

Number of nuclei per cyst in various populations of *Artemia salina* (L.)

Locality	Ploidy	Mode of reproduction ^a	Year of collection	No. of cysts	Mean number of nuclei	Standard deviation
San Francisco (USA)	2N	B	1938	10	3164	239
			1951	10	3462	182
			1961	10	3086	356
			1965	22	2959	469
			(not known)	60	4004	192
Great Salt Lake (USA)	2N	B	1951	10	3543	192
			1967	10	3900	150
Inagua (Bahamas)	2N	B	1969	3	3534	134
Aio-machi (Japan)	?	P	1968	9	3769	171
Jamnagar (India)	3N	P	1968	5	3221	156
Comacchio (Italy)	4N	P	1960	20	3468	209
Sete (France)	2N	P	1962	15	3415	243

^a B, bisexual; P, parthenogenetic.

and not tetraploid as previously reported². The diploid number for *Artemia* is accepted as 42³.

The results of nuclear counts in various cysts populations are shown in the Table. The data on NAKANISHI et al.⁵ have been recalculated from their original findings and are those listed in the last heading under 'San Francisco'. On the one hand these data indicate that, within a given population, dormancy is initiated at essentially the same developmental stage with respect to the number of nuclei present. Furthermore, the number of nuclei per cyst appears to be quite similar in populations separated by many thousands of miles, the implication being that the onset of dormancy is rather rigidly programmed into the development of this organism. Furthermore, significant gene flow between the bisexual populations seems unlikely with the possible exception of the Great Salt

Lake and California populations. Of course, no genetic exchange takes place between the parthenogenetic ones. Thus, the relative constancy of nuclei at the time of embryonic dormancy is an event that appears to be acquired and maintained in each population independently of geographic and environmental conditions.

On the other hand there are statistically significant differences between some of these populations. The application of Student's *t*-test to the data shows that the populations can be separated at the 95% level of confidence into the following sequence: SF⁴ = SL 67 > Aio-machi > SL 51 = Inagua = Comacchio = SF 51 = Sete > Jamnagar = SF 38 = SF 61 = SF 65. However, the grouping in this sequence shows no overall correlation with the geographical origin, the mode of reproduction, or the ploidy of the populations.

Charakterisierung der Geisseln und des Flagellins von *Listeria monocytogenes*. I. Immunologische Untersuchungen

Characterization of Flagella and Flagellin of *Listeria monocytogenes*. I. Immunological Investigations

I. BRAVENY and H. LOTTER

Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Technischen Universität, Ismaninger Strasse 22, D-8 München 80 (Deutschland, BRD); und Max-Planck-Institut für Biochemie, D-8033 Martinsried bei München (Deutschland, BRD), 15. Dezember 1975.

Summary. It is possible to show only H-antibodies in a latex test with a purified flagella suspension of *Listeria monocytogenes*. An antigen community between *Staphylococcus aureus* and flagella of *Listeria* could be excluded.

Bakteriengeisseln bestehen aus einheitlichen globulären Untereinheiten, die als Flagellin bezeichnet werden und in regelmässiger Anordnung zum zylindrischen Filament aggregiert sind (SCHMITT¹). Diese Aggregate können durch verschiedene Methoden (INO²) aufgelöst werden. Es ist bisher nicht bekannt, wieweit Geisseln von *Listeria monocytogenes* und ihr Geisselmonomer – das Flagellin – immunologisch identisch sind. Das Flagellin lässt sich besser reinigen als intakte Geisseln. Mit dem gereinigten Flagellin können – bei bestehender serologischer Äquivalenz – hochspezifische Geissel-(H)-Hyper-

immunseren hergestellt werden. Solche Seren sind zur Klärung der Antigengemeinschaft von *Listeria*-Geisseln mit anderen Erregern erforderlich. Serologische Kreuzreaktionen der somatischen (O)-Antigene von *L. monocytogenes* mit Staphylokokken oder Enterokokken sind hinreichend bekannt (SEELIGER³, SACHSE und

¹ R. SCHMITT, Biologie in unserer Zeit 1/2, 83 (1972).

