

con la preparazione standard Internazionale¹ della quale 1 mg = 1 unità. I saggi sull'animale ipofisectomizzato sono stati eseguiti con 1-0,5-0,25 mu (milliunità) ed i risultati sono riportati nel grafico della figura 2.

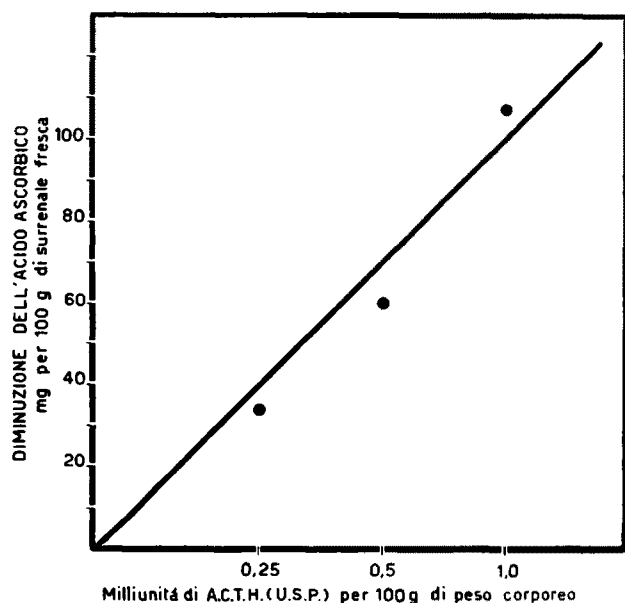


Fig. 2. Diminuzione dell'acido ascorbico nelle surrenali per somministrazione endovena di A.C.T.H. (Provisional U.S.P. Corticotropin Reference Standard).

Tenendo presente che la diminuzione media dell'acido ascorbico nelle surrenali determinata da 0,5 cm³ di plasma è di $31,18 \pm 3,73$ e quella dell'ultrafiltrato è di $40,6 \pm 4,19$, si può dedurre in base al grafico della figura 2 che il contenuto di A.C.T.H. è di 40 mu per 100 cm³ di plasma e di 52 mu per 100 cm³ di ultrafiltrato.

Conclusioni. Dai dati riportati appare innanzitutto confermato che il plasma di individuo normale possiede attività corticotropa. Anche se le diminuzioni di acido ascorbico nelle surrenali osservate con la nostra tecnica (iniettando 0,5 cm³ di plasma fresco per 100 g di peso corporeo) non sono molto elevate, pur tuttavia noi riteniamo che questi dati siano sufficientemente significativi, tanto più se si tengono presenti i risultati ottenuti nelle prove in bianco usando soluzione fisiologica. D'altra parte col nostro ceppo di ratti, tali dati corrispondono a quelli ottenuti usando 0,25-0,50 mu della preparazione standard Internazionale.

Una tecnica d'arricchimento, che permetta cioè di concentrare l'A.C.T.H. ematico prima del saggio, come quella prospettata recentemente da SYDNOR e SAYERS², noi la riteniamo consigliabile qualora si osservino abbassamenti dell'acido ascorbico nelle surrenali molto limitati. A questo riguardo ricerche comparative sono in corso da parte nostra.

Per i soggetti esaminati (tabella) il plasma presenta un'attività corticotropa corrispondente ad un valore medio di 40 mu di A.C.T.H. per 100 cm³, mentre per l'ultrafiltrato è di 52 mu per 100 cm³ e cioè lievemente superiore. Senza voler per ora attribuire un significato

a questa differenza che potrebbe rientrare nei limiti di errore sperimentale, risulta chiaramente, che la sostanza corticotropa del plasma è totalmente ultrafiltrabile. Ciò appare non solo dal valore medio, ma anche dai dati singoli riferentisi a ciascun plasma. Una conferma si ha nell'osservazione che i residui della ultrafiltrazione esaminati non presentano alcuna attività.

In base pertanto ai risultati ottenuti, noi siamo portati a confermare che: il sangue di uomo normale ha un'attività corticotropa ed a precisare che l'A.C.T.H. ematico è in forma relativamente semplice e tale da poter ultrafiltrare.

C. A. ROSSI, L. MONTANARI,
M. MARTINELLI e G. MORUZZI

*Istituto di Chimica biologica dell'Università di Bologna,
il 15 ottobre, 1952.*

Summary

Corticotrophic activity of human plasma as well as of the relative ultrafiltrates has been assayed by the ascorbic acid depletion test on hypophysectomized rats.

