

either Sigma Chemical Co. or Worthington Biochemical Corp. A microliter of freshly reconstituted FLE on a microslide gives at room temperature an endogenous activity below the noise of the photomultiplier at  $-900$  V - which we calculate to be equivalent to  $3 \times 10^4$  q sec $^{-1}$ . It is not necessary, therefore, to reduce further the endogenous activity by allowing the preparation to age at room temperature or by adding apyrase<sup>12</sup>.

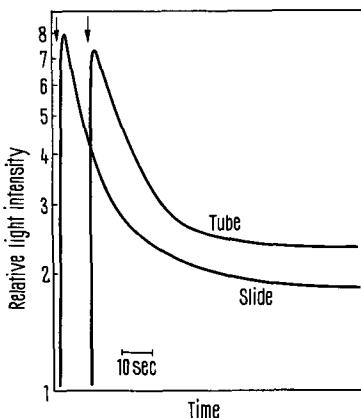


Fig. 1. Time course of firefly bioluminescence reaction. Arrows indicate the addition of ATP.

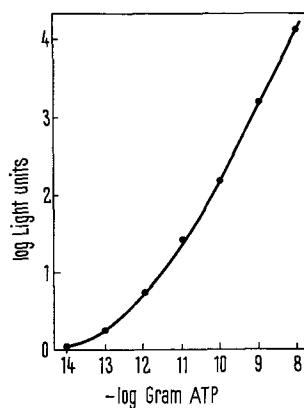


Fig. 2. Maximal velocity (or peak height) as a function of ATP concentration.

Figure 2 shows a typical standard curve. A light unit is equivalent to  $3 \times 10^4$  q sec $^{-1}$ . It is clear from the curve that the technique is sensitive enough to detect  $10^{-13}$  g ATP.

Aside from its high sensitivity, the technique has virtue in that it is rapid, direct, uncomplicated and economical in the use of reagents<sup>13</sup>.

**Résumé.** Un essai sur lamelle porte-objet a été mis au point pour la détermination quantitative du triphosphate d'adénosine. Il s'agit d'une modification de la réaction bien connue entre la luciférine et la luciférase dérivées de la luciole. Cet essai permet de déceler des quantités minuscules de l'ATP pouvant atteindre  $10^{-13}$  g.

G. B. CALLEJA<sup>14</sup> and G. T. REYNOLDS

*Palmer Physical Laboratory,  
Princeton University,  
Princeton (New Jersey 08540, USA), 4 August 1969.*

<sup>1</sup> W. D. McELROY, Proc. natn. Acad. Sci., USA 33, 342 (1947).

<sup>2</sup> W. D. McELROY and B. L. STREHLER, Arch. Biochem. 22, 420 (1949).

<sup>3</sup> B. L. STREHLER and J. R. TOTTER, in *Methods of Biochemical Analysis* (Ed. D. GLICK; Interscience, New York 1954), vol. 1, p. 341.

<sup>4</sup> A. M. CHASE, in *Methods of Biochemical Analysis* (Ed. D. GLICK; Interscience, New York 1960), vol. 8, p. 86.

<sup>5</sup> B. L. STREHLER, in *Methods of Enzymatic Analysis* (Ed. H.-U. BERGMAYER; Academic Press, New York 1963), p. 559.

<sup>6</sup> T. S. MASTERSON JR., A. D. MASON JR. and W. L. BROWN, Am. J. med. Electronics 3, 283 (1964).

<sup>7</sup> E. TAL, S. DIKSTEIN and F. C. SULMAN, Experientia 20, 652 (1964).

<sup>8</sup> E. BEUTLER and M. C. BALUDA, Blood 23, 688 (1964).

<sup>9</sup> S. ADDANKI, J. F. SOTOS and P. D. REARICK, Analyt. Biochem. 14, 261 (1966).

<sup>10</sup> L. M. ALEDORT, R. I. WEED and S. B. TROUP, Analyt. Biochem. 17, 268 (1966).

<sup>11</sup> H. HOLMSEN, I. HOLMSEN and A. BERNHARDSEN, Analyt. Biochem. 17, 456 (1966).

<sup>12</sup> G. E. LYMAN and J. F. DEVINCENZO, Analyt. Biochem. 21, 435 (1967).

<sup>13</sup> This work was supported by AEC Division of Biology and Medicine Contract No. AT(30-1)-3406.

<sup>14</sup> Present address: Biochemistry Laboratory, National Research Council, Ottawa 2, Canada.

