

2<sup>e</sup> expérience

Culture par agrandissement. Souche Ar. 3. Liquide de culture à double concentration de sels nutritifs. Concentration de la cholestérine: 2 par 1000. Volume final = 4900 cm<sup>3</sup>. Durée de l'expérience: 18 jours. Substance totale recueillie = 9,071 g. Portion cétonique = 1,239 g (rend. 13,64%). Le produit recristallisé de l'alcool méthylique-acétone (3:2) donne p. f. = 80–81°C qui n'est pas abaissé par le mélange avec le  $\Delta^4$  cholesténone.

3<sup>e</sup> expérience

Culture par agrandissement. Souche Ar. 3. Liquide de culture à double concentration de sels nutritifs. Concentration de la cholestérine: 0,625 par 1000. Volume final = 4000 cm<sup>3</sup>. Durée de l'expérience: 1 mois. Substance totale recueillie = 2,141 g. Portion cétonique = 0,236 g (rend. 11,02%). Le produit recristallisé de l'alcool méthylique-acétone (3:2) donne p. f. = 80°C en mélange.

Il résulte de ces observations que le pouvoir oxydant des microorganismes appartenant au genre *Flavobacterium* a réellement une extension remarquable, puisqu'il agit même sur des substances qui, comme le cholestérol, présentent une grande résistance aux attaques des microorganismes et des enzymes. Il est donc tout à fait justifié de poursuivre et d'approfondir les expériences entreprises avec ce bacille.

CARLO ARNAUDI et CESARINA COLLA

Institut de microbiologie générale, agricole et technique de l'Université de Milan, le 23 septembre 1948.

## Summary

Continuing his experiences upon the oxidative activities of organisms belonging to genus *Flavobacterium*, the author reports the conditions in which *Flavobacterium maris* effects the oxidation of cholesterol to cholestenone. This transformation is obtained within 20 days with yields which vary from 11 to 13%.

## On the Hemagglutinins of Beans and of Influenza Virus

We have extracted the hemagglutinin contained in the seeds of *Papilionaceæ*<sup>1</sup> in the form of a substance soluble in organic solvents, and have applied essentially the same method to the extraction of the hemagglutinin of influenza virus<sup>2</sup>. The tests were made by SALK's method<sup>3</sup>.

The vegetable hemagglutinin was extracted by soaking and grinding commercial dried beans in water, precipitating at  $p_H$  5.0 with an equal volume of ethanol, and treating the precipitate with iso-propanol. After thorough stirring, the mixture was centrifuged, and the resulting water-clear supernatant found to have hemagglutinating activity in high titer. The solution could be dried and the active material redissolved in organic solvents without loss.

With influenza virus the method was as follows: To 50 ml of infected allantoic fluid was added 1.25 ml of *N* acetic acid, which lowered the  $p_H$  to 5.0. To this was

then added 50 ml of ethanol and the mixture was allowed to stand some thirty minutes until clear flocculation occurred. The precipitate was collected by centrifugation, the supernatant discarded, and the tubes allowed to drain. The precipitate was then treated with 5 ml of iso-propanol. The water-clear supernatant, obtained after stirring and centrifuging, contained the hemagglutinin. As with bean hemagglutinin, the solution could be dried and the active material redissolved in organic solvents. The method was equally successful with virus purified by ultracentrifugation, whereas normal allantoic fluid yielded a hardly visible precipitate and no agglutinin.

The apparent yield of the procedure was in general much higher than would have been expected from the original, suggesting that red cells were much more susceptible to the agglutinin in finely dispersed suspension than to the same substance attached to particles (whether virus or ground seeds), so that the actual percentage of hemagglutinin removed remained unknown. Both bean and virus purified hemagglutinins proved extremely sensitive to traces of normal serum. Normal, as well as group A immune ferret serum, in dilution of 1:20,000, still caused appreciable inhibition of group A virus extracted hemagglutinin.

The purified hemagglutinins could be removed from solution by adsorption on red cells, but the amount of red cells needed was considerably larger than that required for the adsorption of virus under the same conditions. Red cells from which virus had been eluted, and which had become, as shown by HIRST, unable to adsorb virus, gave only suggestive evidence of being less able to adsorb a small amount of extract. Cells agglutinated by an excess of virus extract could be returned to their native state simply by heating to 45°C for a few minutes.

