

ESTUDI BIOLÒGIC DELS VELS JOVES DE CULTIUS DE BACILS TUBERCULOSOS

per

L. NÈGRE

A. BOQUET

J. VALTIS

A. Marmorek (1), l'any 1900, havia estudiat les formes no àcid-resistents del bacil tuberculós i les considerarà com les formes joves d'aquest microbi.

Més endavant, Legroux i Magrou (2) han descrit l'estructura de les colònies del bacil de Koch i han constatat que estaven formades per una trama filamentosa que es colorava en blau i sobre la qual es desenvolupaven els bacils àcid-resistents. Bezançon i Philibert (3) han tingut la idea de fer un estudi morfològic dels vels joves de cultius tuberculosos. Han observat que aquests vels estaven compostos d'una matèria amorfa cianòfila, enmig de la qual neixien els bacils àcid-resistents i les granulacions. Per altra banda, Vaudremer (4) ha assenyalat que els bacils tuberculosos, cultivats en medis pobres en albúmines, perden en part llur poder patogen a mesura que minva llur àcid-resistència.

Lligant aquestes constatacions, hem cregut que seria interessant investigar com es comporten els bacils tuberculosos en llur virulència, propietats biològiques i poder antigènic, en aquest estadi de llur desenvolupa-

ment en què no posseeixen encara l'àcid-resistència o tot just comencen a presentar-la (5).

El nostre estudi s'ha fet sobre els vels joves de bacils tuberculosos en els sis primers dies de desenvolupament en el medi sintètic de Sauton.

ESTUDI DE LA VIRULÈNCIA DELS VELS JOVES

Per a eliminar el possible paper dels bacils que han servit per a la sembra, es fan tres o quatre repicatges cada quatre dies; per a ressemmbrar es pren, amb l'ansa de platí, la part perifèrica del vel que s'ha desenvolupat durant aquests quatre dies.

Al cap de cinc o sis passos, es pot admetre que els bacils de la primera sembra han desaparegut i que el vel jove no conté més que els bacils desenvolupats des de fa quatre dies.

Si es fa una preparació microscòpica d'un d'aquests vels, es constata que es compon en la seva major part de bacils no àcid-resistents, colorejables en blau, enmig dels quals estan disseminats bacils de Koch d'àcid-resistència més o menys pronunciada.

Es poden distingir dos aspectes diferents d'aquests vels joves en medi Sauton. Unes parts estan constituïdes per una pel·lícula prima i llisa; altres, per masses molt més espesses i escatoses i amb tendència a formar apilotaments esponjosos que es desenvolupen en profunditat. No hi ha cap diferència entre elles, respecte a llur contingut en elements àcid-resistents i en matèria cianòfila.

Si s'agafen, per separat, cada una d'aquestes parts i se'n sembren petits fragments en un nou recipient amb líquid de Sauton, es poden obtenir, aïllats per repi-

catges successius, cultius primis i cultius espessos. Però els primers, a mesura que envelleixen, tendeixen a tornar a la forma espessa i escatosa, de manera que, cap a la quarta setmana, els cultius dels dos tipus tenen exactament el mateix aspecte.

Hem estudiat la virulència dels vels joves per inoculació subcutània de 1/100 de mil·ligram al cobai, i de la mateixa dosi, per via intravenosa, al conill.

Aquestes investigacions s'han portat a cap amb la raça Bovina Vallée que, a les mateixes dosis i per les mateixes vies, mata el cobai i el conill en dos o tres mesos, amb lesions generalitzades de tots els òrgans.

Inoculació al cobai de vels de quatre dies

Experiment 1. — L'11 de gener del 1928, tres cobais reben subcutàniament en la cuixa dreta 1/100 de mil·ligram d'un vel de quatre dies. El 28 i el 30 de gener en moren dos. En llurs ganglis inguinals es demostra la presència de rars bacils àcid-resistents i de granulacions blaves.

El 2 de març en mor un altre. Presenta solament un gangli inguinal i un gangli sublumbar hipertrofiat, contenint bacils, sense altres lesions.

Experiment 2. — El 3 de febrer del 1928, tres cobais reben subcutàniament en la cuixa dreta 1/100 de mil·ligram d'un vel de quatre dies.