## Eine quantitative Methode zur zahl- und volumenregulierten Übertragung von Mikroorganismen in Suspensionsmedien<sup>1</sup>

Es ist allgemein üblich, Medien mit leicht quantitativ bestimmmbaren Mikroorganismen oder anderen lebenden Zellen nach der Methode dekadisch-logarithmischer Stufung zu verdünnen und dann in Versuchstiere oder leblose Träger- und Vermehrungsmedien zu überführen. Auf diese Weise ist etwa bei infektiösen Agentien die Bestimmung einer ID<sub>50</sub> oder LD<sub>50</sub> für eine Versuchstierart mit hinlänglicher Genauigkeit zu ermitteln. Zahlenmässige Exaktheit ist dabei allerdings nur entsprechend der relativ grossen Stufen des dekadischen logarithmischen Systems zu erreichen. Im folgenden soll auf die Möglichkeit hingewiesen werden, mit Hilfe eines

«inversen Dreisatzes» gebrochene Exponenten rechnerisch und technisch zu umgehen, wenn in Sonderfällen ein engerer Verdünnungsraster wünschenswert ist. Dabei besteht ferner die Möglichkeit, Volumenexaktheit und -konstanz des Inokulums zu berücksichtigen. Die Methode stellt eine einfache Handhabe der Berechnung und Übertragung beliebiger Zahlen von Mikropartikeln in beliebigen Inokulationsvolumina dar, so dass über beide

<sup>1</sup> Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Grössen wunschweise frei verfügt werden kann. Die Methode wurde bei Tierexperimenten mit *Trypanosoma cruzi* entwickelt (DISKO und KRAMPITZ<sup>2</sup>). Vorbedingung für ihre Anwendbarkeit ist die hinreichende Stabilität des grobdispersen Systems, die gegebenenfalls mit geeigneten Mitteln gewährleistet werden muss. Bei Blutparasiten ist die Suspensionsstabilität bei raschem Arbeiten zwar annähernd befriedigend gegeben, zusätzliche Hilfe durch Schütteln und Röhren der jeweiligen Suspensionsstufe ist jedoch zu empfehlen.

*Praktische Durchführung.* An Hand eines einfachen Beispiels soll eine allgemeingültige Beziehung abgeleitet und formelmässig dargestellt werden. Die Zahl der Empfängertiere für die Titrationsreihe innerhalb eines Infektionsversuches besteht aus 5 Mäusegruppen zu je 7 Tieren ( $\Sigma_{35}$ ). Jedes dieser Tiere soll eine definierte Trypanosomenzahl in einem definierten, hier in allen Gruppen gleichen Inokulationsvolumen (zum Beispiel 0,25 ml) erhalten.

Tabelle I. Zahlenbeispiele für 5 gestufte Organismen-Dosen

Gruppe	Organismenzahl · 10 <sup>6</sup> /Tier	Organismenzahl · 10 <sup>6</sup> /7 Tiere
I	1,00	7,00
II	0,70	4,90
III	0,40	2,80
IV	0,10	0,70
V	0,50	0,35
$\Sigma_{35} = 15,75$		

*Arbeits- und Rechenvoraussetzung.* Die dem gewünschten Inokulationsvolumen  $V_I$  gleiche Blutmengen  $V_B$  (im Beispiel  $V_I \approx V_B \approx 0,25$  ml) muss mehr Trypanosomen enthalten als für die die meisten Trypanosomen erfordernde Gruppe (im Beispiel Gruppe I:  $7 \times 10^6$  Tryp.) nötig sind:

$$Z_{TB} (\geq) n \cdot Z_{TI}; \\ (V_B) = (V_I); (V_B \approx V_I)$$

Als Spender werden daher Tiere mit starker Parasitämie benötigt, wie sie sich in der Regel im Finalstadium der Infektion ergeben. Beim WBH-Stamm von *T. cruzi* können zwei ausgewachsene Mäuse als Spendertiere auf dem Höhepunkt der Parasitämie wenigstens je 1,0 ml Blut liefern, wenn sie durch Herzpunktion oder der von uns bevorzugten Methode nach HALPERN und PACAUD<sup>3</sup> entblutet werden. Bei direkter Zählung der Trypanosomen in der von MÜHLPFORDT<sup>4</sup> (1964) vorgeschlagenen Weise liefern die beiden Spendertiere zum Beispiel insgesamt  $76,80 \times 10^6$  Trypanosomen. Bei der Zählung ist durch mehrfache Wiederholung darauf zu achten, dass der subjektive oder durch die Methode bedingte Fehler möglichst niedrig gehalten wird. – Es werde ein Ausgangsvolumen von 2,0 ml parasitenhaltigen Blutes angenommen, weil sich damit einfach rechnen lässt. In 0,25 ml dieser Blutmenge ist der 8. Teil der Mikroorganismen enthalten:

