

parently the activation of the hydrogen peroxide by the hydrazine compound is promoted by the EDTA iron complex. This observation seems of interest in connection with the well-known catalytic activity of complexes between EDTA and iron^{8,9}.

Zusammenfassung. Es wird gezeigt, dass die Chelatbildner für Eisen, Desferrioxamin B und Äthylendiamintetraacetat (EDTA), den Abbau von Desoxyribonucleinsäure (DNS) durch Wasserstoffperoxid stark hemmen. Dagegen wird der durch eine Wasserstoffperoxid liefernde Methylhydrazinverbindung bewirkte DNS-Abbau vom ersteren Chelatbildner viel weniger gehemmt und vom letzteren sogar verstärkt. Diese Unterschiede zwischen dem Effekt des Wasserstoffperoxids und dem des Wasserstoffperoxid-Bildners können auf das Reduktionsver-

mögen der Wasserstoffperoxid liefernden Verbindung zurückgeführt werden.

K. BERNEIS, M. KOFLER, and W. BOLLAG

Forschungsabteilung, F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel (Switzerland), October 17, 1963.

⁸ E. TANNER, W. SCHULER, and R. MEIER, *Helv. chim. Acta* **42**, 445 (1959). – S. FALLAB, *Chimia* **16**, 189 (1962). – J. H. GREEN, B. J. RALPH, and P. J. SCHOFIELD, *Nature* **198**, 754 (1963).

⁹ TANNER et al.⁸ have found a catalytic activity of a phenanthroline-iron complex in certain systems. In our experiments it was noted that 0.01% of phenanthroline has a promoting effect on the DNA degradation, both by the methylhydrazine compound as well as by added hydrogen peroxide.

Über die Beziehungen zwischen Albumin- γ -Globulin-Quotienten und der immunologischen Reaktionsfähigkeit

Die immunologische Reaktionsfähigkeit eines Organismus ist durch quantitative Bestimmung der Serumantikörper nach Antigenapplikation messbar. Eine Aussage über die Quantität der Fähigkeit zur Antikörperbildung eines Organismus schon vor der Antigenverabfolgung treffen zu können, wäre von grosser Bedeutung für die Auswahl von Tieren, die der Immunsorumproduktion dienen sollen. Die von STÖCKL¹ an Pferden durchgeführten Rotlaufimmunisierungen führten zu dem Ergebnis, dass Tiere, die vor der Immunisierung einen hohen Albumin- γ -Globulin-Quotienten aufwiesen, trotz geringer applizierter Kulturmengen einen hohen spezifischen Schutzwert des Serums erkennen liessen. Zu ähnlichen Ergebnissen führte die Immunisierung von Kaninchen mit Hammelerythrocyten².

Da wir³ eine grössere Anzahl von Katzen im Rahmen einer anderen Fragestellung immunisiert haben, möchten wir zu der Frage Stellung nehmen, ob der Erkenntnis von STÖCKL ein allgemeinbiologisches Prinzip zugrunde liegt. Wir immunisierten Katzen am 1., 5. und 9. Versuchstag mit einer hitzeabgetöteten Vakzine von *Bruc. abortus* und ermittelten den Immunisierungseffekt durch Bestimmung der agglutinierenden Antikörper. Die Seren wurden ausserdem papierelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Elutionsmethode ausgewertet.

Die Errechnung des Quotienten an 169 Seren führte zu einem Mittelwert von 3,9. Der von uns aus den STÖCKL'schen Zahlenangaben aus 32 Einzelwerten errechnete Quotientenmittelwert beträgt 1,4.

Um zu der aufgeworfenen Frage Stellung nehmen zu können, korrelierten wir den Wert des Quotienten jeweils mit dem während der 26tägigen Versuchsperiode erreichten höchsten Titerwert der Agglutinine. Wir bezogen somit das titerserologische Ergebnis unabhängig vom Entnahmetag in die Rechnung ein, um eventuell auftretende Unterschiede in der Geschwindigkeit der AK-Bildung ausschalten zu können. Wir bestimmten den Korrelationskoeffizienten (r), die zugehörige Grösse z^4 und errechneten den mittleren Fehler zu z , m_z .