El dia 28 de febrer en mor un. No hi ha ganglí en el punt d'inoculació, però sí un petit gangli sublumbar hipertrofiat (lletia) que conté bacils àcid-resistents. No hi ha altres lesions.

El 28 de març, un mor. *No hi ha gangli inguinal.* Petit gangli sublumbar. *Ganglis tràqueo-bronquials molt grossos.* Algunes granulacions en la melsa.

El 12 d'abril mor un altre. Gangli gros inguinal i sublumbar. *No hi ha cap més lesió.*

Experiment 3. — El 27 de gener del 1928, quatre cobais reben subcutàniament a la cuixa dreta 1/100 de mil·ligram d'un vel de sis dies.

El 30 de març del 1928 se sacrifiquen. Tots presenten lesions de tuberculosi generalitzada.

D'aquests experiments es desprèn que el cobai inoculat subcutàniament amb 1/100 de mil·ligram de vel de quatre dies pot, sis setmanes després de la inoculació, no presentar gangli inguinal en el punt inoculat. Al cap de sis o vuit setmanes, els òrgans no són afectats o ho són molt feblement, mentre que els animals inoculats amb la mateixa dosi de vels de sis dies d'edat o més vells, presenten, al final d'aquest període, lesions molt més esteses.

Innoculació al conill de vels de quatre dies

Experiment 4. — El 16 de gener del 1928, dos conills reben per via venosa 1/100 de mil·ligram de vel de quatre dies.

El 19 de març del 1928, un mor. Presenta algunes rares granulacions en els pulmons. *No hi ha cap més lesió.*

El dia 1.^r de maig del 1928, en mor un altre, i per tota lesió presenta alguns tubèrculs pulmonars aïllats.

Experiment 5. — El 21 de gener del 1928, dos conills reben per via venosa 1/100 de mil·ligram de vel de quatre dies.

Els dies 11 i 20 d'abril del 1928, aquests animals moren; granulacions poc nombroses en els pulmons. *No hi ha cap més lesió.*

Experiment 6. — El 27 de gener del 1928, dos conills reben per via venosa 1/100 de mil·ligram de boví Vallée (vel de sis dies).

Moren el 19 i el 24 de març, amb nombrosos tuberculs en els pulmons, ronyons i melsa.

Així, doncs, la dosi de 1/100 de mil·ligram de vels joves (raça bovina Vallée), inoculada al conill per via venosa, solament determina en aquest animal, passats dos o tres mesos, granulacions disseminades en els pulmons, quan la mateixa dosi de la mateixa raça, d'un cultiu vell de més de sis dies, mata aquest animal al cap del mateix temps amb lesions pulmonars confluents i lesions en altres òrgans.

*Estudi comparat de la virulència dels vels prims
i dels vels espessos*

S. A. Petroff ha pretès que el bacil biliat de Calmette i Guérin podia dissociar-se en dos tipus.

Un *tipus R (rough)*, que dona en el medi d'aquest autor colònies escatoses plegades, espesses, no virulents per al cobai, i un *tipus S (smooth)*, que produeix colònies primes, llises, i que serien patògenes per al cobai.

Cap investigador no ha aconseguit fins ara, malgrat nombroses temptatives, confirmar les afirmacions de Petroff. Alguns, entre ells Piasecka-Zeyland, han pogut dissociar el B.C.G. en colònies escatoses i colònies llises. Però cap no ha confirmat que les colònies del tipus S tinguin un poder patogen per al cobai.

Quan hem observat que la raça bovina Vallée podia desenvolupar-se en medi Sauton, donant un vel llis o un vel espès, escatós i plegat, hem pensat que seria interessant de buscar si aquests dos aspectes dels vels corresponen a virulències diferents dels bacils que els componen.

Experiment 7. — El 28 de novembre del 1928 s'inocula subcutàniament a dos cobais 1/10 de mil·ligram de

vel espès de boví Vallée (cultiu de cinc dies), que havia sofert onze passos cada quatre dies; a dos més, 1/100 de mil·ligram; i a dos més, 1/1000 de mil·ligram.

Es repeteixen les mateixes inoculacions a les mateixes dosis i al mateix nombre de cobais, amb un vel fi de boví Vallée (cultiu de cinc dies) que havia sofert onze passos successius cada quatre dies.

