patogenních, tak u kmenů netvořících koagulásu (Marks 1952, Elek a Levy 1950 — jako t. zv. ε lysin). Při tom však existuje vztah mezi původem kmene z patologického procesu a silnou tvorbou δ lysinu (Marks 1950, Johanovský 1957a). Dermonekrotické a letální vlastnosti má δ lysin jen v malém stupni (Marks, Vaugham 1950, Morgan a Graydon 1936 — jako t. zv. α_2 toxin).

Význam δ lysinu pro experimentální infekci nebyl dosud zhodnocen. V práci s jiným zaměřením uvádí Howards (1954) jako dílčí poznatek, že kmeny tvořící α toxin a δ lysin jsou více patogenní než kmeny tvořící pouze α toxin. Tento výsledek však nedokazuje význam δ lysinu, neboť jeho $\alpha + \delta$ kmeny tvořily podstatně více α toxinu než kmeny pouze α toxické, a tím je možno vysvětlit jejich větší choroboplodnost v daném infekčním modelu (Selbie, Simon 1952). Naopak Lack a Wailing (1954) nenalezli rozdíl mezi infekcí kmeny tvořícími jen α toxin a kmeny tvořícími α toxin i δ lysin. Těmto všem pracím je na závadu, že tvorbu těchto látek a její intensitu posuzují pouze podle hemolysy na krevních agarech různého složení, tedy nepřesně a nespolehlivě (Johanovský 1957a).

Ve svých pokusech jsme nalezli při rozboru infekčních schopností většího počtu kmenů a za různých podmínek, že kmeny tvořící vedle α toxinu i δ lysin jsou skutečně více patogenní než kmeny tvořící pouze α toxin. Při tom ostatní choroboplodné znaky se vyskytovaly stejně u obou skupin kmenů.

Bylo zjištěno, že současné vstříknutí antitoxinu, které bezpečně chrání při infekci myšek vyvolané kmeny tvořícími pouze α toxin, je u kmenů s δ lysinem velmi málo účinné. Současné vstříknutí velké dávky cizorodého sera vede vlivem útlumu RES k prudkému snížení odolnosti k infekci (Philipson 1937 a j.); to se projevilo i v našich pokusech při infekci myšek kmeny tvořícími pouze α toxin. Naopak u kmenů tvořících též δ lysin vede jeho nespecifická neutralisace vstříknutým králičím serem přes depresivní účinek sera na antimikrobní obranu ke zvýšené ochraně. Je třeba poznamenat, že neutralisační účinek králičího sera vůči δ lysinu je několikanásobně vyšší než účinek sera myšího. Ukazuje se tak, že za přítomnosti antitoxické imunity se stává δ lysin složkou, která rozhoduje o výsledku stafylokokové infekce u myšek.

V podstatě zcela stejné výsledky jsme získali při intradermální infekci králíků a morčat. Podobné změny u králíků se projevují při vstřikování a specifické i nespecifické neutralisaci stafylokokového toxinu, obsahujícího δ lysin (Morgan a Graydon 1936). Tyto rozdíly jsou nápadnější u morčat než u králíků, analogicky k rozdílům v citlivosti na δ lysin a k rozdílům v nespecifické neutralisaci δ lysinu normálními sery těchto zvířat. Rozdílnou druhovou vnímavostí k δ lysinu lze snad i vysvětlit, proč antitoxická imunita je zpravidla účinná v pokusech na králících (Ramon, Richou a Djourichitch 1936, Smith 1937 a j.) a proč pasivní antitoxická imunisace selhává při experimentální infekci myšek (Steinfeld, Brylawski, Nash 1943, Browning, Calver 1947). Závažnou otázku, jaký je význam δ lysinu pro infekce lidské, nelze dosud zodpovědět.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Souhrn

1. Byl sledován význam δ lysinu pro experimentální stafylokokovou infekci u bílých myšek, králíků a morčat. Průběh a výsledek infekce byl zjišťován u 15 stafylokokových kmenů s různou tvorbou δ lysinu, a to při prosté infekci, při infekci a současném podání stafylokokového antitoxinu a při infekci, podání antitoxinu a nespecifické neutralisaci δ lysinu normálním králičím serem.

2. Stafylokokový antitoxin je plně účinný vůči místní i celkové stafylokokové infekci jen u kmenů, vytvářejících pouze α toxin. Infekce vyvolaná kmeny, které vytvářejí α toxin a δ lysin, je antitoxinem ovlivňována jen málo. Při použití antitoxinu a infekci vyvolané kmeny tvořícími též δ lysin je nespecifická neutralisace δ lysinu meznou podmínkou, rozhodující o výsledku infekce.

Literatura

Browning, P., Calver, K. M.: *Further observations on the chemotherapy of experimental staphylococcal infection in mice with drugs of the sulphamid group, penicillin and antitoxin.* J. Path. Bact. 59 : 417, 1947.

Elek, S. D., Levy, F.: *Distribution of haemolysins in pathogenic and nonpathogenic staphylococci.* J. Path. Bact. 62 : 541, 1950.

Howards, J. G.: *Diffusible antigens in relation to the virulence to mice of Staph. aureus.* J. Path. Bact. 68 : 177, 1954.

Johanovský, J.: *Reaktivita organimu při infekci a intoxikaci.* Rozpravy Čs. akademie věd, Praha 1956.

Johanovský, J.: *Výskyt δ lysinu u stafylokokových kmenů lidského původu.* Čs. epidemiologie, mikrobiologie 6 : 73, 1957a.

Johanovský, J.: *Význam shlukovacího faktoru pro choroboplodnost stafylokoků.* Čs. mikrobiol. 2 : 90, 1957c.

Johanovský, J.: *Stafylokokový δ lysin.* Čs. mikrobiol. 2, 1957b, v tisku.

Lack, C. H., Wailing, D. G.: *A study of 435 strains of Staphylococcus pyogenes with reference to factors which may contribute to pathogenicity.* J. Path. Bact. 68 : 431, 1954.

Marks, J., Vaugham, A. C. T.: *Staphylococcal delta haemolysin.* J. Path. Bact. 62 : 597, 1950.

Marks, J.: *The standardisation of staphylococcal alpha-antitoxin with special reference to anomalous haemolysins including δ lysin.* J. Hyg. 49 : 52, 1951.

Marks, J.: *Recognition of pathogenic staphylococci with notes on nonspecific staphylococcal haemolysin.* J. Path. Bact. 64 : 175, 1952.

Morgan, F. G., Graydon, J. J.: *Toxins of the Staphylococcus, with special reference to the estimation of potency.* J. Path. Bact. 43 : 385, 1936.

Philipson, J.: *Experimental studies on enhanced resistance to infection following some nonspecific measures.* Acta path. micr. Scand., Suppl. 32, 1937.

Ramon, G., Richou, R., Djourichitch, M.: *Sur le méchanisme de l'immunité conférée par l'anatoxine staphylococcique à l'égard de l'infection par le staphylocoque virulent.* Rev. immunol. 1 : 482, 1936.

Selbie, F. R., Simon, R. D.: *Virulence to mice of Staphylococcus pyogenes, its measurement and its relation to certain in vitro properties.* Brit. J. Exp. Path. 33 : 315, 1952.

Steinfield, D., Brylawski, S., Nash, C. B.: *Sulfathiazole and staphylococcal antitoxin in experimental staphylococcal infection.* J. Lab. Clin. Med. 28 : 1544, 1943.

Smith, M. L.: *Circulating antitoxin and resistance to experimental infection with staphylococci.* J. Path. Bact. 45 : 305, 1937.

Williams, R. E., O. Harper, G. J.: *Staphylococcal haemolysins on sheep-blood agar with evidence for a fourth haemolysin.* J. Path. Bact. 59 : 69, 1947.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Значение дельта лизина для патогенности стафилококков

Ю. Йогановский

Резюме

Исследовалось влияние дельта лизина на экспериментальную стафилококковую инфекцию у белых мышей, кроликов и морских свинок. Определялись течение и исход инфекции 15-ью штаммами стафилококка с различной способностью к образованию дельта лизина, — как при простой инфекции, так и при инфекции и одновременном введении стафилококкового антитоксина и, наконец, при инфекции, введении антитоксина и одновременной неспецифической нейтрализации дельта лизина нормальной кроличьей сывороткой. Стафилококковый антитоксин вполне эффективен против местной или общей стафилококковой инфекции только по отношению к штаммам, выделяющим только альфа токсин. На инфекцию, вызываемую штаммами, которые образуют и альфа токсин и дельта лизин, антитоксин действует лишь незначительно. При использовании антитоксина при инфекции, вызываемой штаммами, которые образуют и дельта лизин, неспецифическая нейтрализация дельта лизина является решающим условием, определяющим исход инфецкии.

The Significance of Delta Lysin for Pathogenicity of Staphylococci

J. Johanovský

Summary

A study was made of the significance of delta lysin for experimental staphylococcal infection in white mice, rabbits and guinea pigs. The course and result of infection were determined in simple infection, infection with simultaneous administration of staphylococcal antitoxin and infection with the administration of antitoxin and non-specific neutralisation of delta lysin by normal rabbit serum in 18 strains of staphylococci, which differ in the formation of delta lysin. Staphylococcal antitoxin is completely effective against local and general staphylococcal infection only in the case of strains producing alpha toxin alone. Infection due to strains forming alpha toxin and delta lysin is only slightly influenced by antitoxin. When using antitoxin in infection produced by strains which also form delta lysin, non-specific neutralisation of the delta lysin determines the outcome of the infection.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Československá
MIKROBIOLOGIE
ročník 2. (1957) — č. 3

Indukce fága u bakterií *Shigella flexneri* II kyanidem

LUDMILA SOŠKOVÁ

Ústav pro obecnou biologii, lékařská fakulta university v Brně

Došlo 28. 7. 1956

V jiné své práci (Sošková 1957) jsme rozbíjeli kyanidem během latentní periody bakterie *Shigella flexneri* II infikované fágem. Při rozbíjení neinfikovaných bakterií kyanidem jsme zjistili, že dochází k uvolňování neznámého lytického agens, které lysuje rodičovský kmen bakterií. Vyvstala otázka, zda v normálních neinfikovaných bakteriích *Shigella flexneri* II se objevuje fág, který lysuje rodičovský kmen. Obvykle se uvádí, že lysogenní bakterie jsou resistentní k fágovi, kterého uvolňují (Bordet 1925, Lwoff 1953, Bertani 1953 a j.).

Materiál a metody

Použili jsme bakterií *Shigella flexneri* II, kmen č. 12 jako v minulé práci (Sošková 1957). Kulturu jsme získali opakovanou isolací z jedné kolonie, abychom si zajistili, že pracujeme s monokulturou. Pro srovnání jsme opět použili jako v minulé práci shigellového fága D, který lysuje běžně daný kmen *Shigella*. Fágové preparáty jsme získávali o průměrném titru 1×10^9 v ml.

Lysogenii u bakterií *Shigella flexneri* II jsme zjišťovali Fiskovou metodou (1942) na deseti různých kmenech *Shigella*. Zjistili jsme lytickou aktivitu proti kmenu *Shigella flexneri* I a isolovali jsme fága, který vytvářel plaky o velikosti asi 1—1,5 mm v průměru, poměrně ostrých okrajů, s téměř úplnou lysou v oblasti plaků (obr. 1). Kmen *Shigella flexneri* I je tedy citlivým kmenem pro fága uvolňovaného lysogenními buňkami kmene *Shigella flexneri* II, č. 12.

Přípravu antifágových ser i neutralisaci příslušných fágů těmito sery jsme prováděli podle Adamse (1950). Získali jsme antifágová sera proti shigellovému fágovi D a proti fágovi indukovanému kyanidem (dále kyanidový fág), u nichž K-hodnota se pohybovala kolem 46. Zkříženou neutralisací jsme dále zjistili, že serum získané proti „kyanidovému fágovi" neneutralisuje shigellového fága D a naopak.

Vyloučení tak zvaného nosičství (pseudolysogenie) u použitého kmene *Shigella flexneri* II. Podle Lwoffa (1953) existují vedle lysogenních kmenů pravých, ve kterých každá bakterie je lysogenní a má nepřetržitou dědičnou schopnost produkovat fága, ještě t. zv. nosičské kmeny (pseudolysogenní), což jsou prosté směsi bakterií a bakteriofágů (fágem kontaminované kultury), které jsou ve více méně stabilní rovnováze. Standardní technikou pro rozlišení mezi nosičským a lysogenním kmenem je pěstování bakterií v přítomnosti příslušného specifického antifágového sera, které neutralisuje fága, aniž by rušilo schopnost jeho produkce. U nosičského kmene lze tedy fága odstranit příslušným specifickým antifágovým serem, kdežto pravý lysogenní kmen zůstává lysogenním i po působení specifického antifágového sera. Poněvadž v našich pokusech bylo nutno vyloučit možnost, že použitý kmen *Shigella flexneri* II je nosičem „kyanidového fága", pěstovali jsme bakterie v přítomnosti tohoto specifického antifágového sera: kulturu bakterií starou 24 hod. jsme proprali fysiologickým roztokem a naočkovali do koncentrace $1 \cdot 10^9$ v ml do bujonu a přidali k ní 2 ml specifického sera, získaného proti „kyanidovému fágovi", zředěného 1 : 100 (K-hodnota 46). Po tříhodinové inkubaci při 37 °C jsme bakterie zbavili sera propráním ve fysiologickém roztoku a naočkovali na agarové půdy. Tento postup jsme opakovali celkem 10krát.

Na takto zpracované bakterie jsme působili kyanidem: kulturu bakterií *Shigella flexneri* II starou 48 hod. jsme promyli ve fysiologickém roztoku a naočkovali do koncentrace 10^9 v ml do 5 ml bujonu obsahujícího 0,02 M-KCN. Stejné části téže kultury jsme použili jako kontroly bez kyanidu. Oba vzorky jsme inkubovali 1 hod. při 37 °C, potom uchovávali 18 hod. v chladnici při + 4 °C. Druhý

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

den jsme vzorky centrifugovali a tekutinu nad sedimentem jsme přidávali v množství 1 ml k 5 ml kultury bakterií téhož kmene staré 1 hod. Po pětihodinové inkubaci při 37 °C jsme vzorek i kontrolu přefiltrovali přes kolodiové blány a průměrné velikosti pórů 750 mμ a 1 ml filtrátu jsme znovu přidávali ke kultuře téhož kmene staré 1 hod. Celkem byl v každém pokusu filtrát kyanidový i kontrolní pasážován 10krát přes mladé bakterie téhož kmene. Před každou další pasáží jsme stanovili ve všech vzorcích titr případného fága (počítáním plaků na agarových půdách). Bakterie, na které jsme jednou působili kyanidem, kyanidovým lysátem nebo filtráty, jsme vždy z pokusů vyřazovali.

Výsledky

Ve 12 opakovaných pokusech se objevily po nakapání filtrátů, získaných působením kyanidu draselného na bakterie *Shigella flexneri* II, na agarových půdách přelitých mladou kulturou téhož kmene isolované malé plaky. V sedmi pokusech se objevily plaky v první pasáži, v pěti pokusech v druhé. V kontrolách bez kyanidu se nikdy plaky neobjevily (tab. 1). Ve všech případech titr námi zjištěného lytického

Tab. 1. Indukce fága u bakterií *Shigella flexneri* II kyanidem

Působení	Počet positivních výsledků			
	1. pasáž	2. pasáž	3.—10. pasáž	celkem
KCN	7	5	—	12
Kontrola	0	0	0	0

činitele v kyanidových lysátech (dále označován „kyanidový fág") dalším pasážováním vždy stoupal. V první positivní pasáži byl průměrný titr $2 \cdot 10^3$ v ml, v druhé $3 \cdot 10^6$ v ml, ve třetí $5 \cdot 10^9$ v ml a na této hladině se udržoval během dalšího pasážování beze změny. V několika případech, kdy jsme při pasážování přenášeli pouze 0,02 ml místo obvyklého 1 ml filtrátu, byly výsledky negativní. Z toho vyplývá, že podmínkou k zachycení „kyanidového fága" je odebírání většího množství filtrátu k pasáži.

„Kyanidový fág" se liší tvarem a velikostí plaků od shigellového fága D, se kterým se běžně v laboratoři pracovalo a na kterého je kmen *Shigella flexneri* II č. 12 citlivý. „Kyanidový fág" tvoří drobné plaky o velikosti průměrně menší než 0,5 mm (obr. 2) s mohutným nárůstem sekundárních kolonií v oblasti plaků. V tekutém prostředí působí jen velmi nezřetelné projasnění kultury. Shigellový fág D způsobuje dokonalé projasnění kultury v tekutém prostředí a na agarových půdách vytváří velké plaky 2 až 2,5 mm v průměru, se zřetelným asi ½ mm „haló" na okraji plaků (obr. 3), s téměř úplnou lysou v oblasti plaků a s nepatrným množstvím sekundárních kolonií. „Kyanidový fág" nelysoval mimo svůj vlastní rodičovský kmen žádný z dalších zkoušených kmenů shigell, zatím co shigellový fág D lysuje ještě další kmeny, jako kmen *Shigella flexneri* I, III, IV. Také serologicky bylo zjištěno zkříženou neutralisací, že „kyanidový fág" je antigenně odlišný od shigellového fága D.

Diskuse

Uvedené výsledky ukazují, že působením kyanidu dochází u bakterií *Shigella flexneri* II k uvolňování lytického agens, jež lysuje během dalšího pasážování kmen, ze kterého vzniklo. V našich pokusech jde o fága uvolňovaného bakteriemi vlivem kyanidu a ne o lytické agens jiné povahy, což vyplývá z toho, že „kyanidový fág" prochází bakteriologickými filtry, pomnožuje se na mladých bakteriích a způsobuje

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

jejich lysu ve formě plaků, je přenosný v seriích a pasážováním na mladých bakteriích jeho titr stoupá. Také na elektronových snímcích „kyanidového fága" je vidět typická fágová tělíska s bičíkem (obr. 4). Tyto údaje nás tedy vedou k závěru, že v našich pokusech dochází vlivem kyanidu k uvolňování fága.

Proti námitce, že by mohlo jít v našem případě o smíšenou kulturu dvou velmi blízkých kmenů, ve které jeden kmen uvolňuje fága proti fágu druhému, možno uvést, že pokusná kultura byla získána opakovanou isolací z jedné kolonie. Také t. zv. nosičství „kyanidového fága" kmenem *Shigella flexneri* II bylo vyloučeno použitím bakterií, pěstovaných předem s příslušným antifágovým serem. Obě námitky jsou konečně vyloučeny kontrolními pokusy, v nichž se fág nikdy neobjevil a které jsme zpracovali tímtéž způsobem jako pokusné vzorky.

Prokázali jsme, že náš kmen *Shigella flexneri* II č. 12 je lysogenní. Lysogenní kmeny buďto spontánně nebo pod vlivem různých indukujících agens uvolňují bakteriofágy, jejichž přítomnost můžeme zjistit příslušným citlivým kmenem. Lysogenní bakterie jsou však normálně resistentní k fágovi, kterého uvolňují (Bordet 1925, Lwoff 1953, Bertani 1953). Je proto nutno vysvětlit, proč v našich pokusech fág uvolňovaný z lysogenních bakterií napadá a lysuje rodičovský kmen. Muselo zde tedy dojít vlivem kyanidu k určité změně charakteru bakteriemi uvolňovaného fága.