Eine Bestätigung der These, dass ein grosser Albumin- γ -Globulin-Quotient Voraussetzung für hohe Titerwerte ist, erfolgt, wenn z grösser ist als $3 m_z$. Diese Forderung wird in unserem Beispiel nicht erfüllt ($z = 0,133$;

$3 m_z = 0,2328$), so dass keine signifikante positive Korrelation zwischen dem Quotienten und dem Antikörperbildungsvermögen besteht.

Da die von uns vorgenommene Immunisierung unter der Einwirkung verschiedener Pharmaka erfolgte, erhebt sich die Frage, ob die Betrachtung der einzelnen Gruppen zu einer anderen Aussage führen könnte. Neben einer Kontrollgruppe immunisierten wir Tiere unter Megaphen-, Chloralhydrat-, Pervitin- und Adrenalineinwirkung.

Die Korrelationskoeffizienten der einzelnen Kollektive

	Anzahl	r	z	m_z	$3 m_z$
Kontrollkollektiv	28	0,28	0,29	0,2	0,6
Pervitinkollektiv	52	0,02	0,02	0,14	0,42
Adrenalinkollektiv	38	-0,09	-0,09	0,17	0,51
Chloralhydratkollektiv	23	-0,15	-0,15	0,22	0,66
Megaphenkollektiv	28	0,03	0,03	0,2	0,6

Den Korrelationskoeffizienten errechneten wir mit folgender Formel:

$$r = \frac{\sum x y - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}\right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}\right)}}$$

Dabei bedeuten: x : Albumin- γ -Globulin-Quotient. y : Logarithmus des reziproken Titerwertes. n : Anzahl der verglichenen Wertepaare.

Wie die tabellarische Zusammenstellung zu erkennen gibt, zeigen das Adrenalin- und das Chloralhydratkollektiv einen negativ von Null verschiedenen Korrelationskoeffizienten. Diese statistisch nicht signifikanten Einzelergeb-

¹ W. STÖCKL, *Zbl. Vet. Med.* **1**, 330 (1954).

² H. PETER, A. HANSER und D. AMELUNG, *Z. Immun. Forsch.* **109**, 383 (1951/52).

³ G. NAUMANN und J. WILDE, *Z. Immun. Forsch.* **115**, 16 (1958). – J. WILDE und G. NAUMANN, *Z. Hyg.* **145**, 143 (1958); *Z. inn. Med.* **1958**, 180.

⁴ E. WEBER, *Grundriss der biologischen Statistik*, 2. Aufl. (VEB Gustav Fischer, Jena 1956).

nisse erweitern die am Gesamtkollektiv erhobene Aussage dahingehend, dass nicht einmal in der Positivität des Korrelationskoeffizienten eine allgemeine Gesetzmässigkeit liegt.

Summary. 169 cats were immunized with heat-killed antigen of *Brucella abortus*. No correlation between the

albumin- γ -globulin-quotient and the level of agglutinating antibodies could be demonstrated.

G. NAUMANN und J. WILDE

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Epidemiologie der Karl-Marx-Universität, Leipzig (DDR), 22. Juli 1963.

Hemolysis in Immune Rabbits of Autologous Erythrocytes Modified with Common Enterobacterial Antigen

CEPPELLINI and DE GREGORIO¹ reported that red blood cells modified with Vi antigen undergo rapid lysis in immune, but not in non-immune, rabbits. Subsequent experiments with ⁵¹Cr-labeled erythrocytes revealed that hemolysis also occurs when autologous cells modified with enterobacterial O antigen (*S. typhosa*) are injected into rabbits previously immunized with the corresponding O antigen². The degree of hemolysis depends upon the amounts of antigen used for the treatment of erythrocytes and the O antibody titer of the serum. The present study was undertaken to determine whether erythrocytes modified with the recently discovered common enterobacterial antigen undergo lysis in immunized animals. This common antigen was found in numerous species of enteric bacteria, including *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Salmonella*, *Shigella*, and *Proteus*^{3,4}. This antigen-antibody system has several unusual features. The antibody is elicited by intravenous injection of *E. coli* 014 and a few other serogroups of *E. coli*, but not by numerous other enteric bacteria containing this antigen. For unexplained reasons, too, antibodies neither cause precipitation of soluble common antigen nor bacterial agglutination of many of the above species, but cause specific hemagglutination of erythrocytes modified with the antigen^{3,4}. Finally, this antigen-antibody system is not operative in latex agglutination⁴.