These facts show that the hemagglutinins of *Papilionaceæ* and of influenza virus are not proteins, and suggest that the two substances are of similar nature. According to BURNET and collaborators<sup>1</sup> the hemagglutinins of vaccinia and of ectromelia virus are phospholipidic complexes.

J. BOURDILLON

From the Division of Laboratories and Research, New York State Department of Health, Albany, November 30, 1948.

## Résumé

On a obtenu l'hémagglutinine des semences de papilionacées et celle du virus de l'influenza en solution dans les solvants organiques, par essentiellement la même méthode d'extraction. Ces deux substances semblent être apparentées.

<sup>1</sup> F. M. BURNET, *Nature* 158, 119 (1946). – F. M. BURNET and W. C. BOAKE, *J. Immunol.* 53, 1 (1946). – F. M. BURNET and J. D. STONE, *Australian J. Exp. Biol.* 24, 1 (1946). – J. D. STONE, *Australian J. Exp. Biol.* 24, 191 (1946); 24, 197 (1946).

<sup>1</sup> K. LANDSTEINER and H. RAUBITSCHKE, *Centralbl. Bakt. Orig.* 45, 660 (1908). – O. WIENHAUS, *Biochem. Z.* 18, 228 (1909). – E. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.* 11, 47 (1912). – M. EISLER and L. PORTHEIM, *Z. Immunitäts.* 47, 59 (1926). – K. LANDSTEINER, *The specificity of serological reactions*, rev. ed. (Cambridge, Harvard University Press, 1945), p. 5.

<sup>2</sup> G. K. HIRST, *Science* 94, 22 (1941); *idem.* *J. Exp. Med.* 75, 49 (1942). – L. MCCLELLAND and R. HARE, *Canad. Pub. Health J.* 32, 530 (1941). – G. K. HIRST, *J. Exp. Med.* 76, 195 (1942).

<sup>3</sup> J. E. SALK, *J. Immunol.* 49, 87 (1944).

## Un nuovo metodo specifico di determinazione della attività antianemico pernicioso

L'unica prova specifica e decisiva dell'azione anti-perniciosa di una sostanza è data dalla sua capacità di avviare l'emopoiesi megaloblastica verso la normoblastosi; manca però sino ad oggi un metodo fondato su tale capacità; che dia perciò garanzie di specificità, se si escludono le prove sull'ammalato di anemia perniciosa.

La mancanza di tale «test» ha rappresentato sempre una delle maggiori difficoltà per lo studio del principio antianemico<sup>1</sup>.

In questa nota comunico i primi risultati di un nuovo metodo fondato sulla misura della spinta verso la normoblastosi che si induce nel sangue circolante di embrione di pollo trattato con sostanze dotate di azione antianemico pernicioso. Questo metodo oltre ad avere il vantaggio di essere facilmente attuabile in laboratorio anche per esperienze in serie, mi sembra strettamente specifico perché in esso si impiega come substrato una particolare cultura pura di megaloblasti.

### Tecnica

Un certo numero di uova di pollo (p. es. 24) gallate, fresche vengono divise in quattro gruppi: un gruppo serve da controllo, gli altri tre per saggiare l'attività della sostanza in esame a diluizione diversa.

Nelle uova di controllo si inietta con tecnica adatta 0,1 cm<sup>3</sup> di soluzione fisiologica sterile; in ciascun uovo degli altri tre gruppi si inietta lo stesso volume della sostanza in esame a diluizioni varie. Tutte queste manipolazioni vengono eseguite con le massime cautele della asepsi. Si chiudono i fori praticati nelle uova con paraffina o collodio sterili e si lasciano riposare le uova in luogo fresco per 5-6 ore in modo che la sostanza diffonda; indi vengono messe in incubatrice a 39° ed ivi lasciate fino allo scadere della 60<sup>a</sup> ora.