O kyanidu je známo (Kleinzeller 1955), že blokuje cytochromoxydásu a katalásu. Buněčné dýchání pak probíhá přes flavoproteinový systém a vzniká peroxyd vodíku. Peroxyd vodíku je také jedním z produktů při ozařování látek obsahujících vodu ionisujícím a ultrafialovým zářením (Alper 1954, Latarjet a Caldas 1951) a může vyvolat stejně jako některé jiné látky (formaldehyd, phenol, acriflavin, pyronin atd.), u bakterií mutace (Demerc, Wallace a Witkin 1947, Latarjet 1949). Peroxydy mohou dále podle Lwoffa a Jacobse (1952) indukovat u určitých lysogenních kmenů bakterií lytický cyklus s uvolňováním fágů. Obecně jsou tyto indukující agens zároveň mutagenní (Hall-Asheshov E. a Ashesov I. N. 1956).

Domníváme se proto, že v našem případě došlo vlivem kyanidu k indukci fágů u lysogenních bakterií a ke vzniku fágových mutant, z nichž některé napadají rodičovský kmen. Správnosti naší domněnky nasvědčuje, že i jiným způsobem se podařilo získat mutované fágy, schopné napadat rodičovský kmen. Tak na př. Hewittovi (1954) se to podařilo pěstováním lysogenních bakterií v tekutém prostředí prostém vápníku a na různých tuhých půdách. Také Hradečná (1956) získala ozvučením kmene *Escherichia coli B* filtrát, který působil lysu rodičovského kmene. S analogickým zjevem se setkal Herčík (1957) při ozařování téhož kmene Roentgenovými paprsky.

V našich pokusech se „kyanidový fág" objevil někdy v prvé pasáži, jindy až v druhé. Dalším pasážováním jeho titr stoupal. To si vysvětlujeme několikerým způsobem. Buďto jsou fágové částice přítomny již v kyanidových lysátech v dostatečném množství, ale jsou nějakým způsobem inaktivovány, nebo mutovaný fág je přítomen již v kyanidových lysátech, ale v nepatrném množství a teprve po pomnožení na mladých rodičovských buňkách se jeho koncentrace zvýší. Konečně se můžeme domnívat, že v kyanidových lysátech není fág obsažen v definitivní formě. Teprve stykem s bakteriemi v prvé pasáži dochází k dotvoření lyticky aktivního fága. Proti první domněnce svědčí, že kyanid podle Doermanna (1947) v koncentraci 0,02 M neovlivňuje titr volných fágových částic, což potvrzují i výsledky našich vlastních nepublikovaných pokusů. Přikláníme se proto k druhému a třetímu vysvětlení, pro které svědčí, že bylo-li přenášeno při pasážování 0,02 ml původního filtrátu, fág se ani při dalším pasážování neobjevil. Pro druhou domněnku svědčí dále ta skutečnost, že titr „kyanidového fága" byl vždy v první positivní pasáži nízký a teprve dalším pasážováním stoupal. Pro třetí domněnku by nasvědčovalo

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

objevení se fága v pěti případech až v druhé pasáži. Na základě toho se tedy domníváme, že vlivem kyanidu dochází u lysogenních bakterií *Shigella flexneri* II, kmen č. 12, k uvolňování mutant-fágů, ať již hotových nebo nehotových, které napadají rodičovský kmen. Mutant je v kyanidových lysátech z počátku nepatrné množství a teprve po pomnožení těchto fágů na mladých rodičovských bakteriích se projeví v titrovatelném množství.

Souhrn

Působením kyanidu draselného v 0,02 M koncentraci na lysogenní bakterie *Shigella flexneri* II, kmen č. 12, dochází k uvolňování fága, který lysuje při dalším pasážování kmen rodičovský. Tento kyanidem indukovaný fág se liší od shigellového fága D, který běžně lysuje daný kmen shigell, morfologií plaků, serologicky i okruhem citlivých kmenů. Kyanidem indukovaný fág se objevuje v prvé nebo druhé pasáži v poměrně nízkém titru a teprve dalším pasážováním na mladých bakteriích (rodičovských) jeho titr stoupá. Domníváme se, že vlivem kyanidu se vytváří pravděpodobně v lysogenní kultuře peroxyd vodíku, který pak působí mutagenně na fágy bakteriemi uvolňované v tom smyslu, že vznikají fágové mutanty, napadající rodičovský kmen.

Literatura

Adams, M. H.: *Methods of studies of bacterial viruses.* Meth. Med. Res.: 2 : 1, 1950.

Alper, T.: *The inactivation of free bacteriophage by irradiation and by chemical agents.* J. Gen. Microbiol. 11 : 313, 1954.

Bertani, G.: *Lysogenic versus lytic cycle of phage multiplication.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 18 : 65, 1953.

Bordet, J.: *Le problem de l'autolyse microbienne transmissible ou du bacteriophage.* Ann. Inst. Pasteur 39 : 711, 1925.

Demerc, M., Wallace, B., Witkin, E. M.: *The gene.* Carnegie Inst. of Wash. Year Book. 47 : 169, 1947.

Doermann, A. H.: *Intracellular growth of bacteriophage.* Carnegie Inst. of Wash. Year Book 47 : 176, 1947.

Fisk, R. T.: *Studies on Staphylococci. I. Occurence of bacteriophage carriers among strains of Staphylococcus aureus.* J. Inf. Dis. 71 : 153, 1942.

Hall-Asheshov, E., Asheshov, I. N.: *The induction of the lytic cycle in lysogenic bacteria by phagolessin A 58.* J. Gen. Microbiol. 14 : 174, 1956.

Herčík, F.: *Přenosná lysa buněk E. coli indukovaná Roentgenovým zářením.* Čs. biologie 6 : 74, 1957.

Hewitt, L. F.: *Autoadaptation of bacterial viruses and its effect on bacterial variation and evolution.* J. Gen. Microbiol. 11 : 261, 1954.

Hradečná, Z.: *Lysa bakterií E. coli vyvolaná filtrátem ozvučených bakterií.* Čs. biologie 5 : 241, 1956.

Kleinzeller, A.: *Mechanismus biologických oxydací.* Praha 1955.

Latarjet, R.: *Mutation induction chez une virus par irradiation ultraviolette de cellules infecteés.* C. R. Acad. Sci. Paris 288 : 1354, 1949.

Latarjet, R., Caldas, R. L.: *Restoration induced by catalase in irradiated microorganisms.* J. Gen. Physiol. 35 : 455, 1951.

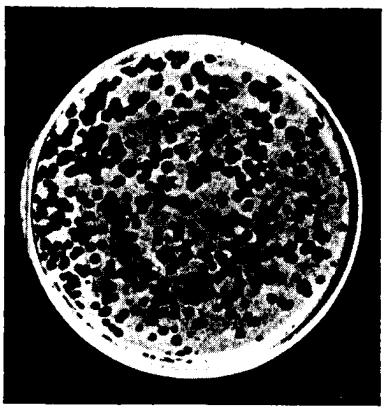
Lwoff, A.: *Lysogeny.* Bact. Rev. 17, 4 : 269—337, 1953.

Lwoff, A., Jacobs, F.: *Induction de la production de bactériophage et d'une colicine par les peroxydes, les ethyléneimines et les halogénoalcoylamines.* C. R. Acad. Sci. Paris. 234 : 2308, 1952.

Sošková, L.: *Sledování fágového antigenu během rozmnožování fága v infikované bakterii.* Čs. mikrobiol. 2 : 188, 1957.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6



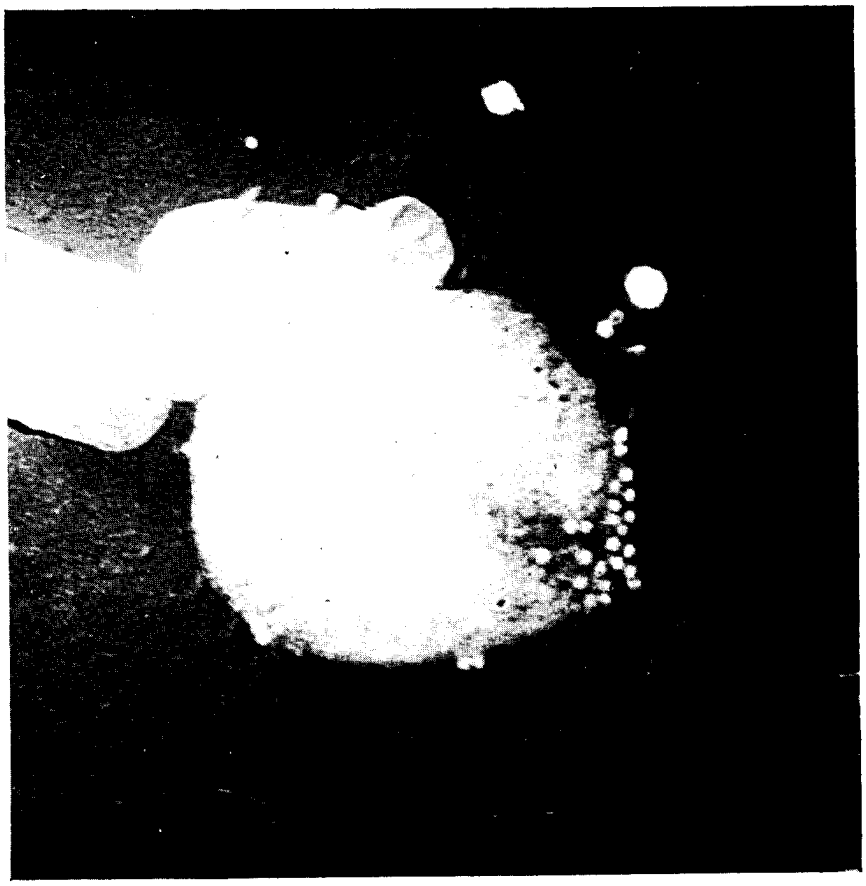
Obr. 1. Tvar a velikost plaků bakteriofága uvolňovaného spontánně lysogenním kmenem *Shigella flexneri* II, kmen č. 12.

Obr. 2. Tvar a velikost plaků kyanidem indukovaného fága.

Obr. 3. Plaky shigellového fága D.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6



Obr. 4. Bakteriofág indukovaný kyanidem. Zvětšení 26 000krát. Foto Hradečná, Biofysikální ústav ČSAV v Brně.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Индукция фага у бактерий Shigella flexneri II цианистым калием

Л. Сошкова

Резюме

В результате воздействия цианистого калия в концентрации 0,02 М на лизогенные бактерии Shigella flexneri II наблюдается образование фага, в течение дальнейших пассажей вызывающего лизис штамма, из которого он возник. Этот возникающий под влиянием цианистого калия фаг отличается от фага D, обычно вызывающего лизис данного штамма Shigella, как по морфологии стерильных пятен («plaque»), так и с точки зрения серологии и круга своих хозяев. Он представляется фагом умеренного типа, тогда как фаг D у Shigella отличается значительной вирулентностью. Было произведено в общем 12 опытов, всегда с 10 пассажами (при таком же количестве контрольных). Получаемый под действием цианистого калия фаг в 7 случаях появился уже в первом пассаже, а в 5 случаях — только во втором пассаже. Вначале фаг встречается всегда в низком титре, и только в результате пассажей на молодых культурах родительских бактерий его титр возрастает до известного уровня, на котором он держится потом без изменений в течение дальнейших пассажей. По предположениям автора, в лизогенной культуре под влиянием цианистого калия образуется перекись водорода, оказывающая мутагенное действие на освобождающийся из бактерий фаг, и так возникают мутанты фага, нападающие на собственный родительский штамм.

Induction of Phage in Bacteria of *Shigella flexneri* II by Cyanide

L. Sošková

Summary

The action of potassium cyanide in a concentration of 0,2 M on lysogenic bacteria of *Shigella flexneri II*, results in the release of phage, which, in the course of further passaging, atttacks and produces lysis in the parent strain from which it is released. This cyanide-induced phage differs from the Shigella D phage, which normally produces lysis in this strain of Shigella, by the morphology of the plaques, serologically, and also in its host range. It appears to be a temperate phage, whereas the Shigella D phage is virulent. Altogether 12 experiments were carried out, each with 10 passages (same number of controls). In seven experiments the cyanide-induced phage appeared in the first passage, in five in the second passage. At the outset it was always found in a low titre and only after a passaging on young bacteria (parent bacteria) did the titre rise to a certain given level, at which it was then maintained during further passaging without changing. In the author's opinion, hydrogen peroxide is probably formed in the lysogenic culture as a result of the influence of the cyanide and this then has a mutagenic effect on the phages released by the bacteria, resulting in the development of phage mutants which attack the parent strain.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 2. (1957) — č. 3

Charakter fenoloxydásy aktinomycety *Streptomyces antibioticus* a vliv povrchově aktivních látek na stanovení její aktivity

VLADIMÍR ŠEVČÍK

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 7. 12. 1956

Fenoloxydásy se podle svého účinku na pyrokatechin, hydrochinon, p-fenylendiamin, p-kresol a tyrosin dělí na dva základní typy enzymů: tyrosinásu a lakkásu (Lindeberg a Holm 1952). Jednotlivé typy těchto enzymů byly zatím nejlépe prostudovány u hub. Různé houby rozkládající lignin produkovaly fenoloxydásu typu lakkásy (Fåhraeus 1949). Později zjistili Lindeberg a Holm (1952), že různé druhy hymenomycet obsahovaly lakkásu i tyrosinásu. Fysiologická funkce těchto enzymů však dosud zůstává neobjasněna. Lakkása byla u těchto hub buď intracelulárním nebo extracelulárním enzymem, kdežto tyrosinása byla nalezena jen jako intracelulární enzym.

Výzkum fenoloxydás u aktinomycet dosud narážel na obtíže metodické. Metoda použitá pro isolaci fenoloxydás u hub (Lindeberg a Holm 1952) se u aktinomycet neosvědčila (Küster 1953). Küster (1955) sice nedávno použil pro manometrické stanovení aktivity fenoloxydás preparátů, připravených roztíráním mycelia aktinomycet ve fosfátovém pufru o pH 6,8, avšak preparáty získané touto metodou nedávají uspokojivé výsledky.

Bližší charakter fenoloxydás u aktinomycet sledoval Küster (1955). Došel při tom k závěru, že tvorba huminových kyselin byla největší u kmenů aktinomycet, u nichž byla největší aktivita fenoloxydás typu lakkásy.

Vzhledem k tomu, že fenoloxydása u aktinomycety *Streptomyces antibioticus* je endogenní enzym, byli jsme postaveni před úkol buď připravit účinné preparáty isolací tohoto enzymu, nebo upravit podmínky při měření tak, aby se specifický substrát dostal dovnitř buněk a dále aby byla potlačena poměrně vysoká endogenní respirace. Při řešení druhé možnosti se ukázalo vhodným použít povrchově aktivních látek.

Materiál a metody

V práci bylo použito aktinomycety *Streptomyces antibioticus*, která je v naší sbírce označena číslem BU 105/5. Aktinomyceta byla kultivována v půdě typu laktosa — kukuřičný extrakt [1 % glukosy, 1,5 % laktosy, 0,4 % $(NH_4)_2HPO_4$, 0,35 % kukuřičného extraktu, 0,5 % NaCl, 0,2 % $CaCO_3$] na rotačním třepacím stroji při 28 °C. Při sledování vlivu povrchově aktivních látek bylo použito mycelia po 7denní kultivaci. Téhož mycelia jsme použili při stanovení aktivity fenoloxydás na různých substrátech. Vliv cholátu sodného na endogenní respiraci a oxydaci pyrokatechinu jsme sledovali u různě starého mycelia aktinomycety vyrostlé na výše uvedené půdě se sníženým obsahem kukuřičného extraktu (0,05 %). Z kultivační tekutiny jsme oddělili mycelium centrifugací, dvakrát proprali destilovanou vodou a suspendovali ve ftalátových pufrech na původní objem.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Aktivitu fenoloxydás jsme stanovili manometricky za přítomnosti cholátu sodného. Do Warburgových nádobek byly odměřeny 2 ml výše uvedené suspense mycelia, 0,1 ml roztoku povrchově aktivních látek a 0,9 ml roztoku substrátů v destilované vodě. Jako substrátů jsme použili pyrokatechinu, hydrochinonu, p-fenylendiaminu, p-kresolu a tyrosinu, a to v konečných koncentracích 5 mg/ml. Protože roztok p-fenylendiaminu je poněkud alkalický, bylo pH roztoku tohoto substrátu upraveno chlorovodíkovou kyselinou na 5,5 (Lindeberg a Holm 1952).

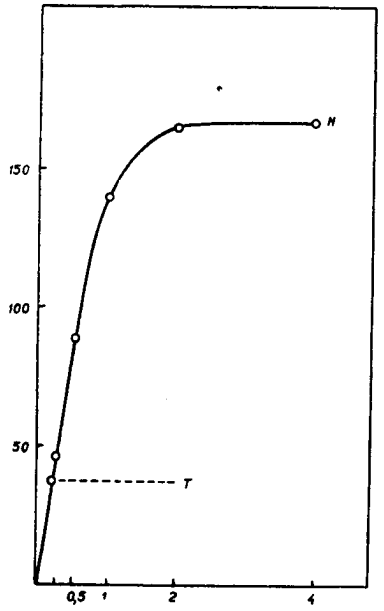
Jako povrchově aktivní látky jsme vyzkoušeli cholát sodný, syntergit a likorol VEL v množství 4, 2, 1, 0,5 a 0,25 mg na Warburgovu nádobku (celkový objem tekutiny 3 ml) a tween 80 v konečné koncentraci 0,5 % (15 mg ve Warburgově nádobce), ve které je tween přidáván do živných půd pro mykobakterie.

Při sledování vlivu pH na oxydaci hydrochinonu, pyrokatechinu a p-fenylendiaminu bylo mycelium suspendováno ve ftalátových pufrech o pH 3,25, 3,90, 4,50, 5,20, 5,55 a 5,75.

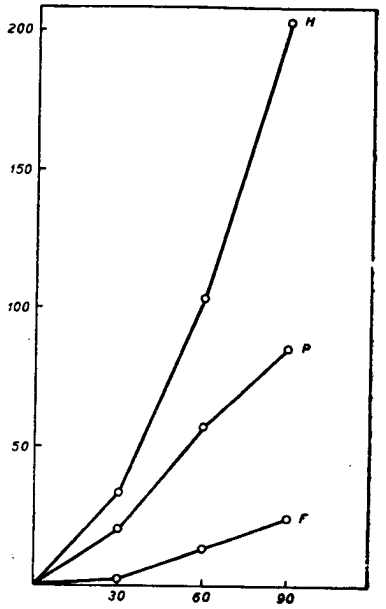
Aktivita fenoloxydás byla též sledována v kultivační tekutině po oddělení mycelia za použití pyrokatechinu jako substrátu, a to po 5denní kultivaci (octanový pufr pH 5,0), 7denní kultivaci (ftalátový pufr pH 4,5) a 9denní kultivaci (ftalátový pufr pH 3,9).

Výsledky

Vliv povrchově aktivních látek na stanovení aktivity fenoloxydásy aktinomycety



Obr. 1. Vliv různých koncentrací cholátu sodného na oxydaci hydrochinonu (H). Warburgova nádobka: 2 ml suspense mycelia (22 mg sušiny) ve ftalátovém pufru pH 4,5, 0,1 ml roztoku cholátu sodného; ramínko 0,9 ml roztoku hydrochinonu (5 mg); absorpční kalíšek 0,2 ml 10% KOH. Spotřeba kyslíku měřena při 30 °C a 100 kmitech za minutu. Osa x: koncentrace cholátu sodného v mg na Warburgovu nádobku, osa y: spotřeba μl kyslíku za 60 minut. T — oxydace hydrochinonu v přítomnosti 0,5 % (konečné koncentrace) tweenu 80.



