

(C = 1, DMSO); UV: end absorption (methanol); IR (nujol): 3375, 3240, 3150, 1710, 1655, 1605, 1572, 1533, 1412 and 965 cm^{-1} ; elemental analysis: calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{NO}_6$: C 62.81%, H 9.79%, N 3.39%; found: C 62.64%, N 10.38%, N 3.48%; molecular weight 401 (MS).

Thermozymocidin is almost insoluble in water and in nonpolar solvents, slightly soluble in lower alcohols, chloroform, pyridine, dimethylsulphoxide, soluble in N NaOH, N HCl, concentrated formic acid and acetic acid. Reaction with ninhydrin, dinitrophenylhydrazine, alkaline permanganate are positive. Specific test for sugars and polypeptides are negative. The antibiotic is stable on heating even in acids, alkalis and organic solvents (0.1% hydroalcoholic solutions retain full activity after 2 days at 50°C and pH 2–10).

Thermozymocidin is highly active against a great number of yeasts and filamentous fungi. MIC is equivalent to 0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for *Kloeckera apiculata*, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans*, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for *Penicillium notatum*, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for *Aspergillus oryzae* and *Trichophyton mentagrophytes*. It does not show antibiotic activity against gram + and gram – bacteria.

The activity in vitro seems not to be affected by 10% horse serum. LD₅₀ of thermozymocidin in mice is 7.5 mg/kg by i.p. injection¹⁰.

Riassunto. È stato isolato un nuovo antibiotico, denominato termozimocidina, attivo contro lieviti e funghi filamentosi, prodotto in coltura sommersa da un eumicete termofilo. Vengono presentate le principali proprietà chimiche, fisiche e biologiche che ne permettono la sua caratterizzazione.

R. CRAVERI, P. L. MANACHINI and
F. ARAGOZZINI

*Cattedra di Microbiologia Industriale,
Università degli Studi,
20133, Via Celoria 2, Milano (Italy), 21 December 1971.*

¹⁰ This research was supported by Società Italiana Resine S.I.R. (s.p.a.), Milano.

Virologie: sur la spécificité du facteur d'interférence de *Pseudomonas aeruginosa*

Les interférons des organismes supérieurs assurent une certaine protection de l'espèce productrice contre la plupart des virus susceptibles de l'attaquer mais sont dépourvus, dans la majorité des cas, d'effet protecteur notable vis-à-vis d'espèces hétérologues. L'étude de ces substances a utilisé principalement l'interaction entre virus et eucaryotes, bien que les procaryotes et, en particulier, les entérobactéries soient également le siège de phénomènes d'interférence et qu'une substance de type interféron ait été décrite chez *Pseudomonas aeruginosa*¹.

Parmi les obstacles qui s'opposent encore à l'utilisation thérapeutique de l'interféron, plusieurs sont liés à cette spécificité; il nous a dès lors semblé intéressant de décrire quelques observations relatives à la spécificité d'un facteur d'interférence viral d'origine bactérienne.

Souches: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 12055 et ATCC 12175, *Shigella flexneri* ATCC 12661, *Staphylococcus aureus* Twort Institut Pasteur 6451. Bactériophage de *P. aeruginosa* ATCC 12055 B₃, Bactériophage de *P. aeruginosa* ATCC 12175 B₂, Bactériophage de *S. flexneri* ATCC 12661 B, Bactériophage de *St. aureus* Twort Institut Pasteur. Les souches hôtes sont conservées à l'état lyo-

phile, les bactériophages sont conservés à +5°C en suspension dans les filtrats de cultures lysées.

Milieu de culture A: Acide lactique: 2,4 g/l; chlorure de sodium: 5; Phosphate diammonique: 1; Phosphate monopotassique: 1; Sulfate de magnésium heptahydraté: 0,2; Hydrolysate de caséine: 1. B: Extrait de bœuf Difco: 3 g/l; Bactopeptone Difco: 5; Agar-agar Difco: 15.

Culture de *P. aeruginosa* ATCC 12055: On ensemence 100 cm³ de milieu A par 2 × 10⁹ bactéries et cultive en fiole de 250 cm³ à 37°C pendant 3 h. On obtient 2 × 10¹⁰ bactéries en phase exponentielle ($\mu = 0,11$).

Multiplication du phage B₃ sur *P. aeruginosa*: On ensemence 100 cm³ de milieu A par 2 × 10⁹ bactéries et 1 × 10⁸ phages et cultive à 30°C pendant 15 h puis centrifuge 45 min à 9000 g et filtre le surnageant sur millipore HA. On obtient une suspension privée d'éléments bactériens contenant environ 1 × 10¹⁰ particules infectantes par cm³.

La culture de *P. aeruginosa* sur milieu B et l'obtention de plaques d'infection par le phage B₃ sont effectuées selon DICKINSON². Dans ces conditions, le nombre moyen de particules libérées par bactérie infectée (burst size) pour une multiplicité d'infection inférieure à 1 est de 55 à 75 et le rendement global (step size) de 35 à 60.

Phage B₃ inactivé: Le traitement par les ultraviolets a été effectué dans les conditions décrites pour les phages de *E. coli*³. L'irradiation de 20 cm³ de suspension à 1,5 × 10¹⁰ phages/cm³ en boîte de Petri (diamètre 100 mm) à 30 cm d'une lampe germicide Westinghouse ($\lambda_{\text{max.}} = 2650 \text{ \AA}$) conduit en 6 mn (3.10⁸ ergs/mm²) à un taux de survivance asymptotique de 2 × 10³ phages/cm³.

