

The material has now to be lyophilized, i.e. to undergo rapid freezing, quick dessication under a vacuum of 10^{-3} mm Hg in less than an hour and sealing under vacuum.

The antigen is now a fine white pellicle which is extremely friable. By addition of a definite quantity of saline, the antigenic emulsion is instantaneously reconstituted and consequently ready for use.

We compared the reaction of fresh antigenic emulsions and those of the same lyophilized reconstituted ones with experimental serums (in particular with the standard-serum of the "Office International des Epizooties") and similarly with those of men and animals suspected of brucellosis or with a declared infection. The results of these comparative studies are absolutely identical to those made with the non-lyophilized antigen (limit of the % of agglutinability, 50% agglutination, rapidity of agglutination, etc.)

The lyophilized antigens can be conserved at least one year at laboratory temperature or at 37° without any alteration. They resist heating at 50° in a water-bath for 30 days at least and boiling at 100° for a minimum of 10 min.

The method we have just described and the use of lyophilized antigen in practice, will, we think, be one step forward in the direction towards standardisation of the various methods for the brucellosis serologic diagnosis.

P. HAUDUROY and F. TANNER

Institute of Hygiene, University of Lausanne, October 10, 1952.

Résumé

Les auteurs ont réussi à mettre au point pour les sérodiagnostics brucelliques des antigènes stabilisés par lyophilisation. L'agglutinabilité de ces antigènes ne varie pas avec le temps. Ces antigènes sont très faciles à utiliser et ils semblent apporter une solution définitive à un problème étudié depuis longtemps. Les auteurs ont fait vérifier leurs propres résultats par divers laboratoires spécialisés qui les ont confirmés.

Speicherung arteigener und artfremder Proteine in den Zellen des Retikuloendothels

Zur mikroskopischen Untersuchung des weiteren Schicksals parenteral verabreichter nativer Proteine stand bisher keine brauchbare Methode zur Verfügung. Es gelang uns, ein mikrotechnisches Verfahren auszuarbeiten, mit dem die Speicherung der verschiedenen Proteine in den Zellen des retikuloendothelialen Systems nachgewiesen werden kann. Hierbei wird das Eiweiss in den Zellen durch eine spezielle Fixierungs- und Färbungstechnik sichtbar gemacht, so dass der mikroskopische Nachweis ohne jede vorgängige «Markierung» des Eiweisskörpers erzielt werden kann.

Die mit unserer Methode an Mäusen angestellten Versuche haben gezeigt, dass nicht nur verschiedene artfremde Proteine, sondern auch arteigenes Serumeiweiss von den retikuloendothelialen Zellen aufgenommen und granulär gespeichert wird. Schon aus den bisherigen Ergebnissen geht deutlich hervor, dass diese Methodik neue experimentelle Möglichkeiten zur Klärung zahlreicher wichtiger physiologischer und immunbiologischer Probleme eröffnet.

Unser Verfahren ist in seiner jetzigen Form zum Nachweis der Proteine im subkutanen und intermuskulären

Bindegewebe mit Erfolg anwendbar, wo die Speicherung bis in die feinsten morphologischen Einzelheiten verfolgt werden kann. Auch ist es zum Nachweis der Proteinspeicherung in den Kupfferschen Zellen besonders geeignet.

Technik. Es werden aus dem lockeren Bindegewebe feine Lamellen ausgeschnitten und mit Zupfnadeln auf fettfreien Objektträgern rasch ausgebreitet und feucht fixiert. Aus der Leber werden Quetschpräparate hergestellt und nach dem Trocknen weiterbehandelt.

1. Übergiessen des Präparates auf dem Tragglass mit einer zweiprozentigen Lösung von braunem Goldchlorid, die 60 min darauf belassen wird.
2. Gründliches Auswaschen des Metallsalzes und Nachfixierung mit mehrmals gewechseltem absolutem Methanol (2 min).
3. Übergiessen des Präparates mit May-Grünwaldschem Farbstoff in hoher Schicht, den man bis zur stark vorgeschrittenen Eindickung einwirken lässt.
4. Differenzierung mit absolutem Äthanol oder Isopropanol.
5. Unterbrechung der Differenzierung mit Xylol; sorgfältiges Auswaschen mit mehrfach gewechseltem Xylol.
6. Einschliessen in Copaiva-Balsam. Aufbewahren im Dunkeln.