Obr. 2. Průběh oxydace substrátů u aktinomycety *Streptomyces antibioticus*. Warburgova nádobka: 2 ml suspense mycelia ve ftalátovém pufru pH 4,5, 0,1 ml 4% roztoku cholátu sodného; ramínko 0,9 ml roztoku substrátů (5 mg); absorpční kalíšek: 0,2 ml 10% KOH. Spotřeba kyslíku měřena při 30 °C a 100 kmitech za minutu. Osa x: minuty, osa y: spotřeba μl kyslíku po odečtení endogenní respirace. H — hydrochinon; P — pyrokatechin; F — p-fenylendiamin.

Vliv různých koncentrací cholátu sodného na oxydaci hydrochinonu je uveden na obr. 1. Jak patrno, rychlost oxydace hydrochinonu závisí na přítomnosti cholátu

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

až do jeho množství 2 mg na nádobku. Zvláště u nižších koncentrací cholátu je rychlost oxydace přímo úměrná jeho koncentraci. Při dalším zvyšování koncentrace cholátu se již rychlost oxydace hydrochinonu nemění.

Podobné výsledky byly získány u dalších povrchově aktivních látek, syntergitu a likorolu VEL. Zvýšená oxydace hydrochinonu byla pozorována též v přítomnosti tweenu 80. Získaná hodnota (37,5 μl O_2 za hod.) však byla mnohem menší než v přítomnosti 0,25 mg cholátu sodného ve Warburgově nádobce (45 μl O_2 za hod.).

Endogenní respirace byla v přítomnosti všech použitých povrchově aktivních látek úplně potlačena, zatím co bez těchto látek činila 5,5 μl O_2 za hodinu.

Tab. 1. Vliv cholátu sodného na průběh oxydace hydrochinonu, pyrokatechinu a p-fenylendiaminu
Spotřeba μl kyslíku

Substrát	Bez cholátu			S cholátem		
	30 min.	60 min.	90 min.	30 min.	60 min.	90 min.
Hydrochinon	8,5	21	42	39	119,5	218
Pyrokatechin	7,5	14	21	27	62,5	91
p-fenylendiamin	1	4,5	9	3,5	13,5	24,5

Tab. 2. Vliv cholátu sodného na endogenní respiraci a na oxydaci pyrokatechinu
Spotřeba μl kyslíku

Stáří kultury (dny)	Sušina (mg/2 ml)	Bez cholátu			S cholátem		
		endogenní respirace	pyrokatechin	pyrokatechin bez end. r.	endogenní respirace	pyrokatechin	pyrokatechin bez end. r.
2	6,9	142	128	−14	26,5	31	4,5
3	8,7	177,5	147	−30,5	16,5	38	21,5
4	9,8	76,5	61	−15,5	14,5	98,5	84
5	12,2	66	68	2	13	149	136
6	7,5	47	77	30	17	149	132
7	6,0	18	98	80	0	221,5	221,5

Vliv cholátu sodného na průběh oxydace hydrochinonu, pyrokatechinu a p-fenylendiaminu je uveden v tabulce 1. Hydrochinon je poměrně rychle oxydován, při čemž roztok silně žloutne. Velikost oxydace hydrochinonu bez cholátu činí asi jednu desetinu spotřeby kyslíku v přítomnosti cholátu. Podobně u pyrokatechinu můžeme pozorovat velké rozdíly mezi rychlostí oxydace v přítomnosti cholátu a bez cholátu, při čemž roztok rychle hnědne. Při oxydaci bez cholátu můžeme pozorovat jen mírné zhnědnutí. Intensita hnědého zbarvení odpovídá též spotřebě kyslíku. Z použitých substrátů byl nejméně oxydován p-fenylendiamin. I u tohoto substrátu však můžeme pozorovat zřetelné rozdíly u rychlosti oxydace v přítomnosti cholátu a bez cholátu (tab. 1). Původně slabě nafialovělý roztok p-fenylendiaminu se stává s postupující oxydací tmavofialovým. Intensita zbarvení odpovídá opět spotřebě kyslíku.

Vliv cholátu na endogenní respiraci a oxydaci pyrokatechinu u různě starého mycelia aktinomycetu je uveden v tabulce 2. U mladých kultur (2—4denních) jsou při měření rychlosti oxydace pyrokatechinu bez cholátu hodnoty pro pyrokatechin nižší než hodnoty pro endogenní respiraci.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

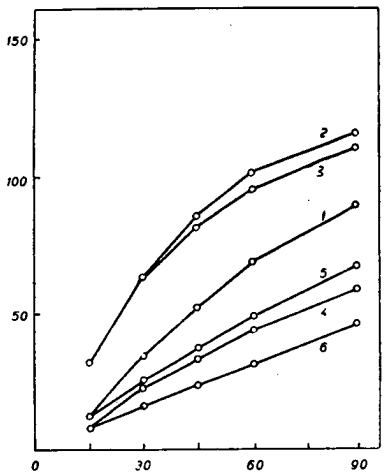
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

U starších kultur jsou již hodnoty pro oxydaci pyrokatechinu při měření bez cholátu poněkud vyšší než hodnoty pro endogenní respiraci. Po odečtení endogenní respirace však dostáváme poměrně malé hodnoty.

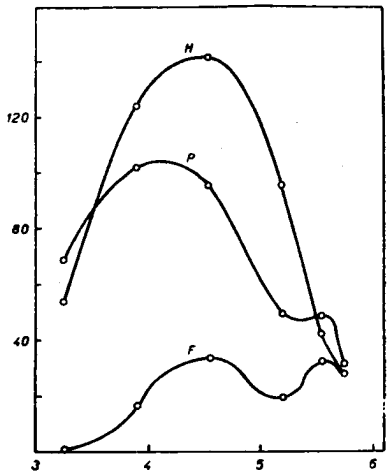
Při měření rychlosti oxydace s cholátem je ve všech případech velmi silně potlačena endogenní respirace. Hodnoty pro oxydaci pyrokatechinu jsou již mnohem příznivější. Tímto způsobem můžeme měřit oxydaci pyrokatechinu již i u velmi mladých kultur.

Charakter fenoloxydásy aktinomycety *Streptomyces antibioticus*

Z použitých substrátů oxydovalo mycelium aktinomycety hydrochinon, pyrokatechin a p-fenylendiamin, kdežto p-kresol a tyrosin oxydovány nebyly. Nejrychleji byl oxydován hydrochinon, kdežto p-fenylendiamin byl oxydován velmi pomalu (obr. 2). U žádného substrátu nebyla pozorována při měření během 90 min. inhibice enzymu. U hydrochinonu byla pozorována rovnoměrná oxydace při všech použitých pH, zatím co u pyrokatechinu (obr. 3) nastávala u nižších pH (3,25—4,50) po 60 min. částečná inaktivace enzymu.



Obr. 3. Vliv pH na průběh oxydace pyrokatechinu. Warburgova nádobka: 2 ml suspense mycelia ve ftalátovém pufru, 0,1 ml 4% roztoku cholátu sodného; ramínko: 0,9 ml roztoku pyrokatechinu (5 mg); absorpční kalíšek: 0,2 ml 10% KOH. Spotřeba kyslíku měřena při 30 °C a 100 kmitech za minutu. Osa x: minuty, osa y: spotřeba μl kyslíku po odečtení endogenní respirace. Ftalátové pufry: 1 — pH 3,25; 2 — pH 3,90; 3 — pH 4,50; 4 — pH 5,20; 5 — pH 5,55; 6 — pH 5,75.



Obr. 4. Vliv pH na oxydaci hydrochinonu (H), pyrokatechinu (P) a p-fenylendiaminu (F). Warburgova nádobka: 2 ml suspense mycelia ve ftalátovém pufru, 0,1 ml 4% roztoku cholátu sodného; ramínko: 0,9 ml roztoku substrátů (5 mg); absorpční kalíšek: 0,2 ml 10% KOH. Spotřeba kyslíku měřena při 30 °C a 100 kmitech za minutu. Osa x: pH ftalátových pufrů, osa y: spotřeba μl kyslíku po odečtení endogenní respirace.

Vliv pH na oxydaci výše uvedených tří substrátů je patrný na obr. 4. Hydrochinon tvoří jednoduchou křivku s maximální oxydací kolem pH 4,5. Pyrokatechin tvoří křivku s jedním maximem kolem pH 4,0 a s druhým mnohem menším maximem kolem pH 5,5. p-fenylendiamin má dvě přibližně stejná maxima; jedno maximum při pH 4,5 a druhé při pH 5,5.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Nikdy jsme nepozorovali oxydaci hydrochinonu, pyrokatechinu ani p-fenylendiaminu u filtrátu kultury aktinomycety, zatím co spotřeba kyslíku během 60 min. u odděleného mycelia činila 71 μl (po 5denní kultivaci), 142 μl (po 7denní kultivaci) a 37,5 μl (po 9denní kultivaci).

Diskuse

U aktinomycet sledoval bližší charakter fenoloxydás Küster (1955), který zjistil pomocí plotnových testů (Küster 1953), že aktinomycety obsahují tyrosinásu i lakkásu. Podle našich zkušeností je však stanovení aktivity fenoloxydás plotnovými testy velmi nepřesné.

Při měření rychlosti oxydace pyrokatechinu bez přítomnosti cholátu u mladých kultur aktinomycety dostáváme pro pyrokatechin hodnoty nižší než pro endogenní respiraci. Podobné výsledky získal u aktinomycet též Küster (1955). Při tom však můžeme pozorovat mírné hnědnutí pyrokatechinu, což svědčí o jeho oxydaci. Pyrokatechin brzdí v těchto případech endogenní respiraci. Tímto způsobem nemůžeme měřit oxydaci pyrokatechinu, protože hodnoty pro endogenní respiraci jsou příliš veliké a nemůžeme také zjistit, do jaké míry ovlivňuje pyrokatechin endogenní respiraci. Küsterovi (1955) se podařilo potlačit vysokou endogenní respiraci u preparátů z aktinomycet malachitovou zelení. Pro aktivitu fenoloxydás u těchto preparátů však dostával poměrně nepatrné hodnoty (účinné preparáty odpovídající 10 mg sušiny spotřebovaly během jedné hodiny pouze 1—4 μl O_2); rovněž příprava těchto preparátů je těžko reprodukovatelná.

V přítomnosti cholátu sodného, případně i jiných povrchově aktivních látek, můžeme stanovit aktivitu fenoloxydásy i u velmi mladého mycelia aktinomycety. Cholát sodný potlačuje totiž velmi silně endogenní respiraci a jakožto látka velmi silně povrchově aktivní umožňuje pravděpodobně vnikání substrátu do buněk mycelia, kde je substrát oxydován pomocí endoenzymu. Z jiných výsledků, které uvedeme v dalším sdělení, usuzujeme, že zde nejde o aktivaci proenzymu. Oxydovaný produkt se dostává opět z buněk do prostředí. Podobné výsledky byly pozorovány též u dalších povrchově aktivních látek.

Jelikož byl v našich pokusech z použitých substrátů oxydován myceliem aktinomycety *Streptomyces antibioticus* hydrochinon, pyrokatechin a p-fenylendiamin, jde tedy o fenoloxydásu typu lakkásy. Při submersní kultivaci na třepacím stroji je produkována lakkása jako endoenzym s optimální účinností při pH 4,0—4,5. Dosud však není rozhodnuto, zda dvouvrcholové křivky při sledování vlivu pH na oxydaci pyrokatechinu a p-fenylendiaminu jsou způsobeny dvěma různými enzymy, nebo zda jsou způsobeny pouze fysikálně chemickými vlastnostmi celého komplexu podmínek vnějšího prostředí a mikroba.

Pokud byla nalezena lakkása u různých druhů hub, byla většinou tvořena jako exoenzym (Lindeberg a Fåhraeus 1952; Fåhraeus 1952), případně jako exoenzym i endoenzym (Lindeberg a Holm 1952). Uvedená lakkása u aktinomycety *Streptomyces antibioticus* BU 105/5 je endoenzym, který se dále liší od popsaných enzymů u hub (Lindeberg 1950; Lindeberg a Fåhraeus 1952) rychlostí oxydace jednotlivých substrátů. Pouze v jednom případě popsali Lindeberg a Holm (1952) lakkásu z plodnic houby *Clavaria ligula*, která oxydovala nejrychleji hydrochinon. Avšak p-fenylendiamin a pyrokatechin se rychlostí oxydace od hydrochinonu příliš nelišily.

Souhrn

Cholát sodný a jiné povrchově aktivní látky potlačují silně endogenní respiraci a umožňují měření účinnosti fenoloxydásy u neporušeného mycelia aktinomycety *Streptomyces antibioticus*.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Fenoloxydása aktinomycety *Streptomyces antibioticus* je endoenzym, který oxyduje hydrochinon, pyrokatechin a p-fenylendiamin, kdežto p-kresol a tyrosin neoxyduje. Podle tohoto účinku jde o fenoloxydásu typu lakkásy. Její maximální účinnost je při pH 4,0—4,5.

Literatura

Fåhraeus, G.: *On the oxidation of phenolic compounds by wood-rotting fungi.* Ann. Agr. Coll. Sweden, *16* : 618, 1949.

Fåhraeus, G.: *Formation of laccase by Polyporus versicolor in different culture media.* Physiol. Plantarum, *5* : 284, 1952.

Küster, E.: *Mikrobielle Polyphenoloxydasen und Humusbildung.* Zbl. Bakter., I. Orig., *160* : 207, 1953.

Küster, E.: *Humusbildung und Phenoloxydasen bei Streptomyceten.* Zschr. Pflanzenernähr., Düng., Bodenk., *69* : 137, 1955.

Lindeberg, G.: *Phenol oxidases of the cultivated mushroom Psalliota bispora f. albida.* Nature, *166* : 739, 1950.

Lindeberg, G., Fåhraeus, G.: *Nature and formation of phenol oxidases in Polyporus zonatus and P. versicolor.* Physiol. Plantarum, *5* : 277, 1952.

Lindeberg, G., Holm, G.: *Occurrence of tyrosinase and laccase in fruit bodies and mycelia of some hymenomycetes.* Physiol. Plantarum, *5* : 100, 1952.

Характер фенолоксидазы актиномицета Streptomyces antibioticus и влияние поверхностно-активных веществ на определение его активности

В. Шевчик

Резюме

Был разработан манометрический метод определения активности фенолоксидазы у лучистого грибка Streptomyces antibioticus № BU 105/5 при помощи холата натрия в качестве поверхностно-активного вещества. Холат натрия в количестве 4 мг на сосуд Варбурга действовал весьма благоприятно на окисление специфических субстратов (пирокатехина, гидрохинона, n-фенилендиамина) ненарушенным мицеллием актиномицета, причем одновременно в значительной степени подавлял эндогенную респирацию. Благоприятные результаты были получены также с другими поверхностно-активными веществами: синтэргитом, ликоролем VEL и твином (tween) 80. Фенолоксидаза у лучистого грибка Streptomyces antibioticus является эндоэнзимом, который окисляет гидрохинон, пирокатехин и n-фенилендиамин, но не окисляет n-крезол и тирозин. Судя по этому действию, это — фенолоксидаза типа лакказы. Максимальная эффективность лакказы наблюдается при pH 4,0—4,5.

The Character of Phenol Oxidase of the Actinomycete *Streptomyces antibioticus* and the Influence of Surface-active Substances on Determination of Its Activity

V. Ševčík

Summary

A manometric method was elaborated for determining the activity of phenol oxidase in the actinomycete *Streptomyces antibioticus* BU 105/5, using sodium cholate as the surface-active substance. In a Warburg manometer, sodium cholate in amounts of 4 mg. produced very satisfactory oxidation of specific substrates (catechol, hydroquinone, p-phenylendiamine) by the intact mycelium of the actinomycete, at the same time inhibiting endogenous respiration to a considerable extent. Satisfactory results were also obtained with other surface-active substances, e. g. syntergit, likorol VEL and tween 80. In the actinomycete *Streptomyces antibioticus*, phenol oxidase is an endoenzyme which oxidises hydroquinone, catechol and p-phenylendiamine, but not p-cresol and tyrosine. According to its action, it is a phenol oxidase of the type of laccase. Laccase reached maximum effectiveness at pH 4.0—4.5.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 2. (1957) — č. 3

Mikrobiální přeměny steroidů. VI.

Studie přeměny steroidů druhy a kmeny rodu *Aspergillus*

ALOIS ČAPEK, OLDŘICH HANČ a HANA PAVLŮ

Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, Praha

Došlo 4. 1. 1957

Studium přeměn steroidů mikroorganismy je sice jedním z nejmladších úseků technické mikrobiologie, avšak počet uveřejněných prací a patentů svědčí o pozornosti, která je této otázce věnována.

Výsledky dosavadních prací (Dulaney, Stapley a Hlavac 1955, Fried a sp. 1952, Murray a Peterson 1953) týkající se přeměn steroidů různými příslušníky rodu *Aspergillus* potvrdily, že tyto kmeny jsou schopny provádět 11α-hydroxylaci a 6β, 11α-dihydroxylaci na steroidním skeletu. Hydroxylaci na 21. uhlíku steroidní molekuly plísní *Aspergillus niger* popsal Zaffaroni a sp. (1955) a tvorbu 11α, 21-dihydroxyprogesteronu neidentifikovaným kmenem rodu *Aspergillus* z progesteronu Weisz, Wix, a Bodanszky (1956). Negativní výsledky v pokusu o hydroxylaci sapogeninů některými druhy rodu *Aspergillus* zaznamenal Mininger a sp. (1956). Kromě schopnosti hydroxylovat steroidy bylo v několika případech u různých druhů rodu *Aspergillus* zjištěno, že mohou oxydačně odštěpit z progesteronu pobočný řetězec na 17. uhlíku s otevřením kruhu D, při čemž vzniká jako konečný produkt testololakton (Fried a sp. 1953, Peterson a sp. 1953, Čapek a sp. 1956) a že mohou oxydovat Δ^5-pregnen-3-β-ol-20-on v progesteron (Perlman 1952).

Průběh transformace steroidů mikroorganismy lze co do kvantity ovlivnit kultivačními podmínkami, jako jsou stáří kultury, složení a pH media, teplota a způsob fermentačního postupu, avšak kvalita přeměny se v podstatě nemění. Z této skutečnosti jsme vycházeli ve své práci při systematickém hodnocení transformací steroidů různými kmeny a druhy rodu *Aspergillus*. Cílem bylo vypracovat přehled o transformačních schopnostech, charakteristických pro jednotlivé zkoušené kmeny a druhy. Proto jsme sledovali průběh přeměn 3 testovaných steroidů (progesteronu, Δ^5-pregnen-3β-ol-20-onu a Δ^4-androsten-3,17-dionu) příslušníky rodu *Aspergillus* za konstantních podmínek, a to bez ohledu na specifické kultivační požadavky některých kmenů.

Materiál a metody

Mikroorganismy. Transformaci steroidů jsme hodnotili u 112 identifikovaných kmenů 34 druhů rodu *Aspergillus*. Použité kmeny jsme získali ze sbírky mikroorganismů Československé akademie věd, Československé akademie zemědělských věd, Výzkumného ústavu pro farmacii a biochemii a Katedry kvasné chemie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze.

Steroidy. Transformaci steroidů jsme sledovali u progesteronu, Δ^4-androsten-3,17-dionu a Δ^5-pregnen-3β-ol-20-onu.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Kultivace. Každý z použitých kmenů byl kultivován v živném roztoku tohoto složení: kukuřičný extrakt 0,5 %, glukosa 1,1 %, K_2HPO_4 0,04 % a $MgSO_4 . 7 H_2O$ 0,04 % . pH media bylo upraveno před sterilisací 10 % NaOH na hodnotu 5,5. Kmeny jsme pěstovali 48 hodin v 80 ml media v Erlenmeyerových baňkách o obsahu 300 ml při 27 °C na reciprokém třepacím stroji (výchylka 6 cm, počet kmitů je 70 za 1 min.). Po 48 hodinách kultivace jsme přidali do kultivačního roztoku 10 mg testovaného steroidu, který jsme rozpustili ve 2 ml ethanolu. Transformace steroidů probíhala při uvedených kultivačních podmínkách dalších 48 hodin.

