

Effect of an initial treatment with cyclophosphamide on the development of antibody-forming spleen cells during the secondary immune response

Days after second antigen injection	Average numbers of plaque-forming cells/10 ⁶ spleen cells in the groups:									
	Group I				Group II					
	<i>X</i> DPFC ^a	± s ^b	<i>X</i> IPFC ^c	± s ^b	<i>X</i> DPFC ^a	± s ^b	<i>P</i> ^d	<i>X</i> IPFC ^c	± s ^b	<i>P</i> ^d
0 ^e	6	4.2	97	49.2	1	0.8	> 0.1	19	5.4	> 0.1
2	21	7.7	378	107.7	38	7.5	> 0.1	85	15.8	< 0.05
3	468	145.6	3762	703.1	276	110.6	> 0.1	827	271.7	< 0.05
4	316	123.7	11497	2539.1	112	18.9	> 0.1	4960	112.4	< 0.05
5	148	50.2	5840	2398.6	62	24.0	> 0.1	1958	760.9	> 0.1
7	13	3.1	785	162.2	105	32.3	< 0.05	1058	267.8	> 0.1
10	34	9.1	1347	475.6	60	18.7	> 0.1	729	323.5	> 0.1
14	24	6.4	592	226.6	33	4.8	> 0.1	359	103.1	> 0.1
21	28	10.2	399	82.4	125	71.0	> 0.1	552	199.4	> 0.1
28	16	3.9	304	71.8	8	3.0	> 0.1	129	36.5	< 0.05
35	15	2.3	534	212.9	23	6.1	> 0.1	243	60.7	> 0.1

^a Mean value of direct plaque-forming cells; ^b standard deviation; ^c mean value of indirect plaque-forming cells; ^d statistical significance evaluated according to the Student's *t*-test; ^e 43 days after primary immunization.

Contrary to the situation after primary immunization, the majority of the serum hemolysins determined after the second antigen injection was resistant to treatment with 2-ME. In the sera of CY-treated mice (group II), the average peak titre of 7S hemolysins determined 10 days after secondary immunization was 132 50% hemolysis units. This value represented 60% of the peak value of the corresponding control (group I) found 7 days after the secondary antigenic stimulus.

In consequence it may be concluded that memory cells can develop after primary immunization without being actively engaged in antibody synthesis.

Zusammenfassung. Wurde die primäre Immunitätsreaktion von mit 4×10^8 Schaferythrozyten immuni-

sierten Mäusen durch Cyclophosphamid unterdrückt, fanden sich während der 43tägigen Beobachtungszeit keine nennenswerten Serumhämolysin- und Agglutinititer, und in der Milz solcher Tiere konnte im Vergleich zur Kontrolle nur jeweils 5% der direkt und indirekt Plaques bildenden Milzzellen nachgewiesen werden. Dennoch führte die Zweitimmunisierung zu einer typischen Sekundärreaktion.

H. FINGER, P. EMMERLING
and E. BRÜSS

*Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg,
D-87 Würzburg (Germany), 26 June 1969*

Media-Dependent Antagonism of Gentamicin Sulfate by Liquoid (Sodium Polyanetholsulfonate)

Recently we reported that sodium polyanetholsulfonate (Liquoid®) antagonizes the activity of both kanamycin sulfate and polymyxin B in vitro¹, confirming earlier findings by other investigators with regard to streptomycin and polymyxin B^{2,3}. Meanwhile we have extended our studies to several additional antibiotics. Neither carbenicillin, lincomycin, nor amphotericin B were affected by Liquoid in vitro, using a variety of broth media¹, in the absence or presence of fresh and heat-inactivated human serum. However, as was to be expected, Liquoid diminished the activity of gentamicin sulfate (Schering Corp., Bloomfield, N.J.) markedly in nutrient broth (NB), but much less so or not at all in Mueller-Hinton (MHB), trypticase soy (TSB), and thioglycollate (TGCB) broth. In contrast to our earlier findings with regard to kanamycin sulfate and polymyxin B, 10% fresh serum did not enhance the antagonistic effect of Liquoid versus gentamicin. The addition of Liquoid (0.05%) to assay tubes containing serial twofold dilutions of gentamicin in 10% fresh serum, regardless of

the broth employed, gave rise to a faint turbidity which increased in intensity over several hours' incubation at 37°C, thus rendering the minimal inhibitory concentration (MIC) readings rather difficult. This turbidity phenomenon prompted us to determine the minimal bactericidal concentration (MBC) of gentamicin versus strains of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* (the assay tubes contained 1.5×10^6 organisms/ml at 0 time). As shown in the Table, the MIC values obtained demonstrate that the antagonistic effect of Liquoid against gentamicin is media-dependent (NB) and certainly not enhanced in the presence of 10% fresh serum.

¹ W. H. TRAUB, *Experientia* 25, 206 (1969).

² J. R. MAY, A. E. VOUREKA and A. FLEMING, *Br. med. J.* 1, 627 (1947).

³ D. M. JACKSON, E. J. L. LOWBURY and E. TOPLEY, *Lancet* 2, 137 (1951).

Antagonism of the activity of gentamicin by Liquoid

Medium	Fresh serum added (10%)	Liquoid added (0.05%)	Test organisms <i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
			MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)
NB	—	—	0.12	0.12	0.25	2
	—	+	30	30	125	250
	+	—	0.12	0.12	1	4
	+	+	4	8	60	125
MHB	—	—	2	2	1	4
	—	+	8	8	8	15
	+	—	2	4	1	15
	+	+	8	8	15	30
TSB	—	—	8	15	15	60
	—	+	15	15	30	125
	+	—	8	8	8	60
	+	+	15	15	15	60
TGCB	—	—	15	15	8	60
	—	+	60	60	30	125
	+	—	8	8	8	30
	+	+	30	30	30	60

Furthermore, the MBC values bear this out much more clearly. Interestingly, the presence of 10% fresh serum tended to diminish the antagonistic effect of Liquoid somewhat, for example, in NB and TGCB.