Dosis d'1/10 de mil·ligram : 1.^o *Vel espès*. — Un cobai mor el 3 de gener del 1929. Presenta un petit gangli inguinal al punt d'inoculació i un petit gangli sublumbar del mateix costat. No hi ha cap més lesió. El segon cobai se sacrifica el 22 de febrer del 1929. Cap gangli en el punt d'inoculació. Petit gangli sublumbar del mateix costat. No hi ha cap més lesió.

2.^o *Vel prim*. — Dos cobais sacrificats el 3 de gener del 1929. No tenen ganglis inguinals ni sublumbar. Ganglis tràqueo-bronquials lleugerament hipertrofiats.

Dosis d'1/100 de mil·ligram : 1.^o *Vel espès*. — Els dos cobais sobreviuen. Sacrificats al cap d'un any, no presentaven cap lesió dels ganglis o dels òrgans.

2.^o *Vel prim*. — Un mor el 7 de gener del 1929; cap lesió ganglionar. Un mor el 26 de gener del 1929; presenta un petit gangli inguinal al punt d'inoculació, no casseós, i que conté alguns bacils de Koch. No hi ha altres lesions.

Dosis d'1/1000 de mil·ligram : 1.^o *Vel espès*. — Un mor el 13 de gener del 1929. Petit gangli (gra de blat) al punt d'inoculació i petit gangli sublumbar al mateix costat; ganglis tràqueo-bronquials, hipertrofiats. Recerca dels bacils de Koch en aquests darrers : negativa. L'altre cobai, sacrificat al cap d'un any, no presenta cap lesió.

2.^o *Vel prim*. — Un cobai és sacrificat el 1.^o de febrer del 1929. Petit gangli inguinal i sublumbar del mateix costat. Ganglis tràqueo-bronquials hipertrofiats.

Investigació dels bacils de Koch : negativa. Un mor el 12 de març del 1929. No hi ha lesions ganglionars ni visceral.

Experiment 8. — Dos conills reben, per via venosa, 1/1000 de mil·ligram de vel espès de boví Vallée (cultiu de quatre dies), que havia sofert onze passos successius cada quatre dies.

Les mateixes inoculacions es repeteixen amb vels fins del mateix origen. Els conills sacrificats dos mesos després de la inoculació presentaren tan sols unes poques granulacions a cada pulmó.

Aquests experiments no han demostrat que fos diferent la virulència dels vels fins i la dels vels espessos.

PRODUCCIÓ DE TUBERCULINA

Primerament hem buscat si els bacils de Koch en el *quart dia* de llur desenvolupament ja contenen tuberculina.

Experiment 9. — El 13 de gener del 1928, dos conills inoculats el 14 de setembre del 1927 amb 1/1000 de mil·ligram de boví Vallée, reben intravenosament 1 cc. d'una emulsió de bacils joves (vels de *quatre dies*).

Després d'aquesta inoculació, un ha reaccionat augmentant 1° la seva temperatura; l'altre un 1/5°.

Els bacils vells de quatre dies, desenvolupats en vel, en medi Sauton contenen, doncs, tuberculina.

Potser aquesta tuberculina ja ha difós en el líquid de cultiu, en aquest moment.

Experiment 10. — El 13 de gener del 1928, dos conills, inoculats el 14 de setembre del 1927 amb 1/1000 de mil·ligram de boví Vallée, reben intravenosament 1 cc. de líquid de cultiu.

Aquesta inoculació no ha provocat cap ascensió tèrmica.

Al quart dia de llur desenvolupament en vel en medi sintètic Sauton, la tuberculina present en els bacils no ha difós encara en el líquid de cultiu.

TOXICITAT

En un treball recent hem vist que les ceres i els greixos del bacil tuberculós, extrets per l'acetona, són tòxics per al conill en injeccions subcutànies i que es pot preservar aquest animal contra aquesta intoxicació amb injeccions d'antigen metil·lic.

Aquests resultats permetien de suposar que els bacils de quatre dies, en els quals les substàncies greixoses estan incompletament formades, són menys tòxics que els bacils vells.

Per a fixar conceptes, hem mirat primer de determinar la dosi de bacils tuberculosos (raça bovina Vallée virulent), esterilitzats a 115°, que mata segur un conill per injecció intravenosa.