Chromatografická stanovení. Průběh fermentace byl hodnocen papírovou chromatografií po 24 a 48 hodinách. Z kultivační tekutiny jsme odebrali vzorek 4 ml (pro 1 detekci), extrahovali jsme dvakrát 3 ml chloroformu, chloroformové extrakty jsme spojili a odpařili jsme je na misce. Odparek jsme vyňali malým podílem chloroformu a nanesli na chromatografický papír. Vzorky jsme nanášeli na papír Whatman č. 4, který jsme pak impregnovali směsí formamidu a ethanolu v poměru 1 : 1. Jako mobilní fáze jsme použili směsi benzenu a benzinu v poměru 1 : 1. K detekci chromatogramu jsme používali tří činidel. Metabolity progesteronu byly detegovány směsí p-fenylendiaminu a kyseliny ftalové (Bodanszky a Kollowitsch 1955) a vodným roztokem jodu (Tůmová a sp. 1955). Metabolity Δ^5-pregnen-3β-ol-20-onu byly detegovány rovněž směsí p-fenylendiaminu a kyseliny ftalové a nasyceným chloroformovým roztokem chloridu antimonitého. Metabolity Δ^4-androsten-3,17-dionu také směsí p-fenylendiaminu a kyseliny ftalové. Hodnoty R_F a barva skvrn jsou uvedeny v tab. 1.

Tab. 1. Hodnoty R_F, barva skvrn, detekce steroidů
Soustava benzen-benzin 1 : 1, papír Whatman 4, impregnace formamidem

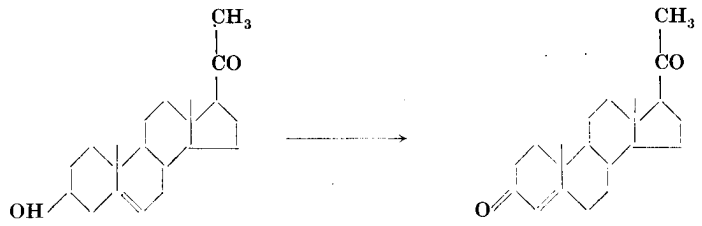
Název steroidu	R_F	Detekce	Barva skvrny
Progesteron	0,90	FF	hnědá
Δ^4-androsten-3,17-dion	0,82	FF	hnědá
Testosteron	0,60	FF	hnědá
Testololakton	0,31	FF	hnědá
11α-hydroxyprogesteron	0,21	FF	hnědá
		J	modrá
Metabolit X	0,21	FF	hnědá
		J	žlutohnědá
Δ^5-pregnen3β-ol-20-on	0,88	Sb	růžová

Označení detekčních činidel: FF — směs p-fenylendiaminu a kyseliny ftalové, J — vodný roztok jodu, Sb — nasycený chloroformový roztok chloridu antimonitého.

Výsledky

Při chromatografickém hodnocení přeměn jednotlivých steroidů různými druhy a kmeny rodu *Aspergillus* jsme se setkali se třemi základními způsoby transformací.

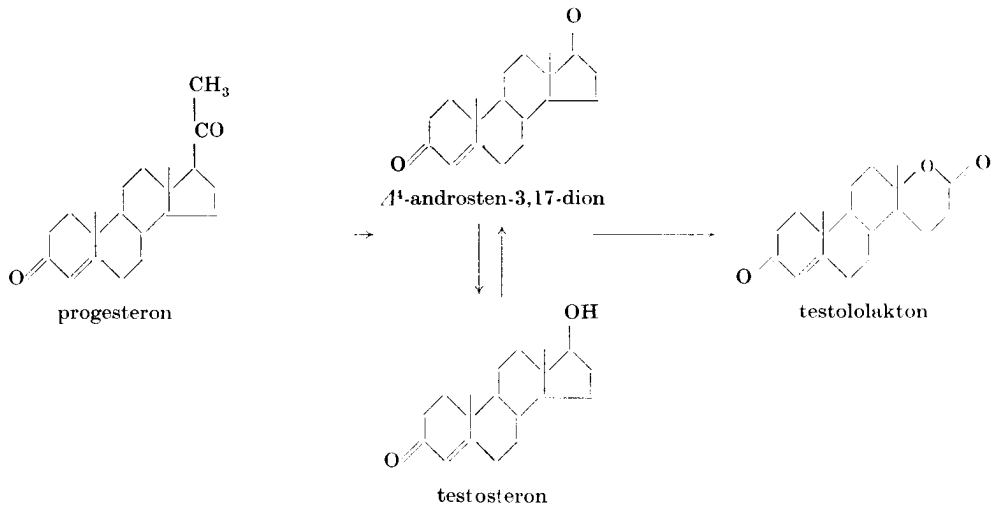
Předně s oxydační přeměnou 3β-OH-skupiny v 3-CO-skupinu s přesunem dvojné vazby:



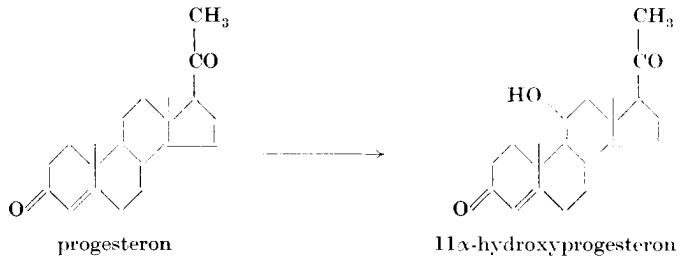
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Dále s oxydačním odštěpením pobočného řetězce na C_{17} s otevřením kruhu D; konečným produktem je testololakton.

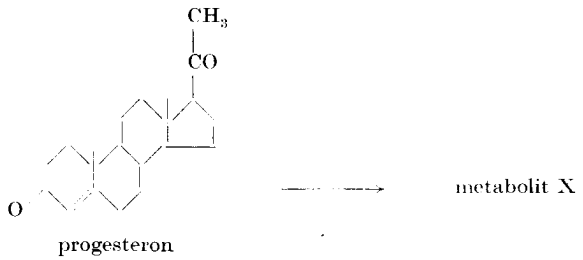


Konečně s hydroxylací, která probíhá různými způsoby. Při prvním vzniká 11α-hydroprogesteron.



Při detekci vodným roztokem jodu se skvrna, 11α-hydroxyprogesteronu barví na chromatogramu modře.

Dále vzniká dosud blíže neurčená látka, hydroxyderivát progesteronu, kterou označujeme jako metabolit X.

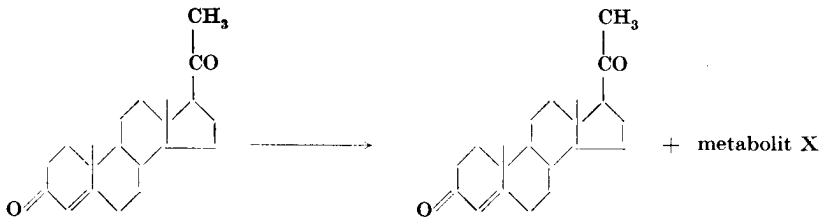


Metabolit X svým R_F odpovídá sice v dané soustavě rozpouštědel 11α-hydroxyprogesteronu, avšak při detekci vodným roztokem jodu nenastává charakteristické modré zbarvení skvrny. Skvrna na chromatogramu se barví žlutohnědě.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Konečně mohou vznikat 2 hydroxyderiváty (11α-hydroxyprogesteron a metabolit X).



progesteron 11α-hydroxyprogesteron

Tab. 2. Přehled transformací steroidů kmeny a druhy rodu *Aspergillus*

Skupina	Mikroorganismus	Oxydace na C_3	Biosynt. testololaktonu	Hydroxylace	
				11α-OH	metabolit X
1	*A. awamori*	+	—	+	—
	A. clavatus	+	—	+	—
	A. effusus	+	—	+	—
	A. luchuensis	+	—	+	—
	A. melleus	+	—	+	—
	A. nidulans	+	—	+	—
	A. niger	+	—	+	—
	A. ochraceus	+	—	+	—
	A. tamarii	+	—	+	—
	A. ustus	+	—	+	—
	A. variecolor	+	—	+	—
2	*A. atropurpureus*	+	—	—	+
	A. candidus	+	—	—	+
	A. cinnamomeus	+	—	—	+
	A. elegans	+	—	—	+
	A. fumigatus	+	—	—	+
	A. ostianus	+	—	—	+
	A. parasiticus	+	—	—	+
	A. rehmii	+	—	—	+
	A. restrictus	+	—	—	+
3	*A. amstelodami*	+	—	+	+
	A. sydowi	+	—	+	+
	A. versicolor	+	—	+	+
4	*A. fischeri*	—	+	—	—
	A. ruber	—	+	—	—
5	*A. alliaceus*	+	+	—	—
	A. flavipes	+	+	—	—
	A. flavus	+	+	—	—
	A. chevalieri	+	+	—	—
	A. oryzae	+	+	—	—
	A. penicilloides	+	+	—	—
	A. sclerotiorum	+	+	—	—
	A. terreus	+	+	—	—
	A. terricola	+	+	—	—

Označení: + značí schopnost kmene provádět naznačenou transformaci, — značí neschopnost kmene provádět naznačenou transformaci.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Při detekci směsí p-fenylendiaminu a kyseliny ftalové je patrný na chromatogramu jediný metabolit, který svým R_F odpovídá 11α-hydroxyprogesteronu. Při specifické detekci vodným roztokem jodu jsou však na chromatogramu patrny dva metabolity (dvě skvrny částečně se přesahující), z nichž pouze jeden (spodní část skvrny) se barví modře. Druhý metabolit (vrchní část skvrny) se barví žlutohnědě. Na pokusech o isolaci a identifikaci metabolitu X pracujeme.

Kromě těchto hlavních metabolitů vznikají v některých případech během 48 hodin fermentace ještě ve stopách další, polárnější metabolity, které jsme neidentifikovali a ani v přehledu nezaznamenali, protože pro kvalitativní posouzení schopnosti transformace steroidů daným kmenem nejsou podstatné. Protože rychlost a kvantita přeměny a tím pochopitelně i intensita zbarvení a velikost skvrny metabolitu na chromatogramu jsou ovlivněny kultivačními podmínkami (na př. dobou kultivace), jsou uvedené výsledky pokusů vztahovány na popsané fermentační podmínky (tab. 2.).

Diskuse

Dulaney, Stapley a Hlavac (1955) zjistili u většiny kmenů *Aspergillus* schopnost transformovat progesteron v 11α-hydroxyprogesteron a 6β-11α-dihydroxyprogesteron, když identifikovali vzniklé metabolity ve většině případů jen na základě R_F, a pouze u kmene *Aspergillus ochraceus* isolovali vzniklé metabolity a identifikovali je pomocí fysikálně-chemických konstant.

Naše výsledky i výsledky Frieda, Thoma a Klingsberga (1953) a Petersona a sp. (1953) však ukazují, že tvorba 11α-hydroxyprogesteronu není pro rod *Aspergillus* uniformním pochodem. Také žádný z našich 18 kmenů *Aspergillus niger* neprováděl hydroxylaci v poloze 21 steroidního skeletu proti údajům Zaffaroniho a sp. (1955). Ze 34 kmenů uvedených v tabulce 2 jich 23 vytváří metabolit, který svým R_F odpovídá 11α-hydroxyprogesteronu, avšak při specifické detekci vodným roztokem jodu (za přítomnosti 11α-hydroxyprogesteronu vzniká modré zbarvení skvrny na chromatogramu) jsme zjistili tvorbu 11α-hydroxyprogesteronu jen u 11 kmenů (skupina 1). Tvorbu námi označeného metabolitu X, který svým R_F odpovídá sice 11α-hydroxyprogesteronu, ale při specifické detekci vodným roztokem jodu vzniká žlutohnědé zbarvení skvrny na chromatogramu, jsme zjistili u 9 kmenů (skupina 2). Současnou tvorbou 11α-hydroxyprogesteronu a metabolitu X jsme dokázali u 3 kmenů (skupina 3). U některých kmenů, které vytvářejí z progesteronu metabolit X, byla zpracována větší množství fermentační tekutiny a byl isolován metabolit X (b. t. = 185 — 7 °C, $\alpha_D^{20} = +180°$ — chloroform). U 11 kmenů (skupina 4 a 5) jsme zjistili biosyntesu testololaktonového cyklu, kdy konečným metabolitem je testololakton. V uvedených kultivačních podmínkách byla zjištěna u 32 kmenů schopnost oxydovat 3β-OH-skupiny v 3-CO-skupinu. Pouze u dvou kmenů *(A. fischeri, A. ruber)* nenastala zmíněná oxydace a Δ^5-pregnen-3β-ol-20-on nebyl během 48 hodin fermentace vůbec transformován. Avšak není vyloučeno, že oba tyto kmeny oxydují Δ^5-pregnen-3β-ol-20-on po delší době fermentace a je proto možno považovat schopnost oxydace steroidů za charakteristickou vlastnost rodu *Aspergillus*. Avšak vzhledem ke konstantním pokusným podmínkám jsme schopnost obou kmenů posuzovali jen během prvních 48 hodin fermentace. Kromě těchto kmenů je oxydace Δ^5-pregnen-3β-ol-20-on u ostatních kmenů primárním transformačním pochodem, i když vlastní průběh oxydace 3β-hydroxy-skupiny v 3-CO-skupinu je kvantitativně pomalejší než na př. hydroxylace nebo biosyntesa testololaktonového cyklu. Rovněž srovnání rychlosti transformace progesteronu a Δ^4-androsten-3,17-dionu kmeny rodu *Aspergillus* potvrdilo, že Δ^4-androsten-3,17-dion je mnohem pomaleji transformován.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Na základě získaných výsledků je možno testované kmeny rodu *Aspergillus* vzhledem k transformaci progesteronu a Δ^5-pregnen-3β-ol-20-onu rozdělit do 5 skupin a využít tak schopnosti transformace steroidů jako jedné z informačních biochemických vlastností při identifikaci kmenů rodu *Aspergillus*.

Souhrn

Při studiu transformací progesteronu, Δ^5-pregnen-3β-ol-20-onu a Δ^4-androsten-3,17-dionu 112 kmeny 34 druhů rodu *Aspergillus* jsme se setkali se třemi základními pochody: s oxydací 3β-OH-skupiny v 3-CO-skupinu, s biosyntesou testololaktonového cyklu a s hydroxylací steroidní molekuly.

Na základě toho lze použité kmeny a druhy rodu *Aspergillus* rozdělit do 5 skupin podle schopnosti kmenů uskutečňovat: 3-oxydaci a 11α-hydroxylaci, 3-oxydaci a hydroxylaci (ne však v poloze 11α), 3-oxydaci, 11α-hydroxylaci a další hydroxylaci (ne v poloze 11), biosyntesu testololaktonového cyklu a 3-oxydaci a biosyntesu testololaktonového cyklu.

Při transformaci steroidů kmeny druhé a třetí skupiny dochází k hydroxylaci, která se však neuskutečňuje v poloze 11 a při níž vzniká dosud blíže neurčený hydroxyderivát progesteronu.

Literatura

Bodanszky, A, Kolowitsch, J.: *Colour reagent for paper chromatography of steroids.* Nature 175 : 729, 1955.

Čapek, A., Hanč, O., Macek, K., Tandra, M., Riedl-Tůmová, E.: *Das Studium der Überführung von Progesteron in Testololacton.* Naturwissensch. 43 : 471, 1956.

Dulaney, E. L., Stapley, E. O., Hlavac, C.: *Hydroxylation of steroids, principally progesterone, by a strain of Aspergillus ochraceus.* Mycologia 47 : 464, 1955.

Dulaney, E. L., McLaleer, W. J., Koslowski, M., Stapley, E. O., Jaglom, J.: *Hydroxylation of progesteron and 11-desoxy-17-hydroxycorticosteron by Aspergillus and Penicillium.* Appl. Microbiol. 3 : 336, 1955.

Fried, J., Thoma, R. W., Gerke, J. R., Herz, J. E., Domin, M. N., Perlman, D.: *Hydroxylation in position 11 and synthesis of cortisone from Reichsteins compound S.* J. Am. Chem. Soc. 74 : 3962, 1952.

Fried, J., Thoma, R. W., Klingsberg, A.: *Sidechain degradation, ring-D-cleavage and dehydrogenation in ring A.* J. Am. Chem. Soc. 75 : 5764, 1953.

Hanč, O., Jirát, E., Čapek, A. a Tadra, M.: *Mikrobiální přeměny steroidů. V. Příprava testosterolu a jeho 17-alfa epimeru.* Chem. listy, v tisku.

Mininger, R. F., Wall, M. E., Dworschak, R. G., Jackson, R. W.: *Attempted microbiological oxidation.* Arch. Bioch. Biophys. 60 : 427, 1956.

Murray, H. C., Peterson, D. H.: U. S. P. 2, 649 . 402, 1953, ref. Chem. Zbl. 11 . 255, 1955.

Perlman, D.: *Microbiological conversion of pregnenolon to progesteron.* Science 115 : 529, 1952.

Peterson, D. H., Eppstein, S. H., Meister, P. D., Murray, H. C., Leigh, H. M.: *Degradation of C_{21}-steroids to C_{19} ketones and to testololactone.* J. Am. Chem. Soc. 75 : 5768, 1953.

Tůmová, E., Siblíková-Zbudovská, O., Hanč, O.: *Biochemické oxydace pregnanových steroidů.* Čs. farmacie 4 : 65, 1955.

Weisz, E., Wix, G., Bodanszky, M.: *Die Bildung von-11-Epicorticosteron auf mikrobiologischen Wege.* Naturwiss. 43 : 39, 1956.

Zaffaroni, A., Campillo, C. C., Cordoba, F., Rosenkranz, G.: *Microbiological hydroxylation of steroids in position 21.* Experientia 11 : 219, 1955.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Изменения стероидов микробами. VI.

Изучение изменений стероидов штаммами рода Aspergillus

А. Чапек, О. Ганч и Г. Павлу

Резюме

Изучая превращения прогестерона, Δ5-прегнен-3β-ol-20-она, и Δ4-андростен-3, 17-диона микробами 112 штаммов рода Aspergillus, мы встречались с тремя основными процессами: 1. с окислением группы 3β-OH в группу 3-CO; 2. с биосинтезом цикла тестололактона и 3. с гидроксилированием стероидной молекулы. На основании различий этих процессов мы разделили используемые нами для опытов штаммы Aspergillus на 5 групп, в зависимости от их способности производить: A. 3-окисление и 11α-гидроксилирование; B. 3-окисление и гидроксилирование, но не в положении 11α (метаболит X); C. 3-окисление, 11α-гидроксилирование и дальнейшее гидроксилирование (метаболит X); D. биосинтез тестололактонового цикла и E. 3-окисление и биосинтез тестололактонового цикла.

Bacterial Conversion of Steroids. VI.

