

## **Einwirkung einiger Carbonylreagentien auf das Virus der Maul- und Klauenseuche (MKS)**

Auf der Suche nach Substanzen, die infektiöse Ribonucleinsäure (RNS) tierischer Viren stabilisieren könnten, fanden FRANKLIN und WECKER<sup>1</sup>, dass Hydroxylamin die infektiöse RNS aus Mäuseencephalitis-Virus inaktivierte und ebenso das intakte Virus der klassischen Geflügelpest, der Schweineinfluenza und der Pferdeencephalomyelitis (West-Typ). Unter gleichen Versuchsbedingungen konnte aber andererseits zum Beispiel beim Virus der atypischen Geflügelpest (New Castle Disease), des Mumps und des Herpes simplex durch Hydroxylamin keine Einbusse der Virulenz festgestellt werden.

Auf Grund ausgedehnter Untersuchungen schlossen die genannten Autoren, dass Hydroxylamin an der RNS angreift – in welcher Weise blieb ungeklärt – und nicht am Proteinanteil des Virus. Die Befunde vor allem aber, dass bei der Inaktivierung gewisser Viren durch Hydroxylamin die antigenen Eigenschaften, wie die der Komplementbindung und der Hämagglutination, unverändert weiterbestehen blieben, gab zu den hier mitgeteilten Untersuchungen Anlass. Diese sollten feststellen,

a) ob das durch Hydroxylamin inaktivierte Virus auch noch immunitätserzeugende Fähigkeiten aufweist, und

b) ob gegebenenfalls andere Carbonylreagentien vom Typus des Hydroxylamins, wie Hydrazin und Semicarbazid, auch zu dieser spezifischen Wirkung auf das Virus fähig sind.

Bei unseren Versuchen beschränkten wir uns auf das Virus der MKS. Die meisten Versuche wurden mit dem O-Typ ausgeführt, doch kamen bei einigen auch die Typen A und C zur Anwendung, da von vorneherein nicht ausgeschlossen werden konnte, dass das durch Hydroxylamin inaktivierte Virus je nach Typ etwas andere immunogene Eigenschaften (zum Beispiel in qualitativer oder in quantitativer Beziehung) aufweisen könnte.

Für die Bereitung der Virussuspensionen benützten wir Zungenaphthen (Blasendecken) von künstlich mit MKS-Virus infizierten Rindern. Das fein zerkleinerte Material wurde in gepufferter Kochsalzlösung vom pH 7,5 (50 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 144 g NaCl auf 20 l  $\text{H}_2\text{O}$ ) aufgenommen und 10 min zentrifugiert (8000 T/min) (1 g Zungenepithelien + 10 ml Kochsalzlösung = Virus-suspension  $1 \cdot 10^{-1}$ ).

*Methodik der Inaktivierung.* Die Carbonylreagentien wurden als Hydrochloride eingewogen und jeweils unter Zusatz von Natronlauge in 2-molare Lösungen vom pH 7,5 gebracht. Diese Lösungen wurden mit dem gleichen Volumen Virussuspension 26 h bei 20° stehengelassen. Da die verwendeten Carbonylreagentien starke Blutgifte darstellen, wurden sie nach vollzogener Inaktivierung durch 24stündige Dialyse gegen Leitungswasser entfernt.

**Ergebnisse.** Hydroxylamin, nicht aber die beiden andern oben erwähnten Carbonylreagentien, vermochte in der angegebenen Versuchsanordnung schon nach 15 min Einwirkungsduer die Standard-Virussuspension, wenn auch nicht vollständig, so doch grösstenteils, apathogen zu machen. (Die Einwirkungsduer lässt sich leider nicht scharf bemessen. Man kann lediglich die Reaktionsschwindigkeit durch Verdünnen der Versuchslösung mässigen. Wir haben dies durch Hinzufügen des 4fachen Volumens an gepufferter Kochsalzlösung (siehe oben) und anschliessende Dialyse getan.) – Bei 26–40 h dauernder Einwirkung konnte auch mit Hydrazin und Semicarbazid in allen Fällen eine restlose Inaktivierung erzielt werden. Die mit derart inaktiviertem Virus immunisierten Meerschweinchen erwiesen sich ohne Ausnahme als geschützt.