² T. INO, Bact. Rev. 33, 454 (1969).

³ H. P. R. SEELIGER, Z. Hyg. 141, 15 (1955).

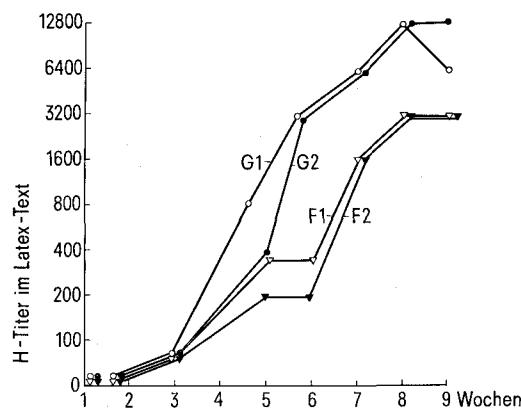
POTEL⁴, NETER et al.⁵). Sie erschweren die Antikörperbestimmung in Seren von Patienten mit Listeriose-Verdacht. Dem Nachweis von H-Antikörpern wurde deshalb mehr Bedeutung beigemessen als dem von O-Antikörpern (SEELIGER⁶). Für die H-Agglutination wurden bisher Suspensionen von begeisselten Bakterien verwendet. Eine reine H-Agglutination ist aber nur dann zu erwarten, wenn als Antigene isolierte Geisseln verwendet werden. Damit eine solche Reaktion sichtbar wird, ist es erforderlich, die Geisseln an Polystyrolkügelchen zu adsorbieren. BADER⁷ beschrieb eine Latex-Geissel-Agglutination bei Salmonellen. Mit einem ähnlichen Test wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurden optimale Methoden zur Gewinnung und Reinigung der Geisselsuspensionen und von Flagellin beschrieben.

Material und Methoden. Verwendete Bakterienstämme. *Listeria monocytogenes*, Serotyp 4b (1071/53), *Staphylococcus aureus* (b 3), *Proteus vulgaris* (D 10), *Pseudomonas aeruginosa* (A 2), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

Geisselgewinnung. Die Anzüchtung der Keime erfolgte zunächst auf Blutagar bei 37°C. Einzelne glatte Kolonien wurden auf grosse Platten mit Tryptoseagar überimpft und mit 5 ml Tryptosebouillon (Difco) überschichtet. Nach 48 h Bebrütung bei 28°C wurde mit gepufferter Kochsalzlösung (PBS-pH 7,2) abgeschwemmt und die Suspension 30 min bei 3000/U zentrifugiert. Das Ausgangsvolumen wurde um den Faktor 10 verringert.

Tabelle I. Serumtitr vor und nach der Immunisierung mit *Listeria*-Geisseln und Flagellin.

	Vor der Immunisierung	Nach der Immunisierung
O-Agglutination		
G 1 (Geissel)	1:20	1:80
G 2 (Geissel)	1:20	1:80
F 1 (Flagellin)	—	—
F 2 (Flagellin)	1:20	1:20
Latex-Geissel-Test		
G 1	—	1:12800
G 2	—	1:6400
F 1	—	1:3200
F 2	—	1:3200



Anstieg des H-Titers im Latex-Test bei Kaninchen, die mit *Listeria*-Geisseln (G1 und G2) und *Listeria*-Flagellin (F1 und F2) immunisiert wurden.

Die Geisseln wurden durch Behandlung mit dem Homogenisator nach Potter-Elvehjem (Fa. Braun, Melsungen) 3 min bei 1500 U/min abgetrennt. Die Bakterienzellen wurden dann durch Zentrifugation bei 10000 g 20 min lang entfernt. Der Überstand wurde 1 h bei 100000 g (Beckmann-Zentrifuge Spinco L 50) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 20 ml PBS aufgenommen und erneut bei 10000 g 20 min zentrifugiert, um eventuell noch vorhandene Bakterienkörper zu entfernen. Die Geisselsuspension (Überstand) wurde mit Formalin (Endkonzentration 0,3%) konserviert.