Wenn die Differenzierung im richtigen Moment unterbrochen wird, so werden bei gleichzeitiger Kern- und Eosin-Kontrastfärbung die Eiweissgranula in den retikuloendothelialen Zellen dunkelviolettfärbt.

Unseren Untersuchungen zufolge ist der wichtigste Speicherungsort für die parenteral eingeführten nativen Proteine das Histiozytensystem des Bindegewebes. Es können sich in diesen Zellen überraschend schnell gewaltige Proteinmassen ablagern, die dann aber auch rasch wieder abgebaut oder irgendwie eliminiert werden.

Besonders wenn den Mäusen intravenös Kaninchenserum injiziert wurde, erhielten wir diese intensiven Speichungsbilder. So war zum Beispiel 6 h nach Einspritzung von 0,6 ml/25 g Körpergewicht das Zytoplasma sämtlicher Histiozyten des lockeren Bindegewebes reich mit Proteinkugeln gefüllt (Abb.1). Nach 24 h konnten



Abb. 1. Maus. Lockeres Unterhautbindegewebe, Dorsalregion. Reichliche Eiweisspeicherung in den Histiozyten 6 h nach intravenöser Einspritzung von 0,6 ml Kaninchenserum auf 25 g Körpergewicht.

aber nur noch kleine Granula in den Histozyten gesichtet werden und nach 4 Tagen keine. Nach Injektion von 1 ml, welche Dosis sich bereits als toxisch erwies, hatten diese Zellen schon nach 3–4 h Eiweiss in noch grösserer Menge gespeichert, was in der bedeutenden Grösse der Eiweisskugeln zum Ausdruck kam (Abb. 2).

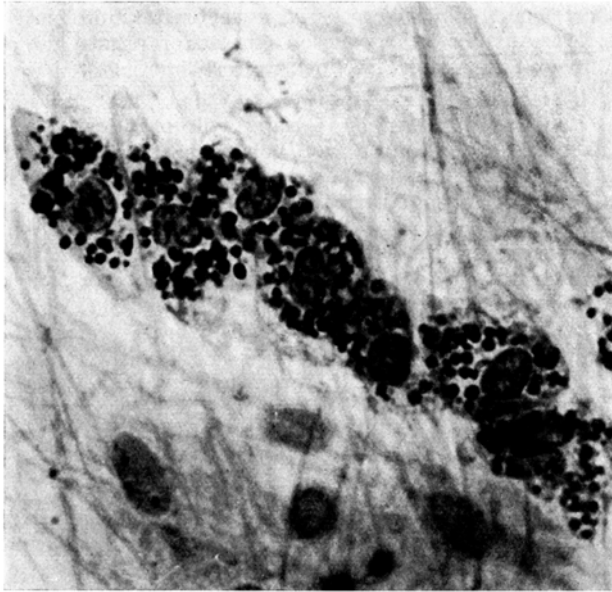


Abb. 2. Maus. Lockeres Unterhautbindegewebe, Dorsalregion. Hochgradige grosströpfige Eiweisspeicherung in den Histozyten 4 h nach intravenöser Einspritzung einer toxischen Menge von 1 ml Kaninchenserum auf 25 g Körpergewicht.

Nach intravenöser Injektion von Hühnereiweiss (1 ml zwanzigprozentige Lösung) sahen wir 6 h später vorerst nur feine Eiweissgranula in den Histozyten, 24 h später aber waren diese bereits mit kompakten Eiweissbrocken gefüllt.

Erhielten die Mäuse art eigenes Serum intravenös injiziert, so ergab sich die grundlegend wichtige Tatsache, dass auch dieses von den Histozyten und Kupfferschen Zellen gespeichert wird. Um dies gut demonstrieren zu können, müssen grössere Serumdosen gegeben werden. Wenn auf zwei Dosen verteilt 1,6 ml/20 g Mäuseserum intravenös injiziert wurde, wurde das Protein schon nach 4 h sichtbar, und nach 24 h waren sämtliche Histozyten mit feinen und mittelgrossen Proteingranula dicht gefüllt (Abb. 3). Auch in den Sternzellen konnte die granuläre Speicherung nachgewiesen werden (Abb. 4). Nach Verlauf von 4 Tagen waren die Histozyten bereits «leer».