Nr. des Tieres	Resultat der Infektion nach			
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag
Am 3. 12., 12. 12. und am 16. 12. 59 wurden den Meerschweinchen Nr. 16071 - 16081 je 0,5 ml mit Hydrazin inaktiviertes MKS-Virus, Typ C, in die Kniestafel eines Hinterbeins injiziert. Am 20.12. wurden sämtliche Tiere inklusive die Kontrolltiere Nr. 16082 bis 16086 mit virulentem Virus, Typ C (Konzentration $0,2 \cdot 10^{-2}$ ) in beide Hinterpfoten intrakutan infiziert.	16071	○	○	↙
	16072	○○○	○○○	↙○
	16073	○○○○	○○○○	↙○○
	16074	○○○○○	○○○○○	↙○○○○
	16075	○○○○○○	○○○○○○	↙○○○○○○
	16076	○○○○○○○	○○○○○○○	↙○○○○○○○
	16077	○○○○○○○○	○○○○○○○○	↙○○○○○○○○
	16078	○○○○○○○○○	○○○○○○○○○	↙○○○○○○○○○
	16079	○○○○○○○○○○	○○○○○○○○○○	↙○○○○○○○○○○
	16080	○○○○○○○○○○○	○○○○○○○○○○○	↙○○○○○○○○○○○
	16081	○○○○○○○○○○○○	○○○○○○○○○○○○	↙○○○○○○○○○○○○
	16082	○○○○○○○○○○○○○	○○○○○○○○○○○○○	↙○○○○○○○○○○○○○
	16083	○○○○○○○○○○○○○○	○○○○○○○○○○○○○○	↙○○○○○○○○○○○○○○
	16084	○○○○○○○○○○○○○○○	○○○○○○○○○○○○○○○	↙○○○○○○○○○○○○○○○
	16085	○○○○○○○○○○○○○○○○	○○○○○○○○○○○○○○○○	↙○○○○○○○○○○○○○○○○
	16086	○○○○○○○○○○○○○○○○○	○○○○○○○○○○○○○○○○○	↙○○○○○○○○○○○○○○○○○

gegen eine generalisierende Krankheit, wenn sie mit dem homologen Virustyp infiziert wurden, während es bei den Kontrolltieren in rund 75% der Fälle zu einer generalisierenden MKS kam<sup>2</sup>. – Die erzeugte Immunität ist streng typspezifisch, das heißt Meerschweinchen, die mit inaktiviertem C-Virus immunisiert worden waren, erkrankten ohne Ausnahme an einer generalisierenden MKS nach Infektion mit dem Virus des O-Typs. – Bei der Mehrzahl der Meerschweinchen konnte schon nach zweimaliger subkutaner Injektion mit inaktiviertem Virus eine Immunität hervorgerufen werden, während eine einmalige Injektion nur eine Teilmimmunität hervorzurufen vermochte. Als ganz ungenügend zur Immunisierung erwies sich eine einmalige intrakutane Applikation des inaktivierten Virus in die Planten. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, dass bei dieser Art der Impfung jeweils nur sehr kleine Mengen des Antigens inkorporiert werden können. In der Tabelle ist ein typisches Beispiel unserer Inaktivierungs- und Immunisierungsversuche wiedergegeben.

**Diskussion.** FRAENKEL-CONRAT *et al.*<sup>3</sup> haben in jüngster Zeit die Ansicht geäussert, dass dasjenige Virus-Antigen zur Erzeugung einer Immunität als das idealste zu bezeichnen wäre, das bei völlig intaktem Proteinanteil inaktivierte RNS enthält. Es hatte sich nämlich ergeben, dass der von der RNS abgetrennte Proteinteil des Tabakmosaikvirus (TMV) zum Beispiel wenn er dissoziert ist, eine neue Antigenkomponente manifest werden lässt und sich dann serologisch vom TMV selbst oder dessen intaktem bzw. reaggregiertem Proteinanteil unterscheidet<sup>4</sup>. Unter physiologischen Bedingungen dissoziert das von der RNS separierte Virusprotein, womit sich dieses für Immunisierungszwecke als ungeeignet erweist.