$$\frac{76,80}{8} = 9,60;$$

Es enthalten also 0,25 ml des Nativblutes der Spender  $9,6 \times 10^6$  Parasiten. Zur Herstellung einer Titrationsreihe wird das Ausgangsmaterial in Mengen von jeweils 0,25 ml entsprechend den 5 Empfängergruppen in 5 Gefäße auf-

geteilt. Die Verdünnung mit einem geeigneten, bei Trypanosomen am besten phosphatgepufferten isotonischen Medium folgt fünfmal dem folgenden Berechnungsschema, einem inversen Dreisatz (am Beispiel der Gruppe I:  $1 \times 10^6$  Trypanosomen/Tier):

$$9,6 \cdot 10^6 \text{ Organismen}/0,25 \text{ ml sind in } 0,25 \text{ ml enthalten} \\ 1,0 \cdot 10^6 \text{ Organismen}/0,25 \text{ ml sind in } x \text{ ml enthalten}$$

$$x = \frac{0,25 \cdot 9,6}{1,0} = 2,40 \text{ ml;}$$

Die Gesamt-Inokulationsmenge, die – gleichmässige Mischung vorausgesetzt – pro 0,25 ml  $1,0 \times 10^6$  Trypanosomen enthält, beträgt 2,40 ml. Erforderlich sind für je 7 Tiere nur  $7 \times 0,25 \text{ ml} = 1,75 \text{ ml}$ . Von der Gesamtflüssigkeitsmenge werden die 0,25 ml Nativblut wieder subtrahiert: 2,40 ml Gesamtvolumen – 0,25 ml Blut = 2,15 ml Verdünnungslösung. Das Ergebnis würde also für die ersten drei Dosisstufen lauten:

Tabelle II. Am Beispiel von drei Dosen berechnetes erforderliches Verdünnungsmedium

Gruppe	Gewünschte organismendosis · 10 <sup>6</sup> /Tier	Jeweilige Zugabe von ml Verdünnungsmedium zu 0,25 ml Nativblut
I	1,0	2,15
II	0,7	3,18
III	0,4	5,75

Demnach lässt sich eine Mikroorganismen-Suspension  $S \approx x$  (ml) mit einer gewünschten (Trypanosomen)-Zahl  $Z_{TI}$  pro Inokulum und gewünschtem Inokulationsvolumen  $V_I$  nach der folgenden Formel berechnen:

$$S = \frac{V_I \cdot Z_{TB}}{Z_{TI}} \quad [\text{ml}]$$

$$S = V_B + \frac{V_I \cdot Z_{TB}}{Z_{TI}} - V_B \quad [\text{ml}]$$

wobei gelten muss:

$$Z_{TB} (\geq) n \cdot Z_{TI}$$

$$(V_B) = (V_I); (V_B \approx V_I)$$

Die zur Verdünnung des parasitenhaltigen Blutes erforderliche Flüssigkeitsmenge  $V_{Dil}$  errechnet sich somit nach der Beziehung:

$$V_{Dil} = \frac{V_I \cdot Z_{TB}}{Z_{TI}} - V_B \quad [\text{ml}]$$

Die Subtraktion von  $V_B$  kann vernachlässigt werden, wenn  $V_{Dil}$  gegenüber  $V_B$  sehr gross ist. Innerhalb einer

<sup>2</sup> R. DISKO und H. E. KRAMPITZ, Z. Parasitenk. 32, 11 (1969).

<sup>3</sup> B. N. HALPERN und A. PACAUD, C. r. Séanc. Soc. Biol. 145, 1465 (1951).

<sup>4</sup> H. MÜHLPFORDT, Z. Tropenmed. Parasit. 15, 145 (1964).

Verdünnungsreihe bleibt der Zähler des Quotienten  $(V_I \cdot Z_{TB})$  konstant:

$$\frac{k}{Z_{TI}} (-V_B) [\text{ml}],$$

was die Rechenarbeit vereinfacht.

Die Abkürzungen lassen sich wie folgt erklären:

$S (\triangle x)$ : gesamte Organismensuspension [ml] nach Verdünnung des Blutes;

$V_B (\triangle V_I)$  =  $V_{B_{\text{let}}} / (V_I)$ : dem gewünschten Inokulationsvolumen ( $V_I$ ) gleiches Nativblut-Volumen [ml];

$V_I (\triangle V_B)$  =  $V_{Inokulum}$ : gewünschtes Inokulationsvolumen pro Tier [ml];

$Z_{TB}$ : Organismenzahl (Trypanosomen) in  $V_B$ ;

$Z_{TI}$ : gewünschte Organismenzahl im Einzelinokulum ( $V_I$ );

$n$ : Tierzahl der Gruppe, für welche die meisten Mikroorganismen erforderlich sind.