Herstellung des Flagellins. Das Flagellin wurde durch Behandlung mit verdünnter HCl bei pH 2 gewonnen (KOFLER⁸).

Herstellung von Immunseren gegen Geisseln und Flagellin. Zuchtkaninchen wurden in 5-tägigem Abstand mit steigender Menge (25–400 µg Protein/ml) Geisseln bzw. Flagellin in 0,5 ml PBS i.v. immunisiert.

Latex-Geissel-Test. Von der gereinigten Geisselsuspension wurde eine geometrische Verdünnungsreihe mit PBS hergestellt, wobei jedes Röhrchen 0,25 ml enthielt. Ein Tropfen Latex-Reagenz (0,8 µ Fa. Hyland) wurde mit 5 ml PBS verdünnt. Von diesem Latex-Reagenz wurden 0,25 ml den Geisselsuspensionen zugegeben. Dazu wurden je 0,5 ml einer positiven Verdünnung des Immunserums gegeben. Dieses Gemisch wurde 4 h im Wasserbad bei 37°C inkubiert und nach einer weiteren 1/2 h Inkubation bei Zimmertemperatur abgelesen. Bei positiver Reaktion entstanden weisse Flocken, die sich in der Kuppe des Reagenzglases absetzten. Die letzte Geisselverdünnung, die noch eine starke Reaktion gezeigt hatte, wurde für den Hauptversuch verwendet. Von dem zu prüfenden Serum wurde eine geometrische Verdünnungsreihe hergestellt, wobei jedes Röhrchen 0,5 ml enthielt. Dazu wurde die gleiche Menge des Geissel-Latex Gemisches gegeben. Dann wurde wie oben inkubiert und abgelesen.

O- und H-Agglutinationen wurden mit *Listeria*-Aufschwemmungen (Behringwerke) nach Angaben von SEE-LIGER⁶ durchgeführt.

Absättigung. Von Geisseln und Flagellin wurden mit PBS Suspensionen hergestellt, die 1 mg/ml Protein enthielten. Es wurden weiterhin *Listeria*-O- und Staphylokokken-Antigen verwendet. Durchführung nach CASTELLANI⁹.

Für die Staphylokokken-Agglutination wurden zwei verschiedene Antigene hergestellt: eine formalinierte, eine im Dampftopf erhitzte Bakterien-Suspension (SCHIERZ und BURGER¹⁰).

Ergebnisse. Die Seren wurden vor und nach der Immunisierung mit dem Latex-Test in der O- und H-Agglutination geprüft (Tabelle I). Ein Titeranstieg in der O-Agglutination zeigte sich lediglich bei den mit Geisseln immunisierten Tieren. Es fällt auf, dass alle Tiere vor der Immunisierung im Latex-Geissel-Test negativ reagierten.

Vergleich der antigenen Eigenschaften von Geisseln und Flagellin. Der Anstieg des H-Titers im Latex-Test bei den mit Geisseln und Flagellin immunisierten Tieren ist aus der Figur ersichtlich. Antikörper werden verzögert gebildet; erst nach der 4. Woche kommt es zu einem steilen

⁴ H. SACHSE und J. POTEL, 714, 472 (1957).

⁵ E. NETER, H. ANZAI und E. A. GORZYNISKI, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 105, 131 (1960).

⁶ H. P. R. SEELIGER, *Listeriosis* (S. Karger, Basel, New York 1961).

⁷ R. E. BADER, Z. Hyg. 150, 199 (1964).

⁸ H. KOFLER und T. KOBAYASHI, Arch. Biochem. Biophys. 67, 246 (1957).

⁹ A. CASTELLANI, Z. Hyg. 40, 1 (1902).

¹⁰ G. SCHIERZ und A. BURGER, Z. med. Mikrobiol. Immun. 152, 300 (1966).

Tabelle II. Serumtitr. gegen *Listeria*-Geisseln und Flagellin (6 Wochen nach Beginn der Immunisierung) – vor und nach der Absättigung mit *Staphylococcus aureus* b 3.