A Study of the Conversion of Steroids by Strains of the Genus *Aspergillus*

A. Čapek, O. Hanč, H. Pavlů

Summary

When studying the bacterial transformation of progesterone, Δ^5-pregnene-3β-01-20-one and Δ^4-androstene-3, 17 dione by 112 strains of the genus *Aspergillus*, three basic processes were found: 1. oxydation of the 3β-OH group into a 3-CO group, 2. biosynthesis of the testololactone cycle, 3. hydroxylation of the steroid molecule. On the basis of these processes, the strains of *Aspergillus* used in the experiments were divided into five groups, according to their ability to carry out the following: A. 3-oxidation and 11α-hydroxylation, B. 3-oxidation and hydroxylation, but not in the 11 position (metabolite X), C. 3-oxidation, 11 α-hydroxylation and further hydroxylation (metabolite X), D. biosynthesis of the testololactone cycle and E. 3-oxidation and biosynthesis of the testololactone cycle.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Československá

MIKROBIOLOGIE

ročník 2. (1957) — č. 3

Použití papírové chromatografie při výzkumu nových antibiotik

VLADIMÍR ŠEVČÍK, MILOSLAV PODOJIL a ALENA VRTIŠKOVÁ

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 4. 12. 1956

Papírové chromatografie se s úspěchem používá při výzkumu antibiotik. K rozlišení a identifikaci jednotlivých antibiotik použili Ishida a sp. (1951) t. zv. souhrnného chromatogramu, čímž rozumí serii papírových chromatogramů téhož antibiotika v různých systémech rozpouštědel. Jako rozpouštědla používají vodou nasyceného n-butylalkoholu, dále 3% roztoku chloridu amonného, 80% fenolu, 80% fenolu v atmosféře amoniaku, 50% acetonu, směsi n-butylalkohol-methylalkohol-voda v poměru 4 : 1 : 2 a téže směsi s methyloranží. Tento způsob identifikace se osvědčil i jiným pracovníkům (Miller, Davis a Bird 1954, Oliver a sp. 1954, Koffler a Pagano 1954). Aby nám souhrnný chromatogram poskytl podrobnější údaje o rozpustnosti antibiotik, rozšířili a upravili jsme řadu rozpustidel používaných Ishidou a jinými pracovníky. Ověřili jsme, do jaké míry ovlivňuje aplikace antibiotik v živných půdách, pevných nebo tekutých, jejich R_f při souhrnném chromatogramu a jak souhlasí u některých známých antibiotik chromatografická data s jejich rozpustnostmi. U antibiotika, které jsme isolovali z blíže neurčeného kmene aktinomycety a které označujeme číslem BÚ 607, jsme použili výsledků souhrnného chromatogramu při přípravě preparátů z kultivační tekutiny.

Materiál a metody

Použitá antibiotika a aktinomycety. Z antibiotik jsme zkoušeli streptomycin . $CaCl_2$ (Glaxo), síran viomycinu (Pfizer), síran neomycinu (francouzská výroba), hydrochlorid chlortetracyklinu (Lederle), hydrochlorid oxytetracyklinu (Pfizer), stearát erythromycinu (Abbott), D-chloramfenikol (Interfarma), krystalické preparáty aktinomycinů isolované z kultivační tekutiny aktinomycet, které vedeme v naší sbírce pod číslem 105/5 a 154. Roztoky antibiotik jsme přidávali do různých živných půd. Dále jsme používali agarových bločků s vyrostlými aktinomycetami po pětidenní kultivaci při 28 °C na půdě S_1, P_0 a PŠ.

Živné půdy. Složení živných půd je uvedeno v tabulce 1.

Rozpouštědla. 1. Destilovaná voda; 2. 3% roztok NH_4Cl; 3. methylalkohol (100%); 4. aceton (100%); 5. ethylacetát nasycený vodou; 6. n-butylalkohol nasycený vodou; 7. ethylether nasycený vodou; 8. chloroform; 9. benzen; 10. petrolether.

Papírová chromatografie. Používáme vzestupné chromatografie ve zkumavkách širokých 4 cm a dlouhých 20 cm. Chromatografický papír je zachycen nahoře v zářezu gumové zátky a dole sahá do rozpouštědla. Na proužky chromatografického papíru (Whatman č. 1) široké 1 cm a dlouhé 19 cm nanášíme roztok antibiotika (10 jednotek) mikropipetou, případně klademe agarové bločky s antibiotikem nebo vyrostlou aktinomycetou 4 cm od spodního okraje proužku papíru. Na dno zkumavek dáváme 10 ml rozpouštědla.

Chromatogramy vyvíjíme při laboratorní teplotě, až čelo rozpouštědla doběhne k zátce. Na vzduchu usušené chromatogramy klademe na 10 min. na skleněné mísy 35 × 35 cm s agarovou půdou pro

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

titrace streptomycinu nebo chlortetracyklinu naočkovanou testovacím mikrobem *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Ševčík 1954, Hess 1955). Skvrny antibiotik se objeví po 20hodinové inkubaci při 37 °C jako inhibiční zony.

Tab. 1. Složení živných půd. Množství jednotlivých látek jsou vyjádřena v %

	Označení půd			
	S_1	S_0	P_0	PŠ
Glukosa	1	1	1	—
Laktosa	—	1,5	1,5	—
Škrob	1,5	—	—	1
Kukuřičný extrakt	0,5	0,35	0,35	—
Pepton	—	—	—	1
$(NH_4)_2SO_4$	0,35	0,4	—	—
$(NH_4)_2HPO_4$	—	—	0,4	—
NaCl	0,5	0,5	0,5	0,5
$CaCO_3$	0,2	—	—	—
pH	7,0	7,0	6,0	7,0

Pracovní postup. Difuse antibiotik z agarových bločků o průměru 6 mm byly prováděny tak, že agarové bločky s roztokem antibiotika v živné půdě nebo bločky s vyrostlou aktinomycetou byly kladeny na čtverečky (1 cm × 1 cm) chromatografického papíru. Chromatografický papír se před položením agarového bločku ovlhčí kapkou destilované vody. Agarové bločky se po 15 min. odstraní a čtvereček chromatografického papíru s antibiotikem se klade na agarovou plotnu naočkovanou testovacím mikrobem. Pro kontrolu se kladou další agarové bločky přímo na naočkovanou agarovou plotnu, a to na dobu 15 min., nebo se nechají další agarové bločky na plotně až do druhého dne (do doby odečítání inhibičních zon). V tabulkách jsou uvedeny průměrné hodnoty inhibičních zon vždy z 10 agarových bločků.

Výsledky a diskuse

Velikost inhibičních zon při různých způsobech difuse antibiotika je uvedena v tabulce 2. Ve většině případů nejsou velké rozdíly mezi velikostí inhibičních zon, způsobených agarovými bločky s antibiotikem, položenými na agarové titrační plotně 15 minut, a mezi inhibičními zonami, způsobenými difusí antibiotika s chromatografického papíru. Podobné výsledky jsme získali při použití agarových bločků s vyrostlou aktinomycetou (tab. 3). U agarových bločků s vyrostlou aktinomycetou může být difuse antibiotika ovlivňována vytvořenými metabolity. Při tom koncentrace živin u bločků s aktinomycetou je nižší než u bločků s roztokem antibiotika a živnou půdou. Z těchto výsledků je vidět, že je možno pro papírovou chromatografii použít agarových bločků s vyrostlými aktinomycetami produkujícími antibiotika místo nanášení roztoků antibiotik na chromatografický papír. Podobné výsledky uvádějí Ishida se sp. (1951) a Kuroya se sp. (1953).

Velikost inhibičních zon je přímo závislá na době difuse (tab. 4). V obou případech byly při difusi antibiotika z agarového bločku přímo na zaočkovanou agarovou plotnu i při difusi antibiotika na chromatografický papír a s chromatografického papíru dále na agarovou plotnu inhibiční zony větší při delší době styku. U nejúčinnějších kmenů aktinomycet jsou dostatečně veliké inhibiční zony při difusi antibiotika z agarových bločků na chromatografický papír po dobu 15 minut, zatím co u méně produkčních kmenů aktinomycet necháme difundovat antibiotikum až 6 hodin.

Při vyvíjení chromatogramů vlhkým nebo bezvodým n-butylalkoholem a etherem se ukázala výhodnější vlhká rozpouštědla. U některých antibiotik pozorujeme totiž při použití suchých rozpouštědel tvoření dvojích skvrn, z nichž jedna je blíže startu a druhá blíže čela rozpouštědla (aktinomycin105/5, aktinomycin 154, erythromycin, chloramfenikol).

Živná půda S_1 působí zřetelně na pohyblivost chlortetracyklinu a chloramfenikolu při papírové chromatografii (antibiotikum vnášeno v roztoku živné půdy, jak patrno z obr. 1). Velké rozdíly v pohyblivosti byly pozorovány zvláště při vyvíjení chromatogramů n-butanolem. Též u dalších antibiotik byl pozorován podobný vliv různých živných půd. Na obrázku 2 jsou uvedeny chromatogramy chlortetracyklinu, aktinomycinu 105/5, erythromycinu a chloramfenikolu vyvíjené ve vlhkém n-butylalkoholu. Antibiotik tu bylo použito v agarových bločcích různých živných půd. Jednotlivé živné

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Tab. 2. Difuse antibiotik z agaru na chromatografický papír Velikost inhibičních zon v mm

Antibiotikum	Konc. (μg v ml)	Způsob difuse	Půda				Titrační půda
			S_1	S_0	P_0	PŠ	
Streptomycin	10 μg	A	n	n	10	8	STM
		B	0	0	0	0	
		C	0	0	0	0	
	100 μg	A	14,5	16,5	17,3	16,3	STM
		B	9	12	11,5	10	
		C	0	11,8	6	9,5	
Neomycin	25 μg	A	11,2	7,5	0	11,5	STM
		B	8	0	0	7,5	
		C	0	0	0	0	
	100 μg	A	13	10	9	13,2	STM
		B	10,5	7	0	8	
		C	n	0	0	n	
	500 μg	A	15	15	12,5	15	STM
		B	12,5	13,2	11	12,5	
		C	15	15	11,4	13,2	
Viomycin	500 μg	A	18	19,5	17	18	STM
		B	15	16,5	13	15	
		C	12,7	16	12,2	13,5	
Chloramfenikol	10 μg	A	10,5	10,3	12,3	n	CTC
		B	0	0	0	0	
		C	0	0	0	0	
	100 μg	A	17,3	23,8	24,3	16,8	CTC
		B	n	20,8	12	0	
		C	n	20,2	17,2	0	
Aktinomycin 105/5	5 μg	A	15,7	15,2	15,5	15,7	STM
		B	9,5	10,5	9,5	9,7	
		C	5,7	7,5	7,4	7,6	
	50 μg	A	22,2	20,2	20	23	STM
		B	18	15	18,2	18,5	
		C	16,1	15,1	15	13,5	
Chlortetracyklin	10 μg	A	24,1	18	18,5	16,2	CTC
		B	20	n	13	n	
		C	16,8	n	n	n	
	100 μg	A	27,3	26,3	20	24,7	CTC
		B	24	23	14,5	20	
		C	18,1	22,1	n	14,9	
Oxytetracyklin	25 μg	A	18	25	23,5	19	CTC
		B	15	20	20	15,5	
		C	13,1	17	15	8	
	100 μg	A	23	29	27	26	CTC
		B	19,5	25	25	22,2	
		C	17	25	24	17,2	
Erythromycin	3 μg	A	19,5	19	20,5	24	STM
		B	17	16,6	17,5	20,2	
		C	17	16,5	17,5	20,5	
	30 μg	A	22	21	22	25,5	STM
		B	22	20	21	21	
		C	22	21	22	23,2	

Způsob difuse: A — agarové bločky ponechány na agarových titračních plotnách do druhého dne, B — agarové bločky ponechány na agarových titračních plotnách 15 min., C — difuse antibiotika s chromatografického papíru.

Titrační půda: STM — streptomycinová, CTC — chlortetracyklinová.

Inhibiční zona: n — náznak zony (malá nejasná zona).

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

půdy zde zřetelně ovlivňují pohyblivost antibiotik při papírové chromatografii. Toto ovlivnění však není zase tak veliké, aby způsobilo chybné závěry o rozpustnosti antibiotik v použitých rozpouštědlech. Podobné výsledky byly získány při použití agarových bločků s vyrostlými aktinomycetami *Streptomyces aureofaciens* (chlortetracyklin) a *Streptomyces antibioticus* 105/5 (aktinomycin B, obr. 3).

Tab. 3. Difuse antibiotik z agaru na chromatografický papír
Velikost inhibičních zon v mm

Kmen aktinomycety	Způsob difuse	Půda				Titrační půda
		S_1	S_0	P_0	PŠ	
Streptomyces griseus	A	19,5	18,5	15	15,5	STM
	B	17	15	11	13	
	C	20,5	19,6	13,2	13,4	
Streptomyces No. 105/5	A	19	19	19	20	STM
	B	15	12	16	15,5	
	C	16,3	0	15,4	16,8	
Streptomyces No. 154	A	23	22	17	20,5	STM
	B	20,5	18	13,5	14,5	
	C	22,8	17	18,2	16,7	
Streptomyces No. 607	A	17,5	14	18	14,5	STM
	B	13	n	9	8	
	C	12,4	n	n	8	

Tab. 4. Vliv doby difuse na velikost inhibičních zon

Antibiotikum	Způsob difuse	Inhibiční zona (mm)					
		15 min.	30 min.	1 hod.	2 hod.	4 hod.	6 hod.
Streptomycin	A	17	17,9	18,5	19,6	19,4	19,5
	B	19,2	20,2	21,2	22,8	23	23
Chlortetracyklin	A	30	30,3	30,5	31	31,6	32
	B	27	28,5	31,5	30,3	31	31,5
Chloramfenikol	A	26	27,1	28	31	31,5	32
	B	26	28,5	30	32	33	34
Aktinomycin 105/5	A	13	14	15	16	16	16
	B	14,5	15	15,4	16	16,8	17

A — difuse antibiotika z agarového bločku.
B — difuse antibiotika s chromatografického papíru.

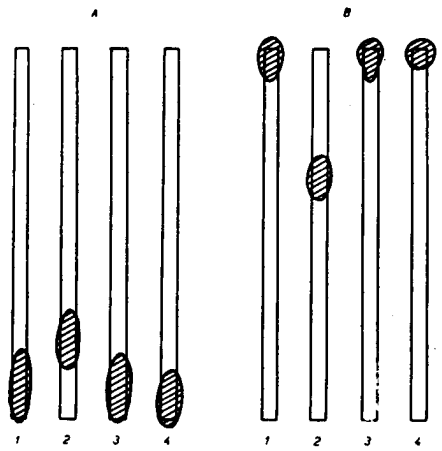
Streptomycin je rozpustný ve vodě, málo rozpustný v methanolu, nerozpouští se však v acetonu, ethylacetátu a dalších méně polárních rozpouštědlech (Waksman a Schatz 1945). Ve shodě s těmito vlastnostmi byla při souhrnném chromatogramu (obr. 4) pozorována značná pohyblivost při vyvíjení chromatogramu ve vodě a 3% roztoku NH_4Cl, u methylalkoholu je vidět pouze protažení skvrny antibiotika u startu, kdežto v ostatních rozpouštědlech, v nichž není streptomycin rozpustný, tvoří antibiotikum pravidelnou kruhovou zonu na startu.

Aktinomycin je rozpustný v methanolu, acetonu, ethylacetátu, n-butanolu, ethyletheru a chloroformu, málo rozpustný ve vodě a benzenu, kdežto v petroletheru se nerozpouští (Waksman 1954). Rozpustnosti aktinomycinu odpovídají výsledky získané u souhrnného chromatogramu (obr. 5). U chromatogramů vyvíjených roz-

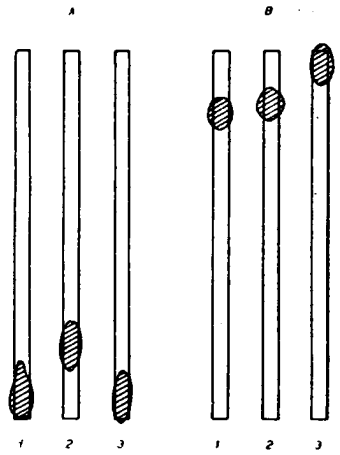
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

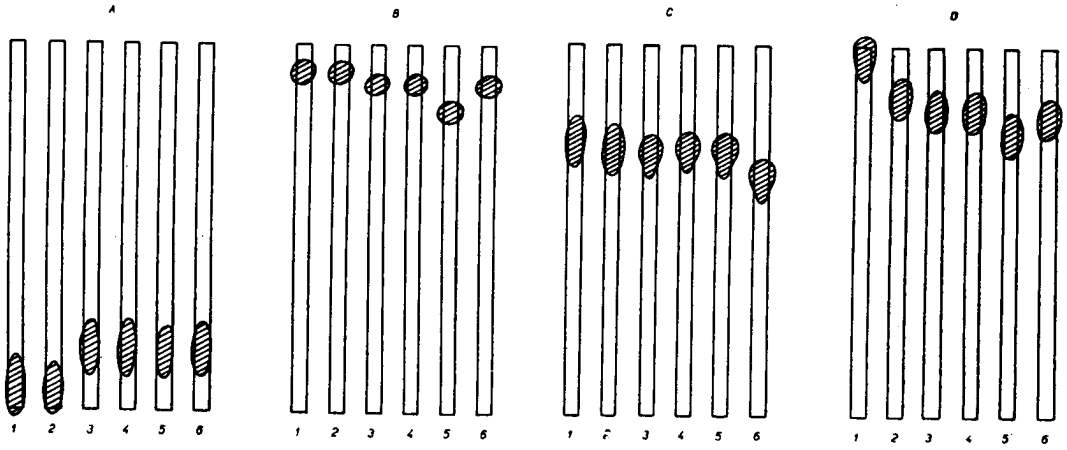
pouštědly, v nichž je aktinomycin dobře rozpustný, postupuje skvrna antibiotika téměř s čelem chromatogramu, u benzenu je R_f přibližně 0,5, u vody a 3%roztoku NH_4Cl je skvrna antibiotika protažena u startu, kdežto u petroletheru, v němž



Obr. 1. Vliv živné půdy S_1 na pohyblivost chlortetracyklinu a chloramfenikolu při papírové chromatografii. A — chromatogramy chlortetracyklinu, B — chromatogramy chloramfenikolu. Roztok antibiotika: 1 a 3 — ve vodě, 2 a 4 — v živné půdě S_1. Vyvíjení chromatogramů: 1 a 2 — ve vlhkém n-butylalkoholu, 3 a 4 — ve vlhkém etheru.



Obr. 3. Vliv různých pevných živných půd na pohyblivost antibiotik. Agarové bločky s vyrostlými aktinomycetami. Chromatogramy vyvíjeny ve vlhkém n-butylalkoholu. A — chromatogramy chlortetracyklinu *(S. aureofaciens)*. B — chromatogramy aktinomycinu 105/5 (*S. antibioticus* 105/5). Agarové živné půdy: 1 — S_1, 2 — P_0, 3 — PŠ.

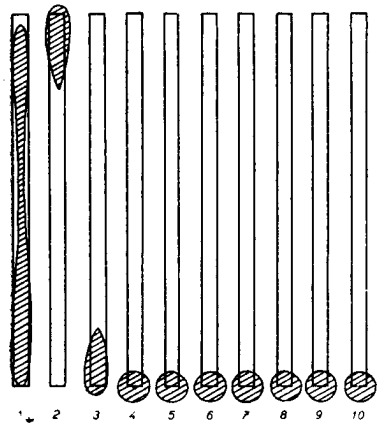


Obr. 2. Vliv různých pevných živných půd na pohyblivost antibiotik. Agarové bločky se standardy antibiotik. Chromatogramy vyvíjeny ve vlhkém n-butylalkoholu. A — chromatogramy chlortetracyklinu, B — chromatogramy aktinomycinu 105/5, C — chromatogramy erythromycinu, D — chromatogramy chloramfenikolu. 1 — Na chromatografický papír nanášen roztok antibiotika ve vodě. 2, 3, 4, 5, 6 — Na chromatografický papír kladeny agarové bločky s antibiotikem. 2 — hladový agar, 3 — agarová půda S_1, 4 — agarová půda S_0, 5 — agarová půda P_0, 6 — agarová půda PŠ.