A questo stadio (2 giorni e mezzo d'incubazione) non dovrebbero esistere normoblasti; infatti gli AA. (4-5) che si sono occupati di questo argomento concordemente ammettono che alla terza, quarta giornata compaiano le prime cellule della seconda generazione o generazione emoglobinica (normoblasti). Ho invece constatato nel 2,5% dei casi la presenza a questo stadio d'incubazione (60 ore) di normoblasti in percentuale dal 5 al 15%, osservazione di cui bisogna tenere conto nella valutazione dei dati sperimentali ottenuti.

Alla 60<sup>a</sup> ora di incubazione si aprono con tecnica adeguata le uova e dal cuore dell'embrione con pipette capillari sottilissime si aspira il sangue e lo si striscia avendo avvertenza di fare seccare gli strisci immediatamente per impedire la emolisi delle cellule.

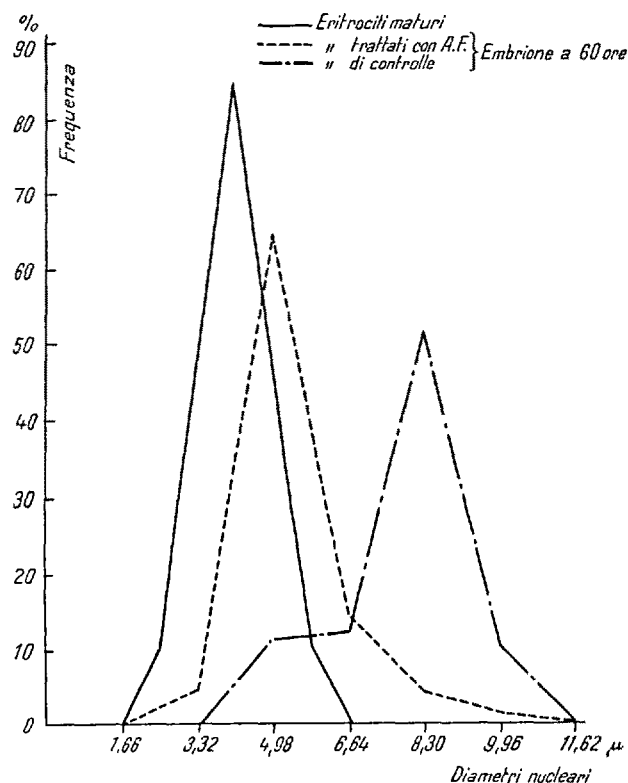
È necessario, durante la lettura del preparato, debitamente colorato, tenere presenti le comuni avvertenze per la rilevazione statistica dei dati, poiché lo striscio, per quanto eseguito con tecnica corretta, presenta sempre differenze di densità degli elementi nei vari punti del vetrino. Ad ogni modo, la lettura, se sarà eseguita correttamente, darà una rappresentazione finale delle distribuzioni assai vicina alla reale. Il numero minimo di cellule da prendere in considerazione è di 500 per ogni vetrino.

Sugli strisci di sangue colorati col metodo May Grunwald-Giemsa si possono calcolare sia le percentuali dei vari tipi degli elementi ematici presenti, sia misurarne le dimensioni. Ora, il rilievo quantitativo in base ai caratteri morfologici delle cellule ematiche, non è facile in queste condizioni sperimentali perché sotto lo stimolo delle sostanze antianemiche compaiono cellule a caratteri morfologici intermedi tra il megaloblasto ed il normoblasto con tali sfumature di passaggio da rendere difficile una classificazione ed una identificazione esatta.

Infatti il trattamento con acido folico o con estratto epatico provoca nell'embrione una riduzione dei diametri cellulari dei megaloblasti e l'avvicinamento alla normoblastosi degli elementi circolanti che si avvicinano

per l'aspetto morfologico e per dimensioni agli elementi maturi del pollo adulto<sup>1</sup>.

Poiché però senza sensibili variazioni nei risultati, si può ricorrere alla misura delle dimensioni cellulari; con un micrometro oculare tarato, ho determinato in precedenza le variazioni delle dimensioni delle cellule ematiche del pollo adulto normale su un grande numero di cellule di differenti animali.



Graf. No 1.