**Diskussion.** Das Verfahren, das einen gewissen Bezug zu Verdünnungsproblemen in der Chemie besitzt, wird am Beispiel der Übertragung von Trypanosomen erläutert. Es scheint besonders geeignet zur dosisregulierten Übertragung extrazellulär gelagerten, zahlenmäßig direkt erfassbarer Blutparasiten oder anderer isoliert suspenderter Zellen. Bei zu grosser Organismenzahl im Ausgangsmaterial wie es vor allem bei in-vitro-Vermehrungen von Bakterien und Viren der Fall sein kann, wird bei unserer Methode das erforderliche Verdünnungsvolumen zu gross. Auch ist die fortlaufende volumenregulierte Verdünnung in kleinen Stufen hier selten erforderlich. Sollte sie trotzdem gewünscht werden, müsste die Ausgangssuspension vorverdünnt werden. Man kann das nötige Verdünnungsvolumen bereits um die Hälfte senken, wenn man der gewünschten Einheit des Nativmediums (zum Beispiel 0,25 ml) die gleiche Menge (0,25 ml) Verdünnungsmittel zusetzt, und dem Gemisch 0,25 ml zur Verdünnung entnimmt. Weiter um die Hälfte lässt sich reduzieren, wenn man dem Ausgangsmedium die doppelte Menge (also  $0,25 V_B + 2 \times 0,25 V_{Dil}$ ) zusetzt. Es ist also

Verdünnung mit ganzen Vielfachen erforderlich, die Einheit wird daraus entnommen und weiter verfahren wie bisher. Die Methode eignet sich grundsätzlich fürzählbare Mikropartikel in Suspensionsmedien unter der Voraussetzung einer zumindest temporär gleichmässigen Verteilung: geformte Blutbestandteile, Trypanosomen im Blut, Toxoplasmen im Mäuseaszites, Aufschwemmungen von Tumorzellen und dergleichen. Die Forderung nicht nur nach genauer Zahl- sondern auch Volumenregulation scheint aus mehreren Gründen berechtigt. PHILIPPS<sup>5</sup> stellt zum Beispiel bei Tierversuchen mit *T. cruzi* fest, dass die fortlaufende i.p. Verimpfung eines konstanten Volumens mit abnehmenden Parasitenzahlen zu einer geringeren Infektiosität und Pathogenität führt, als wenn man das Volumen der Inokula zusammen mit der Parasitenzahl vermindert. Unsere Methode eignet sich für alle Fälle, in denen ein enger Dosisraster angebracht erscheint. Was Trypanosomen anlangt, finden sich viele Beispiele bei BAKER<sup>6</sup> und KRAMPITZ und DISKO<sup>2</sup>. Ein Vorzug der Methode der Organismen-Übertragung mit Hilfe des «inversen Dreisatzes» ist auch die Umgehung von Pipettierfehlern aufgrund des «Fehlerfortpflanzungsgesetzes» (LORENZ<sup>7,8</sup>).

**Résumé.** A l'aide d'un exemple, les auteurs exposent en détail une méthode permettant d'observer facilement le transport de microorganismes dénombrables ou de particules quelconques, en nombre et volume désirés. Cette méthode, reposant sur le principe de la règle de 3 inverse, ne peut être employée que si l'on a établi au préalable des conditions de suspension stable. Elle convient très bien aussi aux préliminaires d'expériences microbiologiques.

R. DISKO und H. E. KRAMPITZ

*Institut für Medizin. Mikrobiologie der T. H.  
und der Universität,  
D-8000 München (Deutschland), 29. September 1969.*

<sup>5</sup> N. R. PHILIPPS, Ann. trop. Med. Parasit. 54, 60 (1960).

<sup>6</sup> J. R. BAKER, Ann. trop. Med. Parasit. 54, 71 (1960).

<sup>7</sup> R. J. LORENZ, Arch. Virusforsch. 10, 551 (1960).

<sup>8</sup> R. J. LORENZ, Arch. Virusforsch. 10, 560 (1960).

## CONGRESSUS

### The Netherlands Symposium of the International Atomic Energy Agency IAEA

in Rotterdam 31 August–4 September 1970

The Symposium will be concerned with Dynamic Studies with Radioisotopes in Clinical Medicine and Research.

Scientific Secretaries: Dr. T. Nagai and Dr. E. H. Belcher, Internat. Atomic Energy Agency, Kärntnerring 11–13, P.O. Box 590, A-1011 Wien (Austria).

### Romania Regional Congress of Physiological Sciences

in Brașov 10–16 August 1970

This congress will be organized under the sponsorship of the International Union of Physiological Sciences

(IUPS). Information concerning participation may be obtained from: Romanian National Organizing Committee, Institute of Physiology, Boulevard 1 Mai No. 11, Bucuresti 8 (Romania).