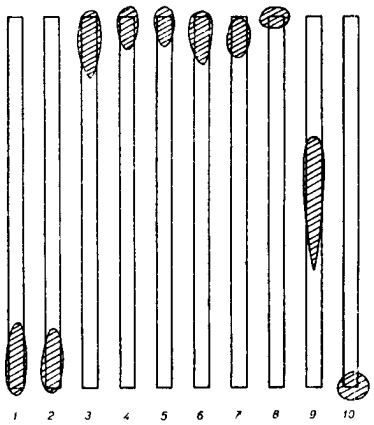
Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

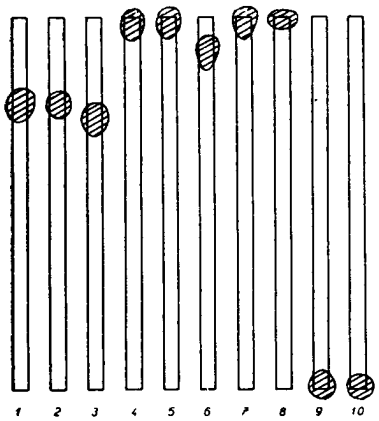
aktinomycin není rozpustný, se objevuje pravidelná skvrna na startu. Ze souhrnného chromatogramu můžeme dále vyčíst základní postup pro isolaci antibiotika. Aktinomycin extrahujeme z fermentační tekutiny n-butanolem, extrakt odpaříme ve vakuu do sucha, účinnou látku extrahujeme z odparu benzenem a antibiotikum vysrážíme z benzenového roztoku petroletherem (Ševčík 1956).



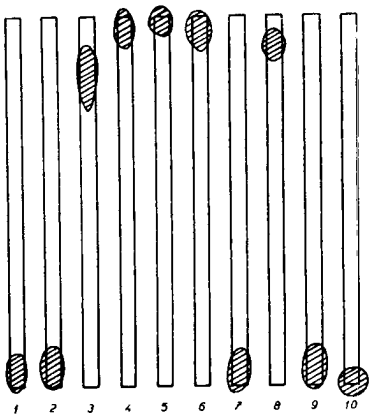
Obr. 4. Souhrnný chromatogram streptomycinu. 1—10: Systémy rozpouštědel uvedeny v metodické části.



Obr. 5. Souhrnný chromatogram aktinomycinu 105/5.



Obr. 6. Souhrnný chromatogram chloramfenikolu.



Obr. 7. Souhrnný chromatogram antibiotika BU 607.

Podobná závislost mezi rozpustností antibiotika a výsledky získanými u souhrnného chromatogramu byla pozorována dále u chloramfenikolu. Na souhrnném chromatogramu (obr. 6) je vidět, že se chloramfenikol velmi dobře pohybuje ve většině použitých systémů rozpouštědel, kromě benzenu a petroletheru, v nichž není rozpustný. Pohyblivost antibiotika souhlasí s rozpustností chloramfenikolu udávanou v literatuře (Bartz 1948).

Možnost použití výsledků souhrnného chromatogramu pro přípravu hrubých preparátů antibiotika byla dále ověřena u neznámého antibiotika produkovaného

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

kmenem aktinomycety BU 607. Antibiotikum BU 607 dalo při souhrnném chromatogramu tyto výsledky: skvrna antibiotika se pohybuje téměř s čelem chromatogramu u acetonu, ethylacetátu, n-butanolu, chloroformu, poněkud méně u methanolu a téměř se nepohybuje ve vodě, etheru, benzenu a petroletheru. Ve shodě s těmito výsledky podařilo se nám antibiotikum extrahovat z fermentační tekutiny n-butanolem, butanolický extrakt byl odpařen a ze zbytku byly extrahovány nečistoty petroletherem, čímž jsme získali bělavý prášek s účinností 2500 streptomycinových jednotek na mg. Účinná látka se benzenem nebo etherem téměř neextrahuje, ve studeném methanolu je poněkud méně rozpustná, dobře však v teplém methanolu (70 °C).

U souhrnného chromatogramu používáme serie rozpouštědel, která tvoří eluotropickou řadu a která byla vybrána s ohledem na jejich možné použití při extrakci, případně i při dalším čištění nových či neznámých antibiotik. Tímto souhrnným chromatogramem můžeme stanovit rozpustnost neznámých antibiotik v takové míře, v jaké ji potřebujeme pro přípravu hrubých preparátů antibiotika extrakcí z fermentační tekutiny, případně i pro jejich další čištění. Při hodnocení výsledků u jednotlivých chromatogramů si však musíme uvědomit, že pohyblivá fáze je v nadbytku vzhledem k fázi zakotvené a tudíž získané hodnoty relativní pohyblivosti antibiotik na papíře jsou příznivější pro pohyblivou fázi. Současně nám souhrnný chromatogram dále slouží pro identifikaci neznámého antibiotika, jelikož rozpustnost je velmi důležitým charakteristickým znakem antibiotik.

Souhrn

Původní Ishidův souhrnný chromatogram jsme upravili tak, aby získané výsledky sloužily nejen k bližší identifikaci neznámého antibiotika, nýbrž abychom získaných výsledků mohli současně použít při přípravě hrubých preparátů antibiotika extrakcí z fermentační tekutiny, případně i při jeho dalším čištění.

Velikost skvrn antibiotik na chromatogramu je přímo závislá na době difuse z agarového bločku na chromatografický papír. Pohyblivost antibiotik je částečně ovlivněna jednotlivými živnými půdami.

Souhrnné chromatogramy byly provedeny u streptomycinu, aktinomycinu B, chloramfenikolu a antibiotika BU 607.

Literatura

Bartz, Q. R.: *Isolation and characterization of chloromycetin.* J. Biol. Chem., 172 : 445, 1948.

Hess, J.: *Stanovení účinnosti streptomycinu a dihydrostreptomycinu difusní metodou na kovových plotnách.* Preslia, 27 : 49, 1955.

Ishida, N., Shiratori, T., Okamoto, S., Miyazaki, J.: *Studies on the antibiotic substances from Actinomyces. XIX. On the identification of many antibiotics by paperchromatographic metod.* J. Antib., 4 : 505, 1951.

Koffler, H., Pagano, J. F.: *Paper chromatography of certain basic antibiotics and of antibacterial peptides* Abstr. of Paper 126th Meeting ACS; 1954 : 11A.

Kuroya, M., Katagiri, K., Takanashi, B., Hinuma, Y., Kamata, T., Kuroya, M., Waga, J., Takazawa, A., Watanabe, K.: *Further studies on the screening method of Streptomyces antibiotics and their application to the newly isolated Streptomyces.* J. Antib., 6(A) : 192, 1953.

Miller, R. P., Davis, N. E., Bird, H. L., Jr.: *Paper chromatography as an aid in the identification of antibiotics.* Abstr. of Paper 126th Meeting ACS; 1954 : 10A.

Oliver, T. J., Sinclair, A. C., Theriault, R. J., Zeiger, A. V.: *The use of paper chromatography for identification of antibiotics in a screening program.* Abstr. of Paper 126th Meeting ACS; 1954 : 10A.

Ševčík, V.: *Úvod do biochemické analysy mikroorganismů.* Praha 1954.

Ševčík, V.: *Produkce aktinomycinu u nového kmene aktinomycety.* Kandidátská disertační práce. Praha 1956.

Waksman, S. A.: *Actinomycin. I. Historical — nature and cytostatic action.* Antib. Chemother., 4 : 502, 1954.

Waksman, S. A., Schatz, A.: *Streptomycin — origin, nature and properties.* J. Am. Pharm. Assoc., 34 : 273, 1945.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Использование бумажной хроматографии при исследованиях новых антибиотиков

В. Шевчик, М. Подоил и А. Вртишкова

Резюме

Первоначальная форма сборной хроматограммы Ishid-а была нами видоизменена так, чтобы получаемые результаты не только служили для более точного определения неизвестного антибиотика, но и могли быть использованы при приготовлении грубых препаратов антибиотика путем экстракции из ферментационной жидкости и при их дальнейшей очистке. При восходящей хроматографии мы пользуемся следующими системами растворителей: 1. дестилл. вода; 2. 3% раствор NH_4Cl; 3. 100% метиловый спирт; 4. 100% ацетон; 5. этилацетат, насыщенный водой; 6. бутаноловый спирт, насыщенный водой; 7. эфир, насыщенный водой; 8. хлороформ; 9. бензен; 10. петрольэфир. Размеры пятен антибиотиков на хроматограмме прямо пропорциональны продолжительности диффузии антибиотика с блока агара на хроматографическую бумагу. Подвижность антибиотиков зависит от характера питательной среды. Но эта зависимость не столь велика, чтобы вызывать ошибочные заключения относительно растворимости антибиотиков в применяемых растворителях. При проявлении хроматограмм с помощью безводного n-бутанолового спирта и эфира наблюдалось образование двух видов пятен у актиномицина, эритромицина и хлорамфеникола. Сборные хроматограммы были составлены для стрептомицина (рис. 4), актиномицина B (рис. 5), хлорамфеникола (рис. 6) и антибиотика BU 607 (рис. 7). Результаты сборных хроматограмм отвечают способам изоляции указанных антибиотиков.

The Use of Paper Chromatography in Research on New Antibiotics

V. Ševčík, M. Podojil, A. Vrtišková

Summary

Ishida's original summarised chromatogram was adapted in such a manner that the results could be used not only for detailed identification of an unknown antibiotic but also in the preparation of the crude antibiotic by extraction from the fermentation fluid and possibly in its further purification. In ascending chromatography the following systems of solvents were used: 1. distilled water, 2. solution of NH_4Cl (3%), 3. methyl alcohol (100%), 4. acetone (100%), 5. ethyl acetate saturated with water, 6. n-butyl-alcohol saturated with water, 7. ethyl ether saturated with water, 8. chloroform, 9. benzene, 10. petroleum ether. The size of the spots of the antibiotic on the chromatogram depends directly on the time of diffusion from the agar block on to the chromatographic paper. The motility of antibiotics is influenced by the individual nutrient media, but their influence is not great enough to lead to wrong conclusions on the solubility of the antibiotics in the solvents used. During development of the chromatograms by means of waterless n-butyl alcohol and ether, the formation of two spots was observed in the case of actinomycin, erythromycin and chloramphenicol. Summarised chromatograms were carried out with streptomycin (fig. 4), actinomycin B (fig. 5), chloramphenicol (fig. 6) and antibiotic BU 607 (fig. 7). The results correspond to the methods of isolation used for the antibiotics in question.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Krátká původní sdělení

Křížová antibiosa u aktinomycet

VLADIMÍR MUSÍLEK

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek.

Došlo 23. 10. 1956

Z některých údajů uveřejněných Waksmanem a sp. (1946), Kuroyou a sp. (1951), Teillonem (1952, 1953) a Skrjabinem (1955) vyplývá, že určité antibiotikum nebo aktinomyceta, produkující určité známé antibiotikum, neinhibuje růst aktinomycet produkujících antibiotickou látku stejného nebo velmi příbuzného typu, ale inhibuje aktinomycety produkující antibiotika značně odlišná. Specifita tohoto principu selhávala ve zvýšené míře pouze u Teillonova kmene *Streptomyces rimosus* (Teillon 1953). Je-li platnost specifické křížové antibiosy aktinomycet obecná, mělo by její použití značný význam pro identifikaci producentů známých antibiotik při výběru aktinomycet produkujících nová antibiotika.

Při dosavadním sledování křížové antibiosy aktinomycet (Kuroya a sp. 1951, Teillon 1952, 1953, Skrjabin 1955 a j.) používalo se zejména producentů streptomycinu, streptothricinu, neomycinu, chlortetracyklinu, oxytetracyklinu a chloromycetinu, buď ve vzájemné kombinaci nebo v kombinaci s příslušnými antibiotiky.

Tab. 1. Vliv různých antibiotik na růst antibiotických aktinomycet na pevné živné půdě

Kmen	Antibiotika							
	STM	CTC	OTC	NEO	VIO	ERM	CMF	ACT
S. griseus	−	+	+	+	−	±	−	+
S. aureofaciens	+	−	−	+	+	+	+	+
S. rimosus	−	−	−	−	−	+	+	−
277	+	±	−	+	+	−	−	−
94	+	+	+	+	±	+	+	−

STM = streptomycin, 500 μg/ml, CTC = chlortetracyklin, 300 μg/ml, OTC = oxytetracyklin, 300 μg/ml, NEO = neomycin, 150 μg/ml, VIO = viomycin, 750 μg/ml, ERM = erythromycin, 200 μg/ml, CMF = chloramfenikol, 300 μg/ml, ACT = aktinomycin C, 150 μg/ml. + = růst aktinomycety inhibován; − = růst aktinomycety neinhibován. Difusní test na agarové půdě.

Ověřovali jsme specifitu křížové antibiosy s aktinomycetami *Streptomyces griseus* (producent streptomycinu), *Streptomyces aureofaciens* (producent chlortetracyklinu), *Streptomyces rimosus* (producent oxytetracyklinu), s isolátem č. 277 (producent antibiotika typu erythromycinu), s isolátem č. 94 (producent blíže neurčeného antibiotika) a s roztoky osmi antibiotik uvedených v tab. 1. Koncentrace antibiotik (viz tab. 1) jsme zvolili tak, aby přibližně odpovídaly průměrným produkcím středně produkčních kmenů příslušných aktinomycet.

Na agarovou půdu [$(NH_4)_2SO_4$ 3,5 g, kukuřičný extrakt (50 %) 10,0 g, glukosa 10,0 g, škrob 15,0 g, NaCl 5,0 g, $CaCO_3$ 5,0 g, dest. voda do 1000 ml, agar 20,0 g, pH 7,3, sterilisace 30 min. při 123 °C] v Petriho miskách jsme čárově naočkovali výše uvedené kmeny aktinomycet (3 paralelní čáry na 1 plotnu) a ve středu každé naočkované čáry jsme vyřízli korkovrtem dvůrek o průměru 6 mm. Do dvůrků jsme přidali po 0,15 ml čerstvých roztoků antibiotik. Založili jsme všechny kombinace použitých aktinomycet a antibiotik (každá kombinace ve 3 paralelních pokusech) a plotny jsme inkubovali 48 hodin při 28 °C. Po této době, která stačila k nárůstu všech použitých aktinomycet, jsme zjišťovali případný inhibiční účinek antibiotik na jednotlivé aktinomycety. Pokusy jsme třikrát opakovali se stejnými výsledky. Přehled o zjištěném vlivu použitých antibiotik na růst jednotlivých aktinomycet podává tabulka 1.

Růst kmene *Streptomyces aureofaciens* nebyl inhibován jen antibiotiky ze skupiny tetracyklinu, což souhlasí s výsledkem Teillonovým (1953). Naproti tomu růst kmene *Streptomyces griseus* nebyl inhibován ani streptomycinem, ale ani chloramfenikolem, ani viomycinem a byl inhibován velmi slabě erythromycinem. Podobně růst kmene *Streptomyces rimosus* neinhibovaly ani tetracykliny, ale ani streptomycin, neomycin, viomycin a aktinomycin C, rovněž antibiotika odlišných typů. Také kmen 277 nebyl inhibován

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

erythromycinem, oxytetracyklinem, chloramfenikolem, aktinomycinem C a byl inhibován jen velmi slabě chlortetracyklinem. Na růst kmene 94 neměl vliv aktinomycin C a velmi slabý inhibiční vliv vykázal viomycin.

Tyto výsledky dokazují, že za našich pokusných podmínek již při malém zvýšení počtu zkoušených antibiotik selhává zdánlivá specifita křížové antibiosy aktinomycet, protože některé aktinomycety jsou při růstu na agarové půdě resistentní současně vůči několika antibiotikům různých typů. Zjištění resistence neznámé antibiotické aktinomycety vůči určitému antibiotiku nemůže být tudíž vodítkem pro identifikaci aktinomycet produkujících známá antibiotika. Tuto skutečnost nutno tedy brát v úvahu při posuzování některých údajů uvedených autorů. Naše výsledky jsou mimo to v rozporu s Teillonovým předčasně zevšeobecňujícím výkladem principu křížové antibiosy aktinomycet (Teillon 1953), že totiž dvě aktinomycety produkující stejné antibiotikum se při společné kultivaci neinhibují, zatím co dvě aktinomycety produkující různá antibiotika se inhibují.

Krasilnikovem (1955) a Skrjabinem (1955) navrhovaný způsob zjišťování druhu neznámé aktinomycety je založen na předpokladu, že každý druh aktinomycety má specifické spektrum antagonistických vztahů k určitým druhům aktinomycet produkujících známá antibiotika. Naše výsledky se neshodují s výsledky Skrjabinovými (1955), pokud se týká vlivu chloramfenikolu na růst *Streptomyces griseus* a *Streptomyces aureofaciens* a vlivu streptomycinu a neomycinu na růst *Streptomyces rimosus*. Nutno uvážit, že jsme použili jiných kmenů těchto druhů aktinomycet a že místo Skrjabinem použitých „kultur na agarových blocích" jsme použili roztoků příslušných antibiotik. Přesto však ze zjištěných nesrovnalostí vyplývá nutnost ověřit předpokládanou druhovou specifitu reakce různých kmenů jednotlivých druhů aktinomycet na určitá antibiotika nebo na producenty těchto antibiotik.

Literatura

Krasilnikov, N. A.: *O klasyfikacji promieniowców wytwarzajacych antybiotyki.* Materialy z miedzynar. symp. antibiot., str. 12, Warszawa 1955.

Kuroya, M., Takahashi, B., Ishida, N., Katagiri, K., Shimizu, Y.: *Cross-inhibition among various antibiotic producing Actinomycetes belonging to the first group.* J. Antibiot. 4 : 327, 1951.

Skrjabin, G. K.: *O nekotorych zakonomernostjach vnutrividovych i mežvidovych vzajmootnošenij aktinomicetov.* Mikrobiologija 24 : 690, 1955.

Teillon, J.: *Valeur diagnostique relative de l'antibiose croisée entre Streptomyces antibiotiques.* C. R. Acad. Sci. 234 : 360, 1952.

Teillon, J.: *Identification biologique des Streptomyces producteurs d'antibiotiques.* Rev. Immunol. 17 : 41, 1953.

Waksman, S. A., Reilly, H. Ch., Johnstone, D. B.: *Isolation of streptomycin-producing strains of Streptomyces griseus.* J. Bact. 52 : 393, 1946.

Перекрестный антибиоз у актиномицетов

В. Мусилек

Резюме

Подавления роста на среде с агаром у актиномицета Streptomyces aureofaciens не вызывали только антибиотики группы тетрациклина; актиномицин С не угнетал роста точнее не определенного антибиотического лучистого грибка. С другой стороны, Streptomyces griseus, Streptomyces rimosus и точнее не определенный лучистый грибок, образующий антибиотик типа эритромицина, не подавлялись не только антибиотиками, которые эти штаммы производят — или родственными им антибиотиками, — но также и некоторыми антибиотиками совсем другого типа. Таким образом, наличие у неизвестного антибиотического лучистого грибка устойчивости по отношению к определенному антибиотику не может еще само по себе служить критерием для идентификации лучистых грибков, образующих известные антибиотики.

Cross Antibiosis in Actinomycetes

V. Musílek

Summary

Growth of the actinomycete *Streptomyces aureofaciens* on an agar medium was not inhibited only by antibiotics from the tetracycline group and an unidentified antibiotic actinomycete was not inhibited by actinomycin C. On the other hand, *Streptomyces griseus, Streptomyces rimosus* and an unidentified actinomycete producing an antibiotic of the type of erythromycin, were inhibited neither by the antibiotics produced by these strains or by similar antibiotics, nor, at the same time, by some antibiotics of an entirely different type. The finding of resistance of an unknown actinomycete to an antibiotic cannot be in itself, therefore, a guide in identifying actinomycetes producing known antibiotics.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Příspěvek k metodě barevných otisků při bioautografii

LEONTIJ ČERKES, JIŘÍ DOSKOČIL a JULIE ČERKESOVÁ

Výzkumný ústav antibiotik, Roztoky u Prahy

Došlo 15. 12. 1956

Metody bioautografie se používá s úspěchem při vyvolávání chromatogramů s vysokou biologickou účinností. Její hlavní nevýhodou ve srovnání s jinými způsoby detekce je to, že materiál nemůže být uchován pro dokumentaci jinak než překreslením nebo ve formě fotografií ploten. Překreslování zon a pořizování fotografií ploten je však značně pracné, fotografický způsob je mimo to též značně nákladný.