Subsequent to these observations, we re-examined the effect of Liquoid versus kanamycin sulfate and polymyxin B, determining both the MIC and MBC of these

2 antibiotics versus strains of *Escherichia coli*. It was found that 10% fresh human serum did indeed enhance the antagonistic effect of Liquoid against polymyxin B, but not versus kanamycin sulfate. Therefore, we retract our earlier claims with respect to the enhanced antagonism of Liquoid against kanamycin sulfate in the presence of 10% fresh serum.

We should like to add that our attention has been drawn to a report⁴, indicating that Liquoid antagonized polymyxin B in TSB, whereas this anticoagulant exerted no such effect versus kanamycin sulfate in the very same medium. However, as we have shown, the antagonism of aminoglycoside antibiotics by Liquoid appears to be a media-dependent phenomenon⁵.

Zusammenfassung. Liquoid® wirkt als Antagonist zu Gentamicin-Sulfat in Abhängigkeit vom jeweiligen Testnährmedium. Zugabe von frischem Serum bedingt im Gegensatz zu Polymyxin B keine Verstärkung seiner antagonistischen Wirkung gegen Aminoglykosid-Antibiotika.

W. H. TRAUB and B. L. LOWRANCE

Departments of Microbiology and Pathology,
Clinical Microbiology Laboratories,
The Bowman Gray School of Medicine,
Winston-Salem (North Carolina 27103, USA),
30 June 1969

⁴ E. YOURASSOWSKY, Acta clin. belg. Suppl. 4, 1 (1967).

⁵ Aided by a grant from the United Medical Research Foundation of North Carolina.

Diminution du nombre des mitoses à partir des précurseurs des cellules synthétisant les anticorps après immunisation de souris thymectomisées à la naissance¹

Les souris thymectomisées à la naissance ont une réponse humorale primaire diminuée vis à vis des globules rouges de mouton (GRM). Théoriquement, ce déficit peut être en rapport avec une sécrétion faible d'anticorps par chaque cellule, par un nombre faible de cellules précurseurs, par une réduction des mitoses aboutissant aux cellules élaborant les anticorps. Nous avons essayé en comparant les résultats fournis par l'immunocyto-adhérence, les plages d'hémolyse et les foyers d'hémolyse, d'apprécier ces différentes possibilités.

Matériel et technique. Nous avons utilisé des souris CF 1 de 1 mois 1/2 immunisées par une injection i.p. de 0,1 ml d'une suspension de GRM à 50%. 40 souris indemnes nous ont servi de témoins et 40 souris ont été thymectomisées à la naissance par la technique habituelle².

Suivant les cas, 4 à 8 animaux ont été sacrifiés: 3, 4, 5, 7, 10, 12 et 21 jours après l'immunisation. La rate a été prélevée. Une moitié congelée servira à compter les foyers d'hémolyse (FH) sur coupe mince de rate³. Les résultats ont été exprimés en nombre de FH/cm² comme nous l'avons précédemment proposé⁴; l'autre moitié, dont on se servira pour réaliser une suspension unicellulaire, sera utilisée pour dénombrer les cellules productrices d'anticorps par l'immunocyto-adhérence selon le procédé de Brozzi et al.⁵ et par la technique des plages d'hémolyse (PH) selon la méthode de CUNNINGHAM et SZENBERG⁶.

Chez les CF 1 le «background» avec la technique des FH est de 10/cm², avec celle de Biozzi de 300 rosettes/10⁶

cellules spléniques et avec la méthode de CUNNINGHAM de 1 hémolyse/10⁶ cellules spléniques.

Résultats. Ils sont indiqués dans le Tableau ci-joint. Nous pouvons ainsi faire les constatations suivantes: chez les souris thymectomisées, on ne rencontre le nombre maximum de rosettes qu'au 10^e jour, au lieu du 5^e jour chez les témoins indemnes, et il n'est que de 244 000 rosettes par rate contre 1 300 000 chez les souris normales, soit plus de 5 fois moins avec 5 jours de retard. De même, le nombre le plus élevé de PH chez les thymectomisées apparaît seulement au 5^e jour et il n'est que de 22 000 PH/Rate [contre 310 000 au 4^e jour chez les souris témoins, soit 14 fois moins, avec un jour de décalage. Quant aux F.H. des animaux thymectomisés, beaucoup

¹ Travail du Laboratoire d'Hygiène - Faculté de Médecine de Lyon, Service du Professeur J. THIVOLET.

² J. THIVOLET et J. C. MONIER, Rev. fr. Étud. clin. biol. 14, 132 (1969).

³ S. E. BERGLUND, P. A. MARKEY et S. E. MERGENHAGEN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 126, 84 (1967).

⁴ J. C. MONIER et M. SEPETJIAN, Experientia, à paraître (1969).

⁵ G. BIOZZI, G. STIFFEL, D. MOUTON, M. LIACOPOULOS BRIOT, C. DECREUSEFOND et Y. BOUTHILLIER, Annl. Inst. Pasteur, Lille, Suppl. 170, 7 (1966).

⁶ A. J. CUNNINGHAM et A. SZENBERG, Immunology 14, 599 (1968).