Herrn Dr. G. A. MOOSBRUGGER, Leiter des Eidg. Vakzine-Instituts in Basel, danken wir, dass er uns die Durchführung dieser Untersuchungen ermöglicht hat.

<sup>1</sup> R. M. FRANKLIN und E. WECKER, Nature 184, 343 (1959).

<sup>2</sup> Über analoge Versuche beim Rind wird später berichtet.

<sup>3</sup> H. FRAENKEL-CONRAT, M. STAHELIN und L. V. CRAWFORD, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 102, 118 (1959).

<sup>4</sup> H. G. AACH, Biochim. biophys. Acta 32, 140 (1959).

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit scheint der Proteinteil des MKS-Virus nicht stark verändert worden zu sein, denn das durch die oben genannten Carbonylreagentien inaktivierte Virus verhält sich bei der Komplementbindungsreaktion wie ein unbehandeltes, infektiöses Virus. Wo der Angriffspunkt dieser Reagenzien liegt, lässt sich nicht mit Bestimmtheit sagen. Er dürfte aber auch, hier schon auf Grund der Komplementbindungsreaktion im RNS-Anteil zu suchen sein, wie dies FRANKLIN & WECKER<sup>1</sup> für das Virus der Mäuseencephalitis sehr wahrscheinlich gemacht haben. Ein Vergleich mit dem durch Formalin behandelten MKS-Virus zeigt, dass dieses einen erheblich niedrigeren Antigenwert aufweist als das durch Hydroxylamin inaktivierte Virus.

V. SPÜHLER und K. MEYER

*Eidgenössisches Vakzine-Institut, Basel und Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel, 12. Juli 1960.*

### Summary

The virus of foot and mouth disease is inactivated by hydroxylamine, hydrazine and semicarbazide. Such inactivated virus does not differ serologically from intact virus, and represents an interesting antigen for purposes of immunization.

### Glicolisi anaerobia del pancreas di cavia

In precedenti lavori alcuni autori (SCHNEIDER *et al.*<sup>1</sup>) hanno studiato le caratteristiche dei mitocondri e dei granuli di secrezione del pancreas; recenti ricerche (NOVELLI<sup>2</sup>) con il metodo della centrifugazione frazionata hanno permesso di separare nell'omogenato di pancreas due frazioni distinte costituite da granuli di secrezione e da mitocondri nettamente differenziabili. Nella presente ricerca abbiamo studiato il comportamento della glicolisi anaerobia nelle diverse frazioni cellulari del pancreas: granuli di tripsinogeno, mitocondri, fase solubile.

ed i granuli furono risospesi in saccarosio 0.25 M, fino a riottenerne il volume originario dell'omogenato. La determinazione dell'attività glicolitica venne effettuata secondo il metodo manometrico di LE PAGE<sup>3</sup>; la prima serie di vaschette conteneva la frazione in esperimento, in soluzione di LE PAGE, senza aggiunta di alcun nucleotide; nella seconda serie si aggiunsero 0.10 ml di ATP 0.01 M; nella terza serie 0.20 ml di DPN 0.003 M; nella quarta serie ATP e DPN nelle concentrazioni indicate. L'azoto di ogni frazione usata venne determinato con microkjeldahl. La purezza di ogni frazione venne controllata al microscopio in contrasto di fase (Zeiss Winkel). I valori furono espressi come  $QCO_2(N)$ , dividendo i  $\mu\text{l}$  di  $CO_2$  sviluppati in 60 min/i mg di N delle diverse frazioni.

Dall'esame dei dati esposti nella Tabella, risulta che l'attività glicolitica è più evidente nella frazione P 1 che nella frazione P 2. Tale attività è risultata assente nella frazione S. L'aggiunta di ATP e di DPN, separatamente, alla frazione P 1 non modifica sensibilmente il  $QCO_2(N)$ ; l'aggiunta, invece, di entrambi i nucleotidi determina un'evidente stimolazione di tale attività. Sulla frazione P 2, invece, sia l'ATP che il DPN provocano un aumento dell'attività glicolitica, maggiore per il primo che per il secondo; la miscela dei due provoca un aumento ancora maggiore. Risulta quindi, dai dati sopra esposti, che nella cellula pancreatica gli enzimi della glicolisi anaerobia sono presenti sia nei granuli che nei mitocondri, mentre non è stato possibile evidenziarli nella fase solubile. Il  $QCO_2(N)$  della frazione P 1 risultò immodificato anche in seguito a ripetuti lavaggi di detta frazione con soluzione di saccarosio 0.25 M.