Jiný způsob reprodukce spočívá v tom, že se obarví a otiskne na papír plotna, na níž byl chromatogram vyvolán. Tuto metodu popisují Stephens a Grainger (1955), kteří používali 1% vodního roztoku methylenové modři s 1 % fenolu. Tímto roztokem přelili agarovou plotnu s vyvolaným chromatogramem, povrch odssáli filtračním papírem a přiložením ještě několika dalších archů papíru získali barevný otisk zon. Při tomto způsobu získání otisku jsou zony jen o něco tmavší než pozadí, se špatně ohraničenými okraji. Protože otisky získané touto metodou jsou málo kontrastní, použili jsme jiných barviv a zavedli jsme diferenciaci a fixaci barviv v bakteriích, abychom dosáhli přesných kontur zon. Volbou barviva a podmínek při barvení lze dosáhnout jak negativních zon (na otisku jsou barevná místa, kde mikroorganismus nenarostl), tak positivních (na otisku jsou zbarvena místa, kde kultura vyrostla). První způsob je vhodný pro antibiotika, druhý způsob pro růstové látky.

Metodu barevných otisků jsme vyzkoušeli na plotnách s kulturami gram-positivních i gram-negativních bakterií a některých hub. Pro testování jsme použili těchto mikroorganismů: *Bacillus subtilis* FDA 6633, *Bacillus subtilis* SD (PC-I) 220, *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, *Escherichia coli* (různé kmeny), *Rhodotorula gracilis*, *Penicillium* spec. Při získání barevných otisků inhibičních zon musíme zabránit, aby plocha porostlá kulturou netvořila na papíře barevný otisk. Toho dosáhneme dvěma způsoby: 1. Fixujeme barvivo v bakterijních buňkách, na př. Lugolovým roztokem, takže barvivo z bakterií pak nedifunduje a papír se obarví pouze barvivem difundujícím z agaru v místech, kde mikroorganismy nevyrostly. 2. Diferencujeme obarvený povrch plotny rozpustidly, na př. acetonem nebo alkoholem. Bakterie se rychle odbarví, kdežto inhibiční zony podrží barvivo déle, protože povrch agaru je rozpustidlem dehydratován a tím je difuse barviv zpomalena.

Pro získání otisku chromatogramů penicilinu vyvolaných pomocí mikroba *B. subtilis* SD (PC-I) 220 na agarové živné půdě se nám osvědčily tyto postupy:

Plotna se poleje roztokem gencianové violeti nebo krystalové violeti (nasycený alkoholický roztok krystalové violeti smíšený s 1% roztokem šťavelanu amonného v poměru 1 : 4, jehož se používá pro Gramovu metodu barvení bakterií). Po ½—1 minutě se barvivo sleje a plotna se přeleje Lugolovým roztokem. Po slití roztoku se naleje na plotnu ethanol nebo aceton, který se ponechá asi 3 minuty. K tomuto účelu nelze použít ethanolu denaturovaného pyridinovými basemi ani benzinem. Plotna se opláchne vodou a povrch se osuší filtračním papírem nebo se plotna ponechá 3—10 minut v sušárně nebo termostatu, než povrch uschne. Pro dosušení povrchu plotny lze s výhodou použít föhnu. Na povrch plotny se přiloží hladký filtrační papír, který se vyrovná rukou nebo válečkem, aby celou plochou přiléhal na agar. Místo filtračního papíru lze použít jakéhokoliv hladkého, dostatečně ssavého papíru. Inhibiční zony jsou na otisku sytě fialové na bezbarvém nebo skoro bezbarvém pozadí. Kvantitativní vyhodnocení chromatogramu se provede odměřením průměrů zon na otisku bez „odpichování" na agaru.

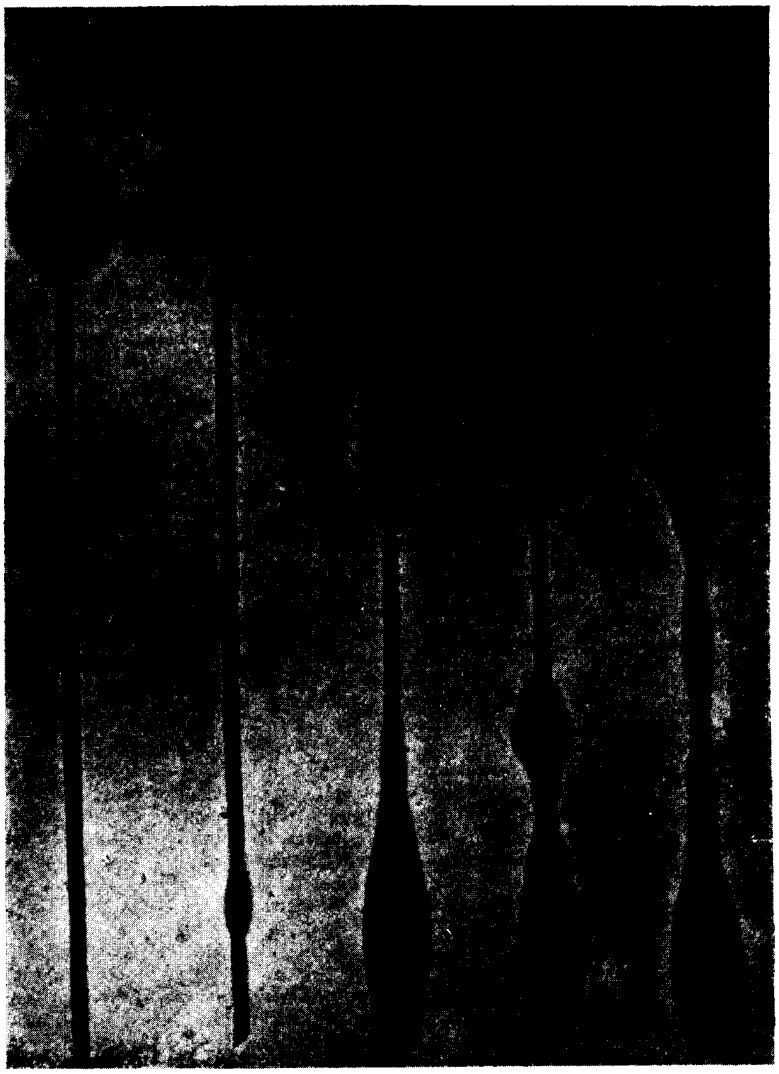
Při druhém postupu se plotna rychle přelije 1% vodným roztokem malachitové zeleně. Roztok barviva se ihned sleje a plotna se opláchne proudem vody. Dále se plotna diferencuje alkoholem (nejlépe ethanolem denaturovaným methanolem). Alkohol se ponechá na plotně 3—5 minut, sleje se a za dalších 3—5 minut se na plotnu naleje aceton. Po slití acetonu se povrch plotny usuší odssátím archem filtračního papíru nebo přímo proudem vzduchu. Na dostatečně suchý povrch se přiloží a rychle vyrovná hladký ssavý papír, stejně jako u předešlého způsobu. Otisky jsou sytě zelené na bílém nebo skoro bezbarvém pozadí. Kvantitativní vyhodnocení chromatogramu se provede přímo na otisku. Fotografie takto získaného otisku je uvedena na obrázku 1.

Mimo uvedených barviv lze s dobrými výsledky používat i jiných, jako: 1% vodného roztoku methylenové modře, okyseleného kyselinou solnou (na 100 ml roztoku asi 0,3 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové), s dalším odbarvením okyseleným a alkalickým ethanolem, 1% vodného roztoku safraninu s následující fixací Lugolovým roztokem nebo přímou diferenciací ethanolem (acetonem), 1% vodného roztoku thioninu s diferenciací kyselým ethanolem, 1% vodného roztoku sodné soli eosinu s následující diferenciací kyselým ethanolem a jiné. Pro okyselení alkoholu jsme používali většinou kyseliny octové, jejíž výsledná koncentrace byla 5%. Pro alkalické diferencování jsme používali přibližně 0,5 N-NaOH nebo KOH v ethanolu. Otisky získané za použití těchto barviv jsou velmi trvanlivé, výjimkou je methylenová modř, která časem vybledne, hlavně přímým působením světla na otisky.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Pro získání barevných otisků růstových zon je nutno volit barvivo, jež špatně proniká do agaru a barví v podstatě jen narostlou kulturu. Nejlépe se nám osvědčil 1% vodný roztok fuchsinu a Bismarkovy hnědi. Obarvené bakterie však nefixujeme, nýbrž uvolníme z nich barvivo krátkým přelitím alkoholem, acetonem nebo dioxanem. Nesmíme ovšem rozpustidlem barvivo zcela vymýt, ale musíme jím působit na povrch plotny jen zcela krátkou dobu.



Obr. 1. Fotografie barevného otisku chromatogramů penicilinů z hloubkové kultivace. Otisk pořízen diferenciací plotny obarvené malachitovou zelení.

Při reprodukci metody pořizování otisků zon při biologickém vyvolání chromatogramů tak, jak byla popsána citovanými autory, získali jsme otisky s velmi tmavým pozadím a málo ostrými okraji zon. Otisky získané naším postupem jsou velmi kontrastní s přesně ohraničenými okraji zon. Ostré kontury zon dovolují kvantitativní vyhodnocení chromatogramů přímým odměřením průměrů zon na otisku bez pracného „odpichování" zon na agarové plotně. Toto vyhodnocení může být provedeno kdykoliv, což má zvláštní výhodu při zpracování větších serií chromatogramů. Metoda otisků v původním provedení a v naší úpravě je velmi rychlá a při větším počtu ploten s vyvolanými chromatogramy může být barvení prováděno v seriích.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Literatura

Stephens, J., Grainger, A.: *Paper chromatography of penicillin*. J. Pharm. Pharmacol. 7 : 702, 1955.

К вопросу методики цветных отпечатков при биоавтографии

Л. Черкес, И. Доскочил и Ю. Черкесова

Резюме

Разработана модификация метода получения цветных отпечатков с агара с биологически проявленными хроматограммами. С помощью новой модификации метода можно получать отпечатки зон угнетения и стимуляции роста тест-микроба. Существуют 2 способа изготовления отпечатков зон угнетения: фиксация красителя в разросшейся культуре (чтобы краситель просачивался в приложенную к агару бумагу только в тех местах, где агар свободен от пленки микроорганизмов) — и дифференциация окрашенного агара при помощи растворителей. При втором способе — дифференциации — краситель смывается только с пленки микроорганизмов. Для получения отпечатков зон роста выбирается краситель, который плохо проникает в агар. Из окрашенной культуры краситель освобождается потом после непродолжительного действия растворителя. Метод применялся для грам-положительных и грам-отрицательных бактерий и грибков. Отпечатки пластинок с проявленными хроматограммами отличаются резко очерченными контурами, что делает возможной в любое время количественную оценку хроматограмм путем простого измерения диаметра зон угнетения на отпечатках. Описанный метод устраняет трудоемкое срисовывание проявленных хроматограмм и фотографирование агара для документации. Простота и быстрота метода дает возможность серийной окраски. Устойчивость цветных отпечатков зависит от применяемого красителя, но в большинстве случаев практически не ограничена.

Notes on a Method of Colour Prints in Bioautography

L. Čerkes, J. Doskočil, J. Čerkesová

Summary

A modification of a method of making colour prints of agar plates with biologically developed chromatograms was elaborated. In the new modification this method makes it possible to obtain prints of the zones of growth inhibition and stimulation in the test micro-organism. When making prints of inhibition zones, two methods come into consideration: fixatin of the stain in grown up culture in such a way that the stain diffuses into the paper only at the sites where the agar is not covered with a film of micro-organism, and differentiation of the stained plate by means of solvents. With the second method (differentiation) the stain is washed out from the film of micro-organism only. When making prints of growth zones, a stain is selected which only with difficulty penetrates into the agar. The stain is then removed from the culture by subjecting it briefly to the action of a solvent. The method has been applied to Gram positive and Gram negative bacteria and to fungi. Prints of plates with developed chromatograms show sharp outlining of the zones, thus permitting a quantitative evaluation of the chromatograms at any time by direct measurement of the diameter of the zones on the print. This method abolishes the tedious re-tracing of the chromatograms or photographing the plates for purposes of documentation. The simplicity and rapidity of the method make it possible to carry out the staining in series. The durability of the colour prints depends on the stain used, but in most cases it is unlimited.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Sledování fágového antigenu během rozmnožování fága v infikované bakterii

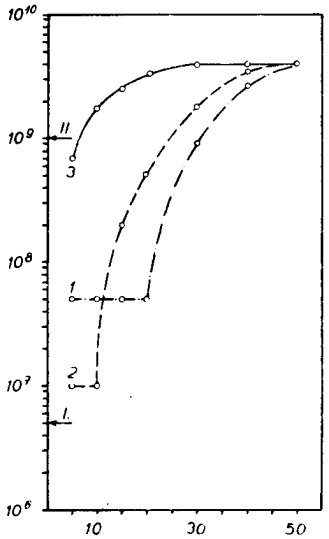
LUDMILA SOŠKOVÁ

Ústav pro obecnou biologii, lékařská fakulta university v Brně

Došlo 27. 7. 1956

Po infekci vnímavé bakterie virulentním fágem, během t. zv. latentní periody, se fág rozmnožuje uvnitř hostitelské buňky, ale nedochází ještě k jeho uvolňování. Fágový antigen byl během latentního období sledován v několika pracích (Doermann 1947, 1951, Rountree 1951, De Mars a sp. 1953, Lanni 1954). Autoři se shodují v tom, že dříve, než se objeví infekční fág, přibývá fágového antigenu. Abychom tyto výsledky ověřili na jiném materiálu, konali jsme pokusy s bakteriemi *Shigella flexneri* II a shigellovým fágem D.

K pokusům jsme použili bakterií *Shigella flexneri* II, kmen č. 12, který byl isolován z klinického materiálu a sbírkového kmene shigellového fága D. Fága i bakterie jsme pěstovali v masopeptonovém bujonu o pH 7,4—7,6. Fágové preparáty o průměrném titru $5 . 10^9$ v ml jsme získali opakovaným pasážováním fága na mladých bakteriích. Fága jsme titrovali na agarových půdách počítáním plaků. Antifágové serum jsme získali imunisací králíků bujonovými filtráty fága (průměrný titr $5 . 10^9$ v ml). Před použitím bylo serum vysyceno hostitelskými bakteriemi. Fágový antigen jsme sledovali vazbou komplementu (Blaškovič a sp. 1954). Vazby jsme prováděli se stoupajícím ředěním antigenu a konstantním ředěním sera



Obr. 1. Intracelulární růst fágového antigenu a zralého fága. Osa x: minuty po infekci, osa y: počet plaků nebo jejich ekvivalent; 1 — kontrolní normální lysa fágem infikovaných bakterií (bez kyanidu), 2 — titr infekčního fága v kyanidových lysátech, 3 — titr antigenu v kyanidových lysátech vyjádřený v titru fága jako ekvivalent serologické aktivity. Hladina neadsorbovaného fága je označena šipkou I, titr původního přidaného fága a antigenu šipkou II.

(1 : 10). Jako positivní jsme hodnotili zkumavku, ve které byla zábrana na 1 křížek. V našem případě došlo k zábraně s použitým antifágovým serem až do zředění 1 : 384. V čerstvě připravených lysátech, ve kterých nedošlo ještě k inaktivaci fága, je titr antigenu v přímém vztahu k titru infekčního fága (Rountree 1951). Ve svých pokusech jsme přepočítávali titr antigenu na titr infekčního fága tak, že jsme za konstantních podmínek zřeďovali fága o známém titru a zjišťovali vazbou komplementu, v jakém zředění fága došlo k zábraně. Přímou úměrou jsme vypočítali, jakému titru fága odpovídá titr antigenu. Pro správnost výpočtu svědčí, že po dokončení fagolysy splývají křivky infektivity a serologické aktivity (obr. 1). Fágem infikované bakterie jsme v určitých intervalech během latentní periody rozbíjeli kyanidem draselným podle Doermanna (1947). Kyanid draselný v koncentraci 0,02 M rozbíjí bakterijní buňky a nepoškozuje volné fágové částice. Do baňky s 80 ml bujonového filtrátu fága o titru $1,5 . 10^9$ v ml byly přidány mladé bakterie do výsledné koncentrace $7,5 . 10^8$ v ml. Výslednou suspensi jsme inkubovali při 37 °C. V různých intervalech jsme odebírali vzorky (10 ml) a další průběh fagolysy jsme zastavovali ochlazením na 0 ° až 1 °C. Vzorky jsme centrifugovali v lednici při 0 ° až 2 °C a propírali fysiologickým roztokem. V supernatantu jsme určovali titr neadsorbovaného fága. Bakterie z jednotlivých vzorků jsme potom opět suspendovali v 1 ml bujonu, obsahujícím 0,02 M-KCN. V lysujícím prostředí jsme ponechávali bakterie 45 minut při 37 °C, potom lehce zcentrifugovali, aby se odstranila bakterijní drť, v supernatantu stanovovali titr infekčního fága a titr antigenu. Jako kontrol jsme použili jednak bakterií, které nebyly infikovány fágem, jednak infikovaných bakterií nerozrušených kyanidem.

Výsledky pokusu jsou znázorněny na obr. 1. Kontrolní normální lysa fágem infikovaných bakterií (bez kyanidu) má latentní období asi 20 minut, po němž následuje 15 minut trvající vzestupná fáze, kdy dochází k uvolňování fága a konečný výtěžek v 50. minutě je $3 . 10^9$ v ml. Lysa fágem infikova-

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

ných bakterií, vyvolaná kyanidem, má kratší latentní období — 10 minut, po kterém následuje prodloužená vzestupná fáze trvající 40 minut. Konečný výtěžek infekčního fága je stejný jako v kontrole. Během latentního období klesá titr infekčního fága až na 1 % původní hodnoty, tedy prakticky k nule. Fág krátce po adsorpci na bakterie ztrácí svoji infektivitu. Po 10 minutách se objevuje v bakteriích nově utvořený infekční fág a jeho titr stoupá. Titr fágového antigenu v kyanidových lysátech je po 5 minutách nižší, než odpovídá titru původně přidaného fága; potom prudce stoupá až do 30. minuty, kdy dosahuje maxima (dvakrát vyšší hladina než odpovídá v té době titru infekčního fága v kyanidových lysátech). Na této hladině se udržuje až do konce latentního období. Titr fágového antigenu, tedy po počátečním mírném poklesu (asi 25 %) náhle stoupá, a to o 5 minut dříve, než se objevil infekční fág. Nově utvořený fágový antigen dosahuje také dříve vyšší hladiny než infekční fág. Produkce antigenu neustává, dokud uvolňování infekčního fága není skončeno. Konečný titr antigenu odpovídá konečnému titru infekčního fága.