Tots els conills que reben 15 cgr. de bacils morts, moren en un terme de deu a vint-i-cinc dies. En el període que segueix a la injecció, minven ràpidament de pes, prenen un aspecte caquètic i després moren amb lesions pulmonars que es tradueixen per una neumònia jaspada, i de vegades un exudat pleural.

Un cop determinada aquesta dosi mortal, hem repetit aquestes inoculacions de bacils morts al conill, a la mateixa dosi, amb bacils vells de quatre dies desenvolupats en medi sintètic Sauton.

Experiment II. — El 3 d'octubre, quatre conills han

rebut intravenosament 15 cgr. de bacils morts (raça bovina Vallée), vels joves de quatre dies.

Dos moren el 2 i el 15 de novembre, amb una lleugera congestió dels pulmons, però sense neumònia jaspada.

Un altre ha mort de diarrea, sense lesions pulmonars i sense pèrdua de pes. L'altre ha sobreviscut.

Aquests experiments demostren que la toxicitat dels bacils joves és sensiblement menor que la dels cultius d'un mes.

FENOMEN DE KOCH

Per últim, havíem de veure si els bacils joves són capaços de provocar l'aparició d'un fenomen de Koch típic.

Experiment 12. — Tres cobais, tuberculitzats des de quatre setmanes per injecció subcutània d'1/100 de mil·ligram de bovina Vallée, reben en el costat, per injecció intradèrmica, 5 mgr. de vels de quatre dies de bovina Vallée desenvolupats en medi Sauton. Tots tres han presentat un fenomen de Koch típic.

Els bacils joves són, doncs, capaços de provocar la formació del fenomen de Koch com els bacils més vells.

SENSIBILITZACIÓ A LA TUBERCULINA

També ens hem preguntat si els bacils joves, al quart dia de desenvolupament, sensibilitzen els animals a la tuberculina com els bacils dels cultius més vells.

En l'experiment 7 abans esmentat, els cobais inoculats per via subcutània amb 1/10 de mil·ligram, 1/100 i 1/1000 de mil·ligram de vels fins i de vels espessos,

vells de cinc dies, s'han provat per injecció intradèrmica de 0/1 cc. de tuberculina bruta diluïda al 1/10, quatre setmanes després de llur inoculació.

Els resultats d'aquestes proves han estat els següents.

Els dos cobais inoculats amb 1/10 de mil·ligram de vels fins han presentat una reacció necròtica; amb 1/100 de mil·ligram, un lleuger espesseïment i una reacció papulosa; amb 1/1000 de mil·ligram, una reacció negativa i un lleuger espesseïment.

Els dos cobais inoculats amb 1/10 i 1/100 de mil·ligram de vels espessos, lleuger espesseïment; amb 1/1000 de mil·ligram, reacció negativa.

Amb 1/1000 de mil·ligram de bacils joves (dosi que sensibilitza sempre els cobais inoculats, quan es tracta de cultius vells), els cobais, al cap de sis setmanes, han estat irregularment sensibilitzats a la tuberculina.

La mateixa experiència de sensibilització s'ha fet en el conill.

Experiment 13. — El 8 de gener del 1929, cinc conills reben intravenosament 1/100 de mil·ligram de vels joves de quatre dies. El 26 de febrer del 1929, s'han provat per injecció intravenosa de 0/1 cc. de tuberculina bruta a l'1/10. No han presentat cap pujada tèrmica.

Aquests dos conills, doncs, no han estat sensibilitzats a la tuberculina al cap de sis setmanes de la inoculació intravenosa d'1/100 de mil·ligram de bacils de quatre dies.

PODER ANTIGÈNIC DELS VELS JOVES

Per a precisar encara millor els caràcters biològics dels vels de quatre dies, hem buscat si tenien un poder antigènic més elevat que els bacils de més edat.

Experiment 14. — El 4 de maig del 1928 s'inoculen intravenosament a tres conills A4, A5 i A6, 1 cgr. de bacils vius (raça bovina Vallée), extrets d'un vel vell de quatre dies en medi Sauton.

Els animals es sagnen i llur sèrum es titula en contingut en anticossos.

El dia 11 maig, el sèrum de A4	conté	60 unitats d'anticossos.
El dia 11 maig, el sèrum de A5	conté	60 unitats d'anticossos.
El dia 11 maig, el sèrum de A6	conté	40 unitats d'anticossos.
El dia 18 maig, el sèrum de A4	conté	120 unitats d'anticossos.
El dia 18 maig, el sèrum de A5	conté	60 unitats d'anticossos.
El dia 18 maig, el sèrum de A6	conté	40 unitats d'anticossos.