Le dimensioni medie degli eritrociti di pollo adulto di razza Rodhe Island (razza usata in tutti gli esperimenti) sono assai costanti e corrispondono ai seguenti dati:

nucleo: dimensioni medie  $\mu \cdot 4,15 \pm 0,83$ ,  
 diametro citoplasmatico massimo  $\mu \cdot 11,28 \pm 0,281$ ,  
 diametro citoplasmatico minimo  $\mu \cdot 6,516 \pm 1,095$ .

Delle varie dimensioni quella che in maniera rapida ci dà un sicuro criterio per giudicare lo stato di maturazione di un elemento ematico nel pollo, è la misura delle dimensioni nucleari tanto che se le dimensioni del nucleo della cellula esaminata sono comprese tra 4,98 e 3,32  $\mu$  si può con sufficiente sicurezza affermare che ci si trova di fronte ad un normoblasto.

Riportiamo nella graf. N° 1 le variazioni delle frequenze delle dimensioni nucleari di un campione di sangue di embrione di pollo, alla 60<sup>a</sup> ora di incubazione, di controllo, confrontate con quelle di un embrione della stessa epoca di incubazione trattato con 30  $\gamma$  di acido folico. È pure riportata come riferimento la distribuzione delle frequenze delle dimensioni nucleari di eritrociti di pollo adulto.

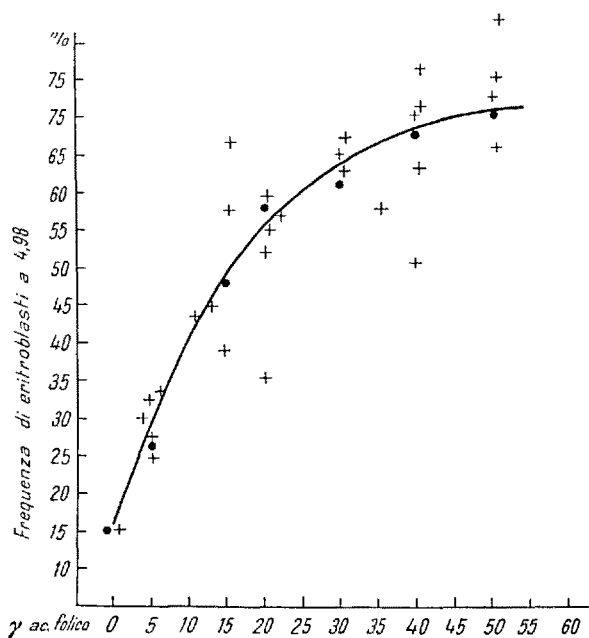
È agevole notare le differenze di dimensioni nei vari casi. La misura media nucleare dei megaloblasti è di

<sup>1</sup> G. ASTALDI e M. BALDINI, *Il farmaco* (Pavia 1948), Monografia.

<sup>1</sup> G. C. PERRI, *Boll. Soc. it. Biol. sper.* 24, 422 (1948); 24, 424 (1948). – E. STORTI, *Arch. Zool. it.* 31, 241 (1935). – A. FERRATA, *Le Emopatie* (Torino 1935).

8,30  $\mu$  negli embrioni di controllo, in quelli trattati con acido folico è di 4,98  $\mu$ .

Tra le dimensioni trovate sperimentalmente in un notevole numero di cellule trattate con sostanze dotate di proprietà antianemica (in particolare tra diametro massimo e diametro minimo, tra media dei diametri citoplasmatici e nucleari, in funzione di varie concentrazioni di acido folico) abbiamo potuto mettere in evidenza un legame analitico algebrico che dal grado e modo di deformazione dei diametri cellulari e nucleari permette di stabilire con buona approssimazione la misura della attività antianemica della sostanza usata. Questa relazione ancora in corso di elaborazione per la trattazione matematica definitiva ci consente già di costruire una curva empirica di taratura usando come sostanza standard una soluzione di acido folico a titolo noto, iniettato sotto forma di folato sodico a  $p_H$  7,6–7,7, a varie concentrazioni.



Graf. No 2.