Diese letzteren Versuche deuten darauf hin, dass die Histozyten die Blutplasmaproteine schon physiologischerweise andauernd in sich aufnehmen. Dass unter normalen Verhältnissen das Zytoplasma «leer» erscheint (das heisst, darin keine Proteintröpfchen zu sehen sind), muss dahin gedeutet werden, dass in diesen Zellen Import und Eliminierung der Proteine im Gleichgewicht miteinander stehen.

Im Laufe unserer neuesten, an anderer Stelle zur Veröffentlichung gelangenden Untersuchungen konnten wir ausser Proteinen auch die Speicherung mehrerer anderer natürlicher und synthetischer Polymere in den Speicherzellen mit speziellen Färbungsmethoden sichtbar machen (Mucin, Gummiarabikum, Polyvinylpyrrolidon usw.). Diese Resultate weisen darauf hin, dass alle hydrophilen makromolekulären Polymere infolge ihrer phy-

sikochemischen Eigenschaften zwangsläufig im retikuloendothelialen System gespeichert werden.

Bisher wurde ausschliesslich nach der zellulären Verteilung und Speicherung artfremder Proteine geforscht, um den zellulären Schauplatz der «Verarbeitung» der Eiweissantigene feststellen und daraus Schlüsse auf den Ort der Antikörperproduktion ziehen zu können. Eine optische Beobachtung war bisher nur bei Farbstoffazoproteinen möglich, deren granuläre Speicherung im RES ohne weiteres sichtbar ist. Unseres Erachtens ist es aber sehr gewagt, aus dem Verhalten der Farbstoffazoproteine allgemeine Schlussfolgerungen aufzustellen. SMETANA und JOHNSON¹, SMETANA² sowie McMASTER und KRUSE³ geben an, dass diese monatelang in den retikuloendothelialen Zellen persistieren. Unsere auf natives Serum- bzw. Eiereiweiss bezüglichen eigenen Untersuchungen bieten auch hinsichtlich der Speicherdauer ein wesentlich anderes Bild. Jedenfalls eröffnet unser Verfahren, welches die intakten Proteine selbst nachweist, auch in immunologischer Hinsicht neue experimentelle Möglichkeiten. Vor kurzem haben COONS⁴ und Mitarbeiter versucht, die Lokalisation verschiedener Eiweissantigene mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachzuweisen. Dieses im Prinzip sehr geistreiche Verfahren ist fast beispiellos kompliziert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen lassen erkennen, dass das morphologische Leistungsvermögen des Verfahrens sehr beschränkt ist. Die Ergebnisse dieser Autoren stimmen nicht mit den unsrigen überein. Besonders ihre Angabe, dass das eingespritzte Eiweiss schon nach 10–30 min vorwiegend im Zellkern angereichert wird, weist unseres Erachtens darauf hin, dass ihre Befunde grösstenteils auf der Entstehung von Kunstprodukten beruhen.

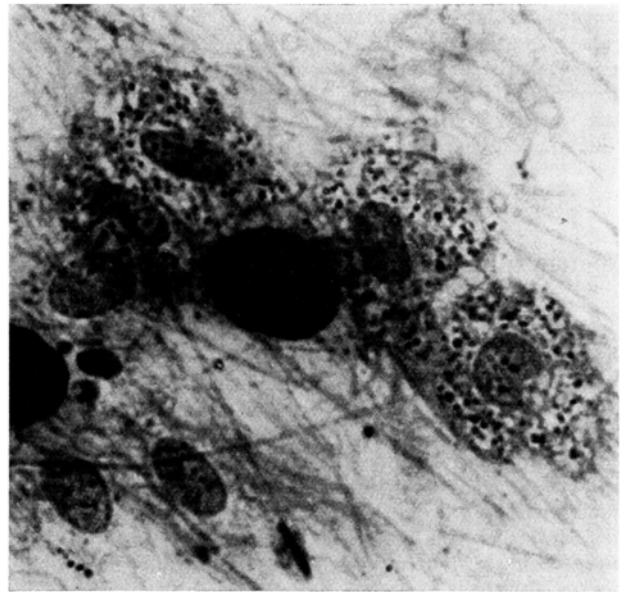


Abb. 3. Maus. Subkutanes Bindegewebe, Dorsalregion. Reichliche feine Eiweisspeicherung in den Histozyten 23 h nach der intravenösen Verabreichung von insgesamt 1,6 ml Mäuseserum. Fibrozytenkerne und 2 Mastzellen im Blickfeld.