È noto dalle ricerche di numerosi autori: (LE PAGE e SCHNEIDER<sup>4</sup>, KENNEDY e LEHNINGER<sup>5</sup>, HERZ *et al.*<sup>6</sup> che nel fegato, nel rene, nel miocardio, gli enzimi della glicolisi anaerobia sono presenti soprattutto nella fase solubile. Nel caso del cervello, invece, gli enzimi della glicolisi anaerobia sarebbero presenti nei mitocondri (GALLAGHER *et al.*<sup>7</sup>, ABOOD *et al.*<sup>8</sup>).

In base ai dati ottenuti è necessario ammettere nei granuli e nei mitocondri di pancreas di cavia l'esistenza di condizioni tali da giustificare un comportamento diverso da quello che si verifica nel caso del fegato, del rene e del miocardio.

Glicolisi anaerobia nelle frazioni cellulari del pancreas di cavia. I valori sono espressi come  $QCO_2(N)$ .  $\pm$  = deviazione standard.

Aggiunte	Nessuna	ATP	Stim.%	DPN	Stim.%	ATP + DPN	Stim.%
Frazione P1	$29.8 \pm 10.1$	$30.9 \pm 6.4$	3.7	$30.7 \pm 4.1$	3.0	$35.7 \pm 6.4$	19.8
Frazione P2	$23.0 \pm 9.0$	$26.6 \pm 8.7$	15.6	$24.6 \pm 8.4$	6.9	$28.4 \pm 10.1$	23.4
Frazione S	0	0		0		0	
Nº esperimenti	6	6		6		6	

Furono usate cavie del peso di 300–350 g, alimentate con dieta a base di crusca e verdura. Gli animali vennero sacrificati mediante dissanguamento ed il pancreas venne rapidamente asportato, lavato in soluzione di saccarosio 0.25 M e quindi omogenizzato nell'apparecchio di Potter-Elvehjem. L'omogenato venne centrifugato in centrifuga Servall SS-1 alla temperatura di + 2°C per 6 min a 1000  $\times$  g, in modo da allontanare i nuclei ed i detriti cellulari. Con una successiva centrifugazione a 2000  $\times$  g per 10 min, si sedimentarono i granuli di secrezione (frazione P 1); il sopraventante venne centrifugato a 15 000  $\times$  g per 17 min onde ottenere i mitocondri (frazione P 2); la terza frazione (S) era costituita dalla fase solubile. I mitocondri

<sup>1</sup> W. C. SCHNEIDER e G. H. HOGEBOOM, Cancer Res. 11, 1 (1951).

<sup>2</sup> A. NOVELLI, Relaz. II<sup>a</sup> Congr. Soc. it. Istochimica, Firenze, ott. (1959), in presso.

<sup>3</sup> V. R. POTTER, *Manometric Techniques and Tissue Metabolism* (Ed. Burgess, Minneapolis 1951), p. 143.

<sup>4</sup> G. H. LE PAGE e W. C. SCHNEIDER, J. biol. Chem. 176, 1021 (1948).

<sup>5</sup> E. P. KENNEDY e H. L. LEHNINGER, J. biol. Chem. 179, 957 (1949).

<sup>6</sup> H. G. HERZ, J. BERTHET, L. BERTHET e C. DE DUVE, Bull. Soc. Chim. biol. 33, 21 (1951).

<sup>7</sup> C. H. GALLAGHER, J. D. JUDAH e K. R. REES, Biochem. J. 62, 436 (1956).

<sup>8</sup> L. G. ABOOD, E. BRUNNGRABER e M. TAYLOR, J. biol. Chem. 234, 1307 (1959).