	<i>Listeria</i> -Latex-Geissel-Test	Nach der Absättigung	Staphylokokken-Agglutination	Nach der Absättigung
G 1	1:6400	1:3840	1:40	—
G 2	1:6400	1:3840	1:40	—
F 1	1:400	1:480	1:20	—
F 2	1:200	1:240	1:20	—

Tabelle III. Serumtitr. der mit verschiedenen Bakterien-Geisseln immunisierten Kaninchen.

Immunserum gegen Geisseln von	Serumtitr. im Latex-Geissel-Test	
	Homologes Antigen	<i>Listeria</i> -Antigen
<i>Proteus vulgaris</i>	1:9600	1:80
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1:25000	1:40
<i>Bacillus subtilis</i>	1:9600	1:80

Titeranstieg. Dabei wurden grundsätzlich auch von den mit Flagellin immunisierten Tieren Antikörper gegen Geisseln gebildet; – die Werte liegen jedoch nach 8 Wochen um 2 Titerstufen niedriger als bei den mit Geisseln immunisierten Tieren. Elektronenmikroskopisch konnten im «Zentrifugat» der Flagellin-Lösungen (1 h bei 100 000 g) keine intakten Geisseln festgestellt werden. Die Antikörper in den Immunseren waren also ausschließlich gegen das Flagellin gerichtet. Die Reaktion dieser Seren mit kompletten Geisseln bedeutet also eine zumindest teilweise Übereinstimmung der antigenen Determinanten bei *Listeria*-Geisseln und Flagellin. Nach der Immunisierung wurden Geissel- und Flagellin-Seren mit Flagellin absorbiert. Während Flagellin-Antikörper vollständig adsorbiert wurden, blieb trotz mehrfacher Wiederholung bei den Geisselseren ein Resttiter (1:320) bestehen.

Ausschluss einer Antigengemeinschaft zwischen *Staphylococcus aureus* und *Listeria*-Geisseln. 6 Wochen nach Beginn der Immunisierung wurde den Kaninchen Blut entnommen und der *Listeria*-H-Titer mit dem Latex-Test sowie auch der Staphylokokken-Titer mittels Agglutinationsreaktion geprüft. Danach wurden die Seren mit *Staphylococcus aureus* abgesättigt und nochmals untersucht (Tabelle II). Wie erwartet konnten die Staphylokokken-Titer abgesättigt werden. Dagegen wurde kein Abfall bei den H-Titern festgestellt. (Wegen der Verdünnung bei der Absättigung ergaben sich andere Titerstufen.) Mit diesem Versuch konnte sichergestellt werden, dass zwischen *Listeria*-Geisseln und *Staphylococcus aureus* b 3 keine Antigengemeinschaft besteht.

Ausschluss einer Antigengemeinschaft zwischen Geisseln von *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Bacillus subtilis*. Die Ergebnisse der Immunisierung mit gereinigten Geissel-Suspensionen der geprüften Keimarten sind in der Tabelle III zusammengefasst. Der Titeranstieg bei den mit verschiedenen Geisseln immunisierten Kaninchen betrug im *Listeria*-Geissel-Test nur eine Titerstufe. Die Geissel-(G1, G2) und Flagellin (F1, F2) Immunseren reagierten mit Geisseln von *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Bacillus subtilis* nicht. Deshalb kann angenommen werden, dass die geprüften Antigene keine Partialgemeinschaft besitzen.