Vor kurzem machten wir darauf aufmerksam, dass auch die Frage der Speicherung eigener Plasmaproteine

¹ H. SMETANA und F. R. JOHNSON, Amer. J. Path. 18, 1029 (1942).

² H. SMETANA, Amer. J. Path. 23, 255 (1947).

³ PH. D. McMASTER und H. KRUSE, J. Exp. Med. 94, 323 (1951).

⁴ A. H. COONS, E. H. LEDUC und N. H. KAPLAN, J. Exp. Med. 93, 173 (1951).

ein biologisches Problem von grundlegender Bedeutung ist (JANCSÓ und JANCSÓ-GÁBOR)¹. Im Laufe unserer Untersuchungen über den Speicherungsmechanismus des Germanins gelangten wir zu der Überzeugung, dass die retikuloendotheliale Speicherung der sauren Farbstoffe und zahlreicher anderer Substanzen darauf beruht, dass die Zellen des RES Plasmaeiweiss aus der Umgebung fortwährend aktiv in sich aufnehmen. Zusammen mit dem Eiweiss gelangen dann auch Substanzen, die mit den Plasmaproteinen leicht Bindungen eingehen, in die Zellen und werden dort gespeichert (JANCSÓ und JANCSÓ-GÁBOR¹, siehe auch JANCSÓ²). Mit dem Nachweis der Speicherung eigener Serumproteine wurde diese Konzeption endgültig bewiesen.

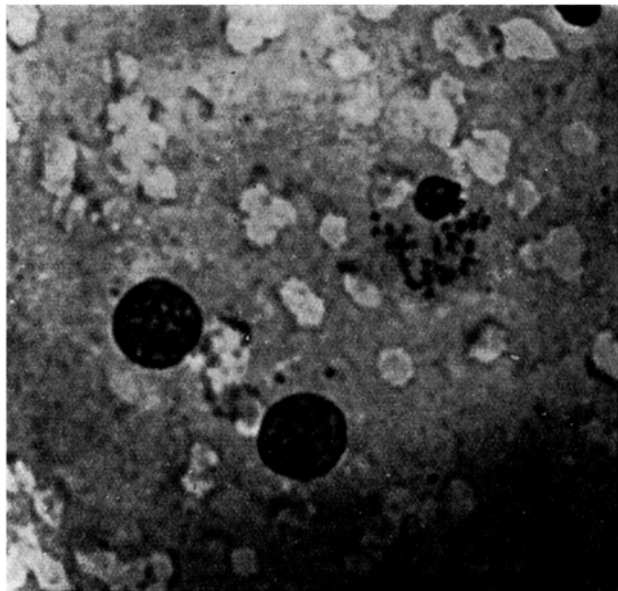


Abb. 4. Maus. Quetschpräparat aus der Leber. 11 h nach intravenöser Einspritzung von 1 ml Mäuseserum auf 20 g Körpergewicht. Kupfersche Sternzelle mit vergrössertem Leib und zahlreichen Eiweissgranula. Zwei Leberzellkerne im Blickfeld.

Eine interessante Ergänzung zu diesen Ergebnissen bringen unsere Untersuchungen über den Mechanismus des Arthus-Phänomens (JANCSÓ und JANCSÓ-GÁBOR³). In diesen Experimenten gelang es uns, die im lebenden Gewebe sich abspielende Immunreaktion sichtbar zu machen und zu beweisen, dass die gebildeten Antigen-Antikörperkomplexe von den Histiozyten intensiv gespeichert werden und die heftige Entzündungsreaktion durch die intrazellulär aufgenommenen Eiweissmassen ausgelöst wird.