Facteur d'interférence: A 250 cm³ de suspension de phages atténués on ajoute 50 cm³ de culture de *P. aeruginosa* et laisse en contact 1 h à 57°C. On centrifuge 1 h à 9000 g, le culot est remis en suspension dans 50 cm³ de milieu A, puis incubé 2 h à 37°C. On centrifuge 1 h à

Bactérie	Phage	Rendement moyen en particules virales	
		Témoin	+ Facteur d'interférence de <i>P. aeruginosa</i> /B ₃
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 12055	12055 B ₃	29	4
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 12175	12175 B ₂	39	31
<i>Shigella flexneri</i>	12661 B	29	21
<i>St. aureus</i> Twort	Tw.	34	42

¹ C. K. MERCER et R. F. N. MILLS, J. gen. Microbiol. 23, 253 (1960).

9 000 g, reprend le culot par 5 cm³ de solution de Ringer et broie à la presse de Hughes refroidie à -20°C. L'inactivation des bactéries est achevée par chauffage pendant 30 min à 60°C, puis on centrifuge et récolte le surnageant.

Essai d'activité: A 100 cm³ de culture de *P. aeruginosa* on ajoute 4 cm³ de solution de facteur d'interférence, laisse en contact 1 h 30 puis ajoute une suspension de phages virulents (multiplicité d'infection 0,6) et détermine le rendement moyen en particules virales. Un témoin est effectué parallèlement à l'aide d'un extrait de bactéries non soumises à l'action du phage atténué; cet extrait possède un léger effet inhibiteur non spécifique sur la multiplication du phage. Les autres souches hôtes et leurs phages sont traités dans des conditions identiques.

Résultats et discussion. Le Tableau montre que la préparation du facteur d'interférence obtenu à partir de *P. aeruginosa* ATCC 12055 et du phage B₃ possède un effet inhibiteur notable vis-à-vis de l'attaque de cette bactérie par ce bactériophage, puisque la production moyenne de particules virales par cellule bactérienne passe de 29 pour le témoin à 4 pour la cellule préalablement mise au contact de ce facteur. Au contraire, les 3 autres souches bactériennes utilisées, bien que l'une d'entre elles appartienne à la même espèce, ne bénéficient d'aucun effet inhibiteur significatif.

On a constaté d'ailleurs que si l'on agite une préparation active de facteur d'interférence avec une suspension de bactéries neuves de la même souche, et qu'on élimine

celles-ci par centrifugation, on obtient un extrait «épuisé» dont l'activité est pratiquement nulle. Au contraire, la même manipulation effectuée à l'aide de bactéries de l'une des trois autres souches, ne modifie pas l'activité.

Ces observations tendent à montrer que le facteur d'interférence présente chez les procaryotes une spécificité d'hôte étroite, analogue à celle observée pour l'interféron des organismes supérieurs et que son inactivité pour une cellule hétérologue serait due, au moins, à un défaut d'absorption par celle-ci.

Summary. *P. aeruginosa* produces on exposure to inactivated phage, an interference factor which is readily absorbed by new *Pseudomonas* cells and which decreases the phage yield in a growth cycle involving this bacterium. This factor has, however, no influence on the phage yield of related or different species of bacteria and is not absorbed by them.

L. PENASSE, M. PEYRÉ et G. NOMINÉ

Centre de Recherches Roussel-Uclaf,
102, route de Noisy, F-93 Romainville (France),
13 décembre 1971.

² L. DICKINSON, J. gen. Microbiol. 11, 105 (1954).

³ S. E. LURIA et M. DELBRUCK, Arch. Biochem. Biophys. 1, 207 (1943).

PRO EXPERIMENTIS

A Simple Technique for Short-Term Venous Cannulation in Rabbits

Acute intravenous injections in rabbits are simple because the marginal ear veins are easily accessible. If prolonged infusions or intermittent injections are required, however, problems may arise because of the difficulty in keeping a needle in the vessel lumen for some time, especially if the syringe has to be detached from the needle hub during the procedure. This problem is even greater when blood samples are being withdrawn from a peripheral ear vein, because pressure on the needle hub to keep the point in the vessel usually interferes with blood flow.

The method evolved here to overcome this problem is simplicity itself: before inserting the needle in the marginal ear vein, the relevant part of the ear is shaved, and then swabbed freely with xylene. The vein is punctured with a disposable 25 g needle with plastic hub before the xylene has evaporated, and the needle hub is pressed firmly to the ear for about 20 sec.

The solvent action of the xylene on the plastic hub forms a bond between the hub and the ear surface, and the needle will remain in position for some considerable time, even if the rabbit moves its head. When the injection procedure is completed, the needle can be prised free without damaging the ear.

This technique may also be adapted for blood sampling: if a length of plastic tubing is connected to the needle hub, blood will flow freely for some minutes, and such samples are probably subject to less 'tissue contamination' than samples obtained by transection of the ear vein. The

application of xylene of course facilitates blood sampling by virtue of its vasodilating action. One precaution should be observed when disposable plastic syringes are used: such syringes should be connected to the needle hub only after the xylene has evaporated, otherwise the syringe may also adhere to the ear, and therefore may be difficult to remove from the needle.

This simple technique has been used in our laboratory for many months, and has proved most valuable for procedures such as the induction and maintenance of anesthesia by intravenous agents, where many injections must be made over a period of several hours.

Zusammenfassung. Einfache Technik zur Fixierung einer Wegwerf-Injektionsnadel, die es erlaubt, ohne Festbinden während einiger Stunden am Ohr eines Kaninchens zu bleiben. Mit dieser Technik können fortlaufend und ohne namhafte Gefässverletzung Injektionen oder Blutentnahmen durchgeführt werden.

J. L. GORDON

Cambridge University, Department of Pathology,
Cambridge CB2 1QP (England), 16 December 1971.