Variando le concentrazioni di acido folico, variano pure le percentuali di normoblasti che si trovano nel sangue circolante di embrione di pollo trattato alla 60<sup>a</sup> ora di incubazione. Per normoblasti ho considerato le cellule aventi diametri nucleari compresi tra 3,32 e 4,98  $\mu$ . Dai dati di molti esperimenti, riportando le percentuali di cellule di questo tipo sulle ordinate e sulle ascisse le quantità di acido folico si ottiene una curva del tipo riportato nella graf. N° 2.

Analogo è l'andamento della curva se al posto della percentuale delle cellule aventi le suddette dimensioni si pone la percentuale delle cellule aventi caratteristiche morfologiche di normoblasti.

È possibile con questa curva empirica determinare con buona approssimazione; facendo la media di almeno cinque esperimenti, la attività antianemica di una sostanza in esame.

Ho limitato la taratura al tratto compreso fra 1 e 50  $\gamma$  perché al di là di questi limiti i valori sono molto incostanti.

È in corso di elaborazione una modificazione di questo metodo basata sulla trasformazione normoblastica del megaloblasto di embrione di pollo coltivato *in vitro*.

Questo metodo è assai delicato e preciso perché titola frazioni di acido folico, ma presenta particolari difficoltà per la facile emolisi di queste cellule embrionali sensibilissime a qualsiasi variazione osmotica.

G. C. PERRI

Istituto di chimica biologica dell'Università di Pavia, il 10 ottobre 1948.

### Summary

In the early stages of development chick embryo's blood-cells are megaloblasts. As the author has demonstrated previously, folic acid and hepatic extracts, when injected into fecundated hen's eggs, are able, under certain experimental conditions, to cause a transformation of megaloblastic cells into normoblasts, the author proposes to use this phenomenon as a new test for antianæmic activity.

There is a mathematical-algebraic relation between percentage of normoblasts present in chick-embryo blood (at 60 h of incubation, treated with antianæmic substance) and the concentration of folic acid or hepatic extract, which allows the activity of antianæmic substance to be expressed numerically.

The empirical standard curve of the quantitative relations between percentage of normoblasts found and concentrations of folic acid is reported.

The author finds that it is preferable to calculate the intensity of antianæmic activity from reduction in diameter of the cellular nucleus of chick-embryo blood-cells rather than from their morphological aspect.

Under these experimental conditions many cells are present whose morphological aspect is intermediate between normo and megaloblasts, and therefore classification is uncertain and difficult, while the cytometric values of nuclear diameters are clearly reduced to normoblast values.

The standard curve is not substantially modified if the values of cells having a 4.98 micron nuclear diameter are substituted to the percentage of cells having normoblasts' morphological character.

### Comparative Studies on the Coagulation Process with Heparin and Sea-Urchin Fertilizin

In the course of studies on the jelly coat of the sea-urchin egg, attention was drawn to the analogies in chemical composition of this structure and heparin, the natural inhibitor of blood coagulation. The jelly coat contains fertilizin<sup>1</sup>, which is considered essential for the fertilization of the sea-urchin egg. According to TYLER<sup>2</sup> the jelly coat substance and fertilizin are even identical. RUNNSTRÖM<sup>3</sup> endows fertilizin with antienzymatic properties in the process of fertilization membrane development, which he compares with blood coagulation.

A comparison was therefore made between the action of dissolved jelly coat substance and of heparin on the coagulation of pig-blood plasma<sup>4</sup>.

A diluted solution of heparin (Vitrum) (0.250 mg p. ml) and jelly coat solution of *Echinus esculentus* L. (1.050 mg p. ml) were subjected to (1) dialysis in a cellophane tube against distilled water, (2) heating in a water-bath for 90 minutes at 100°C, (3) oxidation with about

<sup>1</sup> E. VASSEUR and B. HAGSTRÖM, Ark. Zool. 37 A, No. 17 (1946).

<sup>2</sup> A. TYLER, Western J. Surg., Obstet., Gynecol. 50, 126 (1942).

<sup>3</sup> J. RUNNSTRÖM, Proc. VI. Int. Congr. Exptl. Cytol., in press (Stockholm 1947).

<sup>4</sup> J. H. FERGUSON, Ann. N.Y. Acad. Sci. 49, 486 (1948).