Experiment 15. — El dia 4 de maig del 1928 s'inocula 1 cgr. de bacils vius (raça bovina Vallée), extrets d'un vel de setze dies en medi Sauton, en la vena de 3 conills A1, A2 i A3.

El dia 11 maig, el sèrum de A1	conté	80 unitats d'anticossos.
El dia 11 maig, el sèrum de A2	conté	40 unitats d'anticossos.
El dia 11 maig, el sèrum de A3	conté	40 unitats d'anticossos.
El dia 18 maig, el sèrum de A1	conté	40 unitats d'anticossos.
El dia 18 maig, el sèrum de A2	conté	20 unitats d'anticossos.
El dia 18 maig, el sèrum de A3	conté	40 unitats d'anticossos.

De la comparació d'aquestes xifres es desprèn que la inoculació de bacils joves al conill provoca, en el sèrum, la formació d'una quantitat d'anticossos més elevada que la inoculació de bacils més vells.

En el cavall també hem obtingut, per inoculació intravenosa de bacils joves vius, una abundant formació d'anticossos.

Experiment 16. — Un cavall rep, el 4 de maig del 1928, per injecció intravenosa, 30 mgr. de bacils humans (vels de quatre dies en medi Sauton), escalfats una hora a 65°.

Les injeccions es repeteixen el dia 11 i el 19 de maig i el 1.º de juny.

L'11 de maig, el sèrum d'aquest cavall conté 60 unitats d'anticossos.

El 19 de maig, el sèrum d'aquest cavall conté més de 1400 unitats d'anticossos.

El dia 1.^r de juny, el sèrum d'aquest cavall conté 8000 unitats d'anticossos.

PROPIETATS IMMUNITZANTS

Se sap que diferents assaigs de vacunació preventiva fets amb els bacils tuberculosos morts per agents químics o físics han fracassat fins a la data. Certs experimentadors han atribuït aquests fracassos, sigui a la forta proporció de substàncies cero-greixoses contingudes en aquests bacils i que s'oposen a la reabsorció d'aquests per part de l'organisme, sigui a les alteracions de les proteïnes microbianes, per l'efecte de les substàncies químiques emprades per a desgreixar o per a modificar els cossos bacil·lars. Teníem, doncs, raons per a preguntar-nos si els bacils joves vius, esterilitzats pel calor o procedents de races avirulents com el B.C.G., no posseeixen, degut a la petita quantitat de substàncies cero-greixoses que contenen, propietats immunitzants més pronunciades que els bacils que han assolit llur desenvolupament complet.

Experiment 17. — Dos lots, de quatre conills cada un, reben per injecció intravenosa, a quatre dies d'interval, el 30 de juny i el 4 de juliol del 1928, 5 cgr. de bacils tuberculosos (raça bovina Vallée) escalfats una hora a 70°. Per al primer lot, cultius vells d'un mes; per al segon, vels joves de quatre dies desenvolupats en medi Sauton.

Tots aquests animals, ensems que dos controls, han

estat provats un mes més tard per inoculació intravenosa d'1/1000 de mil·ligram de bovina Vallée.

Els conills dels dos lots i els controls moren aproximadament en els mateixos termes i amb lesions que tenen sensiblement la mateixa gravetat i el mateix desenvolupament : grossos tubèrculs bastant nombrosos en els pulmons, i algunes lesions renals.

En una segona sèrie d'experiments, hem buscat l'acció immunitzant dels vels joves vius de la raça bovina Vallée, que, a la dosi d'1/100 de mil·ligram, no tuberculitzen el conill.

Experiment 18. — Cinc conills reben, el 8 de gener del 1929, per injecció intravenosa, 1/100 de mil·ligram de la raça bovina Vallée (vel de quatre dies en medi Sauton).

El 12 de febrer, es proven, així com dos controls, per injecció intravenosa d'1/1000 de mil·ligram de la raça bovina Vallée.

El 27 de febrer i el 23 de març, dos conills moren prematurament sense lesions.

El 30 d'abril, els tres sobrevivents són sacrificats, així com els controls. Un d'ells presenta, com els controls, lesions pulmonars confluents i lesions renals. Els altres dos tenen solament dos o tres nòduls pulmonars espaiats.