N. JANCSÓ und A. JANCSÓ-GÁBOR

Pharmakologisches Institut der Universität Szeged, Ungarn, den 21. Juli 1952.

Summary

The cellular distribution and storage of protein in the tissues of the mouse was examined after intravenous injection of hen egg albumen, rabbit and mouse serum,

¹ N. JANCSÓ und A. JANCSÓ-GÁBOR, Acta Phys. Acad. Sc. Hung. (im Druck); Nature 170, 567 (1952).

² N. JANCSÓ, Z. ges. exp. Med. 64, 256 (1929); Klin. Wschr. 10, 537 (1931).

³ N. JANCSÓ und A. JANCSÓ-GÁBOR, Nature 170, 568 (1952); Acta Phys. Acad. Sc. Hung. (im Druck).

respectively. The new microtechnical method described allows direct visualization of native proteins stored as droplets by the histiocytes of the connective tissue and by the Kupffer cells. The method is based on the fact that subsequently to fixation with gold chloride and methanol the protein droplets in the cytoplasm can be intensely stained with methylene blue eosinate. Thus it becomes possible to trace the course of the proteins in the body without any previous labelling.

The main site of storage of introduced native proteins is the histiocytic system of the connective tissue. Especially foreign proteins will accumulate very rapidly and in large amounts in the histiocytes, to disappear again soon.

Particular significance should be attributed to the fact that even homologous serum proteins constantly enter the reticuloendothelial cells and may be stored as granules. Together with the protein, the substances adsorbed to it gain access to the cells, offering an explanation for the reticulo-endothelial storage of acid vital dyes, of germanin and of many other important substances. It can be regarded as a general rule that every macromolecular polymer of hydrophilic character—those of natural origin, as for instance the polymeric carbohydrates, glycoproteins and proteins, as well as synthetic products like polyvinyl-pyrrolidone—enters the reticulo-endothelial cells and is stored as granules.

Der serologische Antikörperrnachweis bei Heufieberpatienten mit Hilfe des Antiglobulintests nach Coombs

Wir wurden zu den vorliegenden Untersuchungen angeregt einerseits durch die Mitteilungen von BOYDEN¹, ALPERSTEIN² und anderen, welche Proteinantigene auf vorbehandelte Erythrozyten oder Bakterien aufluden und diese beladenen («coated») Zellen dann durch die entsprechenden Antisera zur Agglutination brachten, andererseits durch die Arbeiten von COOMBS und BRITTON³ und KALLÓS⁴, die auf die Verwendungsmöglichkeiten des Antiglobulintests nach COOMBS zum Nachweis von Antikörpern bei Allergien aufmerksam gemacht hatten.

Wir gingen von der Überlegung aus, dass, wenn trockener Pollen beim Scratchtest positive Reaktionen verursacht, diese Pollenkörner *in toto* mit den Antikörpern reagieren müssen. Es würden demnach die Antikörper direkt auf der Pollenoberfläche fixiert, und der auf diese Weise beladene Pollen sollte mit Hilfe des Antiglobulintests nach COOMBS zur «Agglutination» gebracht werden können.

Negativ verlaufene Vorversuche beim Coombstest an beladenem Pollen erklärten wir uns durch die Theorie von COOMBS⁵. Nach dieser muss angenommen werden, dass die Rezeptorenstellen nicht an der Oberfläche des antigenträgenden Korpuskels liegen. So kann es vorkommen, dass bei tiefliegender Rezeptorenstelle der dort gebundene spezifische Antikörper zusammen mit dem Antiglobulinantikörper eine zu kurze Kette bildet, um über die Oberfläche des antigenträgenden Substrates hinauszuragen. Die Kette kann sich daher nicht mit ana-

¹ S. V. BOYDEN, J. exp. Med. 93, 107 (1951).

² B. B. ALPERSTEIN, Ann. Allergy 3, 110 (1945).

³ R. R. A. COOMBS *et al.*, Int. Arch. Allergy 2, 222 (1951).

⁴ P. KALLÓS, Int. Arch. Allergy 2, 70 (1951).

⁵ R. R. A. COOMBS *et al.*, Brit. J. exp. Pathol. 32, 195 (1951).