For immunization and challenge of rabbits (2 to 3 kg), common antigen was obtained from smooth strains of *E. coli* 014 and 0111 and from *S. typhimurium*. The strains were grown on brain veal agar in Kolle flasks for 18 h at 37°C. The organisms were suspended in 25 ml of phosphate hemagglutination buffer (pH 7.3; Difco). The suspension was heated for 1 h in boiling water and centrifuged at $23,500 \times g$ for 30 min; the resulting clear supernate was used as antigen. For immunization mixtures of equal volumes of antigen and complete Freund's adjuvant (0.2 ml; Difco) were injected into each of the footpads at weekly intervals for a total of 4 series of injections. This immunization procedure results in the formation of antibody against the common antigen⁵.

Titration of antibodies against common antigen was carried out by means of the hemagglutination test, as described previously⁴. Briefly, erythrocytes (2.5% suspension) were washed 3 times with phosphate buffer and treated with a 1:10 dilution of the common antigen. The antigen was obtained from a strain whose O antigen is unrelated to that used for immunization. Serial two-fold dilutions of serum (0.2 ml) were mixed with equal volumes of modified erythrocytes. The mixtures were incubated at 37°C for 30 min, and hemagglutination was read grossly after centrifugation for 2 min at $1350 \times g$. Confirmation of the identity of the antibody was obtained by inhibition of

the resulting hemagglutination by antigen from a third strain. For example, serum from rabbits immunized with *E. coli* 0111 were tested with red cells modified with *E. coli* 014 antigen, and the inhibitory antigen was obtained from *S. typhimurium*.

Challenge of immunized and non-immunized rabbits was carried out in the following manner. Heparinized arterial blood (5 ml) was obtained from the ear of the rabbit. The erythrocytes were washed 4 times with 30 ml of phosphate buffer. To the sediment was added common antigen (5 ml) from one of the above microorganisms, and the mixtures were incubated for 30 min at 37°C in a water bath. The red blood cells were again washed 4 times in 30 ml of buffer and resuspended in 5 ml of the same diluent. For control purposes, erythrocytes were treated under the above described conditions with staphylococcal antigen, prepared in the same manner as the enterobacterial antigens; this antigen is unrelated to the common antigen of gram-negative bacteria. Unmodified red blood cells, washed in parallel, were also used. The erythrocyte suspensions were injected into the marginal vein of the ear. Only autologous red blood cells were used in these experiments, and antigens for immunization and challenge were obtained from microorganisms with unrelated O antigens.

After the injection of modified autologous erythrocytes, samples of blood were obtained in capillary tubes 30 min, 1 h, 2 1/2 h, and 18 h after challenge. Hematocrit was determined, and the degree of hemolysis of the plasma noted by gross inspection. Urine was collected throughout the observation period on filter paper and tested for presence of hemoglobin with Hematest Reagent tablets (Ames Company, Elkhart, Indiana).

The results of the challenge with modified and non-modified autologous erythrocytes in immune and non-immune rabbits are recorded in the Table. It can be seen that red blood cells modified with common enterobacterial antigen undergo lysis in immune animals, as evidenced by the finding of hemoglobinemia in 100% and of hemoglobinuria in 72% of animals. Hemoglobinemia, at the times tested, was maximal 30 min after challenge and became progressively less during the ensuing 18 h. No difference was noted between animals immunized with common antigen from *E. coli* 014 and challenged with common antigen from either *E. coli* 0111 or *S. typhimurium*,

¹ R. CEPPELLINI and M. DE GREGORIO, Boll. Ist. sieroter. Milano 32, 445 (1953).

² C. N. SHUMWAY, V. BOKKENHEUSER, D. POLLOCK, and E. NETER, J. lab. clin. Med. 62, 600 (1963).

³ C. M. KUNIN, M. V. BEARD, and N. E. HALMAGYI, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 111, 160 (1962).

⁴ H. Y. WHANG and E. NETER, J. Bacteriol. 84, 1245 (1962).

⁵ E. A. GORZYNSKI, H. Y. WHANG, T. SUZUKI, and E. NETER, in preparation.