Diskussion. In der dichten Packung der Flagellinmoleküle, wie sie in der intakten Geissel vorliegt, sind Bereiche des Flagellins nach innen gerichtet bzw. mit den Nachbarproteinen assoziiert. Es erhebt sich daher die Frage, inwieweit Geisseln und Flagellin gemeinsame antigene Determinanten besitzen. Nach der Absorption von *Listeria*-Geissel-Seren mit Flagellin (mehrfach) blieb ein geringer Resttiter bestehen. Dies deutet auf zusätzliche antigene Determinanten der intakten Geisseln hin. Ähnliche Ergebnisse erhielten ADA und NOSSAL¹¹ bei Salmonellen. Die Immunisierungsversuche zeigen dagegen eine weitgehende Übereinstimmung der antigenen Eigenschaften des Flagellins mit Geisseln. Bei den mit Geisseln immunisierten Tieren wurde auch ein Titeranstieg der O-Agglutinine beobachtet. Es kann daher angenommen werden, dass die Geisselsuspension trotz wiederholter Reinigung auch noch Reste von zellulären Bruchteilen enthielt. Das gewonnene Immunserum gegen Flagellin zeigte dagegen keinen Titeranstieg in der O-Agglutination. Das Antigen (Flagellin) war demnach völlig frei von somatischen immunogenen Bestandteilen und kann grundsätzlich zur Herstellung von reinen H-Seren verwendet werden.

Die H-Antigene bestanden üblicherweise aus einer Bakterienaufschwemmung mit 0,3%igem Formalinzusatz. Dieser Zusatz soll nach TOPLEY und WILSON¹² die Geisseln so an die Oberfläche fixieren, dass das O-Antigen nicht mehr der Wirkung der O-Antikörper ausgesetzt ist. Die Schwierigkeiten bei der Herstellung von reinen H-Antiseren (RISCHE et al.¹³, OLINICI und LESCINSCHI¹⁴) lassen schliessen, dass die Blockierung der O-Antigene nicht vollständig durch den Formalinzusatz erreicht werden kann. Auch STRACHILOFF et al.¹⁵ bestätigten, dass die üblichen formalinierten H-Antigene nicht nur die Bildung von H- sondern auch von O-Antikörpern auslösen. Die Untersuchungen von HABS¹⁶ zeigten, dass nach Absättigung mit O-Antigen die H-Titer in der Agglutination beträchtlich abfallen. Die Bemühungen um den Nachweis möglichst reiner H-Antikörper liegen darin begründet, dass sie weitaus höhere Spezifität besitzen als die O-Antikörper (SEELIGER⁶).

Die in den Tabelle II und III zusammengefassten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass *Listeria*-Geisseln weder mit *Staphylococcus aureus* noch mit Geisseln von *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Bacillus subtilis* eine Antigengemeinschaft besitzen. Durch die Ermittlung der reinen H-Antikörper mit Hilfe des beschriebenen Latex-Geissel-Tests oder durch Immunoglobulindifferenzierung (SEELIGER und EMMERING¹⁷, BRANDIS et al.¹⁸) lässt sich die Spezifität der *Listeria*-Serologie verbessern. Die Immunantwort bei *Listeria*-Infektionen ist aber im allgemeinen schwach, bei einer Meningitis oder Sepsis bleibt sie gelegentlich völlig aus. Deshalb kommt der *Listeria*-Serologie nur eingeschränkte Bedeutung zu.

¹¹ G. L. ADA, G. J. V. NOSSAL, J. PYE und A. ABBOT, Austr. J. exp. Biol. med. Sci. 42, 267 (1964).

¹² W. TOPLEY und G. S. WILSON, *Principles of Bacteriology and Immunity*, 2nd edn. (E. Arnold, London 1936).

¹³ R. RISCHE, F. LAUE, H. KÜHN und W. PAWLITSCHK, Zbl. Bakt. I. Abt. 185, 284 (1962).

¹⁴ N. OLINICI und S. LESCINSCHI, Zbl. Bakt. I. Abt. 190, 377 (1963).

¹⁵ D. STRACHILOFF, E. RICHTER und J. MOHR, Zbl. Bakt. I. Abt. 208/4, 507 (1968).

¹⁶ H. HABS, Zbl. Bakt. I. Abt. 201, 357 (1966).

¹⁷ H. P. R. SEELIGER und P. EMMERING, Z. med. Mikrobiol. Immun. 155, 218 (1970).

¹⁸ H. BRANDIS, H. WERNER und A. VIEBAHN, Klin. Wschr. 49, 989 (1971).