Materiál s fágovou antigenní specifitou, který se objevuje během latentního období dříve, než se objeví aktivní fág, popsal Foster (1948) v infikovaných buňkách, lysovaných proflavinem. De Mars a sp. (1953) zjistili v těchto proflavinových lysátech přítomnost bezbičíkatých částic, jež dávají vazbu komplementu s příslušným antifágovým serem. Obsah nukleových kyselin v těchto částicích je nižší než ve zralém fágu. Kulaté bezbičíkaté částice s nižším obsahem nukleinové kyseliny jsou tedy v úzkém vztahu ke zralému fágu. Také elektronové snímky Herčíkovy (1950, 1951) ukazují, že dříve než se objeví infekční částice, jsou viditelné kulaté bezbičíkaté elementy, které mizí, jakmile se utvoří infekční fág. Naše pokusy potvrzují správnost hypotesy, že produkce zralého fága probíhá přes stadium produkce neinfekčních, serologických aktivních elementů. K podobným závěrům došli také Rountreeová (1951) a Lanni (1954) s fágem T 5. Oba autoři se rozcházejí v údajích o tom, zda fág po adsorpci na bakterii ztrácí nejen infektivitu, ale i serologickou aktivitu. V našich pokusech došlo krátce po adsorpci ke snížení titru antigenu asi o 25 %. Křivka, která znázorňuje průběh hladiny fágového antigenu v kyanidových lysátech, odpovídá spíše výsledkům Rountreeové (1951), podle které ztrácí fág krátce po adsorpci nejen infektivitu, ale také serologickou aktivitu, a po určitou dobu ho nelze v infikované buňce prokázat.

Literatura

Blaškovič, D. a spol.: *Laboratorné metody vo virologii.* Bratislava 1954.

Doermann, A. H.: *The intracellular growth of bacteriophages.* Carnegie Inst. of Wash. Year Book. 47 : 176, 1947.

Doermann, A. H.: *Liberation of intracellular bacteriophage T 4 by premature lysis with another phage or with cyanide.* J. Gen. Physiol. 35 : 455, 1951.

De Mars, R. I., Luria, S. E., Fisher, H., Lewinthal, C.: *The production of incomplete bacteriophage particles by the action of proflavin and the properties of the incomplete particles.* Ann. Inst. Pasteur. 84: 113, 1953.

Foster, R. A. C.: *A analysis of the action of proflavin on bacteriophage growth.* J. Bact. 56 : 795, 1948.

Herčík, F.: *Elektronová mikroskopie bakteriofága.* Čas. lék. čes. 89 : 91, 1950.

Herčík, F.: *Struktura bakteriofága.* Čas. lék. čes. 90 : 925, 1951.

Lanni, Y. T.: *Infection of bacteriophage T 5 and its intracellular growth-study by complement fixation.* J. Bact. 67 : 640, 1954.

Rountree, F. M.: *A complement fixing antigen of Bact. coli bacteriophages T 5—its behaviour during virus growth.* Brit. J. Exp. Pathol. 32 : 341, 1951.

Исследования фагового антигена в течение размножения фага в зараженной бактерии

Л. Сошкова

Резюме

Бактерии Shigella flexneri II, зараженные фагом D, разрушались в течение латентного периода в коротких интервалах с помощью цианистого калия. В полученном материале мы определяли путем связывания комплемента присутствие фагового антигена, а путем титрации на средах с агаром — присутствие зрелого инфекционного фага. В зараженных бактериях фаговый антиген появляется раньше, чем инфекционный фаг.

The Study of Phage Antigen in the Course of Proliferation of Phage in Infected Bacteria

L. Sošková

Summary

Bacteria of *Shigella flexneri II*, infected with phage D, were disrupted at short intervals during the latent period with potassium cyanide. In the material released, the presence of phage antigen was determined by the complement fixation reaction and the presence of mature active phage was determined by titration on agar media. In infected bacteria, during the latent period, the phage antigen appears before the mature infectious phage particle.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Granulární struktury u mykobakterií, korynebakterií a neacidoresistentního kmene získaného při přeměně tuberkulosních mykobakterií

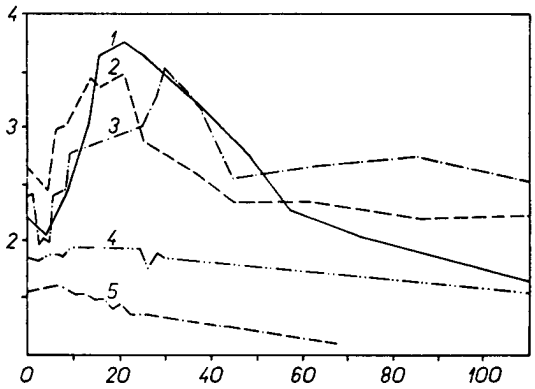
JOSEF HUBÁČEK a IVAN MÁLEK

Mikrobiologické oddělení, Biologický ústav, Československá akademie věd, Praha

Ředitel ústavu akademik Ivan Málek

Došlo 3. 12. 1956

Jednou z vlastností mykobakterií je tvorba acidoresistentních, grampositivních granul umístěných polárně nebo po celé délce tyčinky. Jejich chemické složení a funkční význam byl sledován v mnoha pracích (Lominski 1933, Málek a Šterzl 1948, Knaysi, Hillier, Fabricant 1950, Werner 1951, Bassermann 1953). Granula jsou v mykobakterijní buňce nejvíce vytvářena ve 12—14hodinové kultuře (Fenner, Leach 1953). Poněvadž tento zjev nebyl pozorován u jiných skupin mikroorganismů, snažili jsme se využít této vlastnosti ke zjištění možného vztahu mezi mykobakteriemi, systematicky blízkými korynebakteriemi a neacidoresistentními kmeny získanými při přeměně tuberkulosních mykobakterií (Málková 1954). Sledovali jsme tvorbu granul u neacidoresistentního kmene kM, *Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Rv$, *Mycobacterium phlei*, *Corynebacterium diphteriae* typus *mitis* a vzdušného *Pseudocorynebacterium*. Preparáty získané v určitých časových intervalech růstu kultury byly barveny Giemsou podle modifikované metody Piekarskiho-Robinowa (Málek a Šterzl 1948).



Obr. 1. Granulární struktury mykobakterií, korynebakterií a kmene kM během stárnutí kultury. Osa x: stáří kultury, osa y: průměr granul ze 100 tyčinek (x_{100}). 1 — granulární struktury u *Mycobacterium phlei*, 2 — granulární struktury u *Mycobacterium tuberculosis* ($H_{37}Rv$), 3 — granulární struktury u kmene kM, 4 — granulární struktury u *Pseudocorynebacterium*, 5 — granulární struktury u *Corynebacterium diphteriae* typus *mitis*.

Dále jsme zjišťovali chemické složení granulární substance u neacidoresistentního kmene kM a pro srovnání s tímto kmenem jsme použili vzdušného pseudokorynebakteria. Přitom část preparátů byla extrahována a barvena podle Grama, Ziehl-Neelsena a podle Neissera; další preparáty byly extrahovány, hydrolysovány a barveny podle Grama, Ziehl-Neelsena a podle Piekarskiho-Robinowa; zbylé preparáty byly nejdříve hydrolysovány a pak teprve extrahovány a barveny podle Grama, Ziehl-Neelsena, Neissera a podle Piekarskiho-Robinowa. Výsledky jsou uvedeny na obrázku 1 a v tabulce 1.

Z výsledků uzavíráme, že přeměněný kmen se tvorbou granul velmi podobá různým druhům mykobakterií a liší se podstatně od korynebakteria patogenního i vzdušného. Typický vrchol maximálního počtu granul u *Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Rv$, *Mycobacterium phlei* a neacidoresistentního kmene kM je v rozmezí 12—25hodinové kultury. U neacidoresistentního kmene kM byl zjištěn dvojí druh granul: jedny acidoresistentní, barvící se Neisserem a rozpustné v 0,1 N-HCl (metachromatická granula),

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

druhé neacidoresistentní, nerozpustné v 0,1 N-HCl ani při další extrakci a barvící se podle Piekarskiho-Robinowa (jaderný aparát). Některé tyčinky obsahují jedno acidoresistentní granulum (obyčejně umístěné polárně) a 1—3 neacidoresistentní granula, jiné jen neacidoresistentní granula.

Tab. 1. Cytochemické složení granulární struktury v buňkách pseudokorynebakteria a neacidoresistentního kmene kM, získaného při přeměně *Mycobacterium tuberculosis*. Hodnoty vyjadřují průměrný počet granul na jednu tyčinku.

Zpracování preparátů	Gram	Průměrný počet granul při různých způsobech barvení			
		Ziehl-Neelsen		Neisser	Piekarski-Robinow
		acidores. granula	neacidores. granula		
neacidoresistentní kmen kM					
Kontrola	G+	1,0	1,66 ± 0,055	1,03 ± 0,017	
Po extrakci	G+	1,0	1,71 ± 0,032	1,0	
Po extrakci a hydrolyse	G+	0	1,76 ± 0,020	0	1,71 ± 0,045
Po hydrolyse a extrakci	G+	0	1,73 ± 0,046	0	1,68 ± 0,046
Pseudocorynebacterium					
Kontrola.	G+	2,32 ± 0,077	0	2,33 ± 0,052	
Po extrakci	G+	2,31 ± 0,069	0	2,34 ± 0,041	
Po extrakci a hydrolyse	G−	0	2,34 ± 0,071	0	0
Po hydrolyse a extrakci	G−lab.	0	2,37 ± 0,049	0	0

Literatura

Bassermann, F. J.: *Die Volutin Nukleinsäure-Komplexe in Mykobakterien und ihre Beziehung zu kernäquivalenten Strukturen.* Zschr. Tbc. 103 : 193, 1953.

Fenner, F., Leach, R. H.: *The growth of mammalian tubercle bacilli in Tween—albumin liquid medium. I. Observations on the proportion of viable organisms, the cytology and the virulence of bacilli at different stages of growth of strain $H_{37}Rv$.* Am. Rev. Tbc. 68 : 321, 1953.

Knaysi, G., Hillier, J., Fabricant, C.: *The cytology of an avian strain of mycobacterium tb studied with the electron and light microscopes.* J. Bact. 60 : 423, 1950.

Lominski, I.: *Beitrage zum Studium des Tuberkelbazillus.* Zbl. Bact., Par., Inf. Krank. 128 : 276, 1933.

Málek, I., Šterzl, J.: Jaderná hmota u mykobakterií tb. Sborník lék. 5 : 50, 278, 1948. *Les substances nucléaires du bacille tuberculeux.* Compt. rend. Soc. Biol. 142 : 1053, 1948.

Málková, J.: *Řízená proměnlivost mykobakteria tuberkulosy.* Čs. biologie 3 : 70, 1954.

Werner, G. H.: *La cytologie des bacilles tuberculeux étudiée en relation avec leurs caractères de virulence.* Presse Med. 59 : 1043, 1951.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Зернистые структуры у микобактерий, коринебактерий и некислотоустойчивого штамма, полученного в результате изменений микобактерий туберкулеза

И. Губачек и И. Малек

Резюме

Определялось соотношение между количеством зернистости в клетке и возрастом культуры Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium phlei, Corynebacterium diphteriae typus mitis, Pseudocorynebacterium из воздуха и некислотоустойчивого штамма кМ, полученного в результате изменений Mycobacterium tuberculosis. Далее химически определялся состав зернистости у штамма кМ, полученного в результате превращения Mycobacterium tuberculosis в некислотоустойчивую форму и было доказано наличие в клетке зернистости двух видов: одной — ядерного характера и другой — метахроматического характера.

Granular Structures in *Mycobacteria, Corynebacteria* and a Non-acid-fast Strain Obtained during Conversion of *Mycobacterium tuberculosis*

J. Hubáček, J. Málek

Summary

The relationship between the quantity of granules in the cell and the age of the culture was determined in *Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium phlei, Corynebacterium diphtheriae* typus *mitis*, a pseudocorynebacterium obtained from the air and the non-acid-fast strain kM obtained during conversion of *Mycobacterium tuberculosis*. The cytochemical structure of the granules was also determined in the strain kM obtained during conversion of *Mycobacterium tuberculosis* into a non-acid-fast form and the presence of two types of granules in the cell was demonstrated, one of a nuclear character, the other of a metachromatic character.

Vydává Biologický ústav Československé akademie věd v Nakladatelství Čs. akademie věd, Vodičkova 40, Praha II. Adresa redakce: Biologický ústav ČSAV, Na cvičišti 2, Praha XIX. Administrace: Nakladatelství Čs. akademie věd, Vodičkova 40, Praha II, tel. 246241. Účet Státní banky československé č 438-214-0087, číslo směrovací 0152-1. Snížený poplatek povolen výměrem č. 313-400-Be-55. Dohledací poštovní úřad **Praha 022.** Tisknou a expedují: Pražské tiskárny, n. p., provozovna 04, Praha XIII, Sámova 12. Vyšlo v červnu 1957. - A-03876

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Издается Биологическим институтом Чехословацкой Академии наук в Издательстве Чсл. Академии наук. Выходит 6 раз в год. Заказы: Артия, Смечки 30, Прага II, Чехословакия

СОДЕРЖАНИЕ

Штерцль Я., Трнка З.: Ускорение образования у молодых животных антител с помощью больших доз антигена и влияние этого вмешательства на реакцию на ревакцинирование во взрослом состоянии 129
Ржига И.: Действие противобактерийных антител в организме с измененным состоянием реактивности. I. Наркотический сон и инфекция Salmonella paratyphi B у белых крыс 137
Ивани Ю., Ивани П., Томашкова М.: Разделение изоагглютининов при бумажном электрофорезе и показатели гамма глобулина в сыворотках с крайне высоким титром . . 145
Йогановский И.: Значение дельта лизина для патогенности стафилококков 151
Сошкова Л.: Индукция фага у бактерий Shigella flexneri II цианистым калием 157
Шевчик В.: Характер фенолоксидазы актиномицета Streptomyces antibioticus и влияние поверхностно-активных веществ на определение его активности 162
Чапек А., Ганч О., Павлу Г.: Изменения стероидов микробами. VI. Изучение изменений стероидов штаммами рода Aspergillus 168
Шевчик В., Подоил М., Вртишкова А.: Использование бумажной хроматографии при исследованиях новых антибиотиков 175

Краткие сообщения

Мусилек В.: Перекрестный антибиоз у актиномицетов 183
Черкес Л., Доскочил И., Черкесова Ю.: К вопросу методики цветных отпечатков при биоавтографии 185
Сошкова Л.: Исследования фагового антигена в течение размножения фага в зараженной бактерии 188
Губачек И., Малек И.: Зернистые структуры у микобактерий, коринебактерий и некислотоустойчивого штамма, полученного в результате изменений микобактерий туберкулеза 190

Published by Biologický ústav Československé akademie věd at Nakladatelství Čs. akademie věd. Yearly issue 6 numbers. Agents: Artia, Smečky 30, Praha II, Czechoslovakia

CONTENTS

Šterzl J., Trnka Z.: Acceleration of Antibody Formation in Young Animals by Large Doses of Antigen and the Influence of This on the Revaccination Response in Adult Life 129
Říha I.: The Action of Antibacterial Antibodies in an Organism with a Changed State of Reactivity. I. Narcotic Sleep and Infection with Salmonella paratyphi B in White Mice 137
Iványi I., Iványi P., Tomášková M.: Separation of Isoagglutinins in Paper Electrophoresis and Values of Gamma Globulin in Serum with an Extremely High Titre 145
Johanovský J.: The Significance of Delta Lysin for Pathogenicity of Staphylococci 151
Sošková L.: Induction of Phage in Bacteria of Shigella flexneri II by Cyanide 157
Ševčík V.: The Character of Phenol Oxidase of the Actinomycete Streptomyces antibioticus and the Influence of Surfaceactive Substances on Determination of Its Activity 162
Čapek A., Hanč O., Pavlů H.: Bacterial Conversion of Steroids. VI. A Study of the Conversion of Steroids by Strains of the Genus Aspergillus 168
Ševčík V., Podojil M., Vrtišková A.: The Use of Paper Chromatography in Research on New Antibiotics 175

Brief Reports

Musílek V.: Cross Antibiosis in Actinomycetes 183
Čerkes L., Doskočil J., Čerkesová J.: Notes on a Method of Colour Prints in Bioautography 185
Sošková L.: The Study of Phage Antigen in the Course of Proliferation of Phage in Infected Bacteria 188
Hubáček J., Málek I.: Granular Structures in Mycobacteria, Corynebacteria and a Non-acid-fast Strain Obtained during Conversion of Mycobacterium tuberculosis 190

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6

NAKLADATELSTVÍ ČESKOSLOVENSKÉ AKADEMIE VĚD

doporučuje:

Cejp K.: **HOUBY I.**

První díl vysokoškolské učebnice, která je také určena jako příručka mykologie biologickým pracovníkům v praxi. Je v něm zpracován kmen hlenek (slizek), z kmene hub pak houby nižší a celé houby vřeckaté, u nichž jsou probrána i stadia imperfektní. Autor věnuje pozornost též způsobu jejich rozmnožování, jejich rozšíření a způsobu života a nezapomíná ani na praktický význam hub v přírodě a ve společnosti, jmenovitě ve fytopathologii a v průmyslu. Kniha obsahuje také slovníček morfologických a biologických termínů a je doplněna četnými obrázky.

Str. 469, obr. 114, příl. 8, váz. Kčs 43,70.

Jirásek V., Zadina R., Blažek Z.: **NAŠE JEDOVATÉ ROSTLINY**

Neobyčejně krásně zpracovaná publikace je velkým přínosem pro všechny vědecké pracovníky, kteří potřebují poučení i rychlou informaci o našich jedovatých rostlinách po všech stránkách. V úvodní všeobecné části vysvětlují autoři pojem jedu, mluví o jeho účincích, o příznacích otravy a o první pomoci při otravě, o různých jedovatých látkách obsažených v našich rostlinách, o jejich užitkovosti a o jedovatých rostlinách chráněných. Speciální část probírající více než 300 našich jedovatých rostlin obsahuje kromě přehledu starších a dialektických názvů českých a etymologického výkladu jmen latinských popis každého druhu, charakter stanoviště, výskyt v ČSR a celkové rozšíření. Třetí část tvoří 120 barevných tabulí podle originálů L. Jiřincové.

Str. 332, barev. tab. 120, váz. Kčs 93,50.

KLÍČ ZVÍŘENY ČSR II.

Druhý díl souborného klíče naší zvířeny, který svým rozsahem leží uprostřed mezi obvyklými kapesními určovacími klíči a obsáhlými kompendii světové literatury. V tomto svazku jsou zpracováni třásnokřídlí, blanokřídlí, řasnokřídlí a brouci. Klíč je doplněn četnými ilustracemi. Má význam i po stránce terminologické, poněvadž významné rody a druhy živočišné jsou opatřeny českými názvy.

Str. 748, obr. 1934, váz. Kčs 61,—.

Obenberger J.: **ENTOMOLOGIE III. — SYSTEMATICKÁ ČÁST 2.**

Tento svazek je organickým pokračováním dílu druhého a zpracovává tři hmyzí řády: všenky-MALOPHAGA, vši-ANOPLURA a hmyz stejnokřídký-HOMOPTERA. Zvláště podrobně jsou probrány hospodářsky významné řády hmyzu stejnokřídlého, mezi nimiž je mnoho přenašečů různých rostlinných chorob a škůdců našeho polního, lesního i zahradního hospodářství, jako křísi, molice, mery, mšice a červci. Látka je zpracována přístupně a co možno srozumitelně, aby i nesnadnější partie byly přiblíženy. Čtvrtý svazek ENTOMOLOGIE je v tisku a na pátém se pracuje. Celé dílo bude dokončeno nejpozději v roce 1960. Je určeno pro naši mladou generaci entomologů, pracovníkům soukromým, universitním, i odborníkům v laboratořích.

Str. 468, obr. 409, váz. Kčs 43,—.

Uvedené knihy možno koupit nebo objednat v každé prodejně n. p. KNIHA

nebo přímo v prodejně nakladatelství, Praha II, Václavské nám. 34.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500009-6