En una tercera sèrie d'experiments, hem comparat el poder immunitzant del bacil biliat Calmette-Guèrin a l'edat d'un mes i a l'edat de quatre dies.

Experiment 19. — Cinc conills han rebut intravenosament 15 mgr. de B.C.G. procedent d'un vel vell d'un mes en medi sintètic Sauton (360° pas en medi biliat); cinc altres conills han rebut intravenosament la mateixa quantitat de bacils B.C.G., que havien sofert el mateix nombre de passos, però presos del medi Sauton al quart dia del desenvolupament del vel.

Tots aquests animals, així com dos controls, han estat provats un mes després per injecció intravenosa d'1/1000 de mil·ligram de bacils tuberculosos (raça bovina Vallée).

Els dos conills control es moren tres mesos després de la inoculació de prova, amb lesions pulmonars confluents i nombrosos tubèrculs en els ronyons.

En el lot d'animals vacunats amb el cultiu B.C.G. d'un mes, els conills que han mort en els mateixos termes que els controls que els han sobreviscut presentaven grossos tubèrculs pulmonars aïllats i rares granulacions en els ronyons.

En el lot d'animals vacunats amb els vells de B.C.G. vells de quatre dies, les lesions estaven netament menys pronunciades : tan sols quatre o cinc petits tubèrculs en cada pulmó i cap lesió renal, excepte en un conill que tenia dos petites granulacions a cada ronyó.

D'aquests experiments es desprèn que els cultius joves de bacils tuberculosos, esterilitzats per escalfament, no posseeixen cap poder immunitzant.

Els mateixos cultius vius, a la dosi d'1/100 de mil·ligram, semblen conferir al conill una resistència relativa.

Els vells joves de B.C.G. donen al conill una resistència a les infeccions de prova molt més marcada que la que s'obté habitualment per injecció de cultius vells de trenta dies.

CONCLUSIONS

En els cinc primers dies de llur desenvolupament, els vells joves de bacils tuberculosos, obtinguts en medi sintètic Sauton, presenten una virulència molt inferior a la dels cultius vells de tres o quatre setmanes.

Inoculats a la dosi d'1/100 de mil·ligram al cobai,

per via subcutània, i al conill per via intravenosa, provoquen, en el primer, l'aparició de lesions sobretot ganglionars i en el segon, algunes granulacions localitzades en els pulmons.

Els vels fins i els vels espessos, vells de cinc dies, presenten la mateixa virulència per al cobai que per al conill.

Els bacils vells de quatre dies, desenvolupats en vel, en medi de Sauton, contenen tuberculina, però, en aquest moment, encara no ha difós en el líquid de cultiu.

Són menys tòxics per al conill que els bacils vells de quatre setmanes, però són capaços de determinar, per inoculació al cobai tuberculós, la formació del fenomen de Koch.

Llur poder sensibilitzant a la tuberculina és inferior al dels bacils vells, però llur poder antigènic in vivo és més elevat.

Els bacils joves, morts per la calor, inoculats al conill per via venosa, es comporten com cultius vells esterilitzats i no tenen, per a aquest animal, cap poder immunitzant.

La infecció lleugera provocada en el conill per la inoculació de bacils joves vius dóna a aquest animal una certa resistència a la infecció de prova virulent.

Els vels joves de bacils B.C.G., desenvolupats en medi Sauton, semblen fruit d'un poder immunitzant superior al dels bacils vells.

*Laboratori del professor Calmette.
Institut Pasteur. París.*

BIBLIOGRAFIA

1. *Marmorek*, Acad. Méd. Paris, 50, 332, 465, 480, 1903; Berl. Med. Klin., 3, 58, 1906; Berl. Klin. Woch., 44, 18, 1907.
2. *A. Legroux i J. Magrou*, Annals. Inst. Pasteur, 84, 117.
3. *F. Bezançon i A. Philibert*, Soc. Etudes scientifiques sur la tuberculose, 32, 12 març 1914.
4. *A. Vaudremer*, C. R. Soc. Biol., 84, 259, 775; 85, 1055.
5. *L. Nègre, A. Boquet i J. Valtis*, C. R. Soc. Biol., 99, 45; 101, 441, 901; 102, 836.