It is further confirmed that human plasma displays a corticotrophic activity (40 mu per 100 cm³), and that blood A.C.T.H. is totally ultrafiltrable (52 mu per 100 cm³).

This may lead to the conclusion that A.C.T.H. may be present in blood in a relatively simple form.

New Method of Staining of Bacterial Capsules in Films and Sections

It is well known that many polysaccharides are present in bacterial cells. Such polysaccharide substances are more or less directly related to infectious or immunological phenomena.

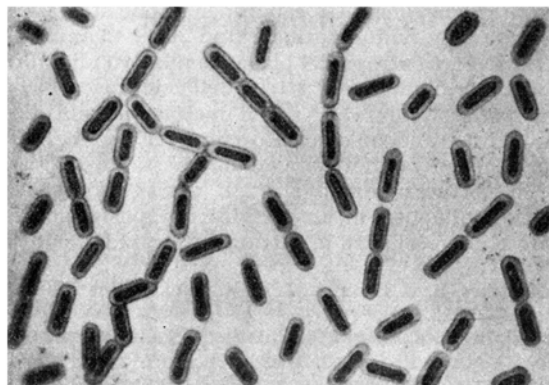


Fig. 1.—*Klebsiella pneumoniae*. Alcian Blue - Carbollic Fuchsin. 1:2000.

Very interesting are the polysaccharides which form a capsule to some of the bacterial cells. The importance of this capsule lies in the fact that it is connected with virulence and specificity of germs. However, the practical demonstration of bacterial capsules in films and sections is very difficult; several staining procedures have been devised, but the results obtained have not been satisfactory. Good results have now been obtained from the following process, with which I have succeeded in demonstrating the bacterial capsules in films and sections.

¹ Ringraziamo l'American Committee University of Bologna di New York che ci ha gentilmente procurato il Provisional U.S.P. Corticotropin Reference Standard.

² K. L. SYDNOR e G. SAYERS, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 79, 432 (1952).

The method is based on the introduction of a staining substance called "Alcian Blue 8GN 150"¹, which has great affinity for the bacterial capsules. I have also been able to establish that an affinity for this staining substance is maintained by isolated polysaccharides and disappears after enzymatic demolition of capsular polysaccharide substance. This fact suggests, with great probability, a specificity towards staining.

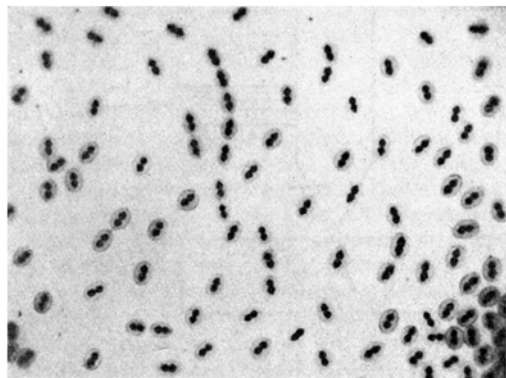


Fig. 2. –Pneumococcus III. Alcian Blue – GRAM's staining. 1:1200.

Staining solution: Alcian Blue 8GN 150 1 g
Alcohol absolute 100 g

For staining use 1 drop of this solution to 1 cm³ of distilled water.

Method of staining

(A) In films:

- (1) Dry thin, evenly spread films in the air and fix by passing through a flame.
- (2) Cover the films with the diluted solution of Alcian Blue for 1 min.
- (3) Wash in tap water.
- (4) Counterstain with a solution diluted 1:100 ZIEHL-NEESEN's carbolic fucsin for 3–5 s.
- (5) Wash well in tap water.
- (6) Dry and examine.

(B) In sections:

- (1) Fix in 10% formalin and embed in paraffin.
- (2) Treat paraffin sections in the usual way up to water.
- (3) Stain the sections in freshly diluted solution of Alcian Blue for 5 min.
- (4) Wash in distilled water.
- (5) Counterstain with diluted solution (1:100) of ZIEHL's carbolic fucsin for 5 s.
- (6) Wash well in distilled water.
- (7) Differentiate very quickly in 95% alcohol.
- (8) Dehydrate in absolute alcohol.
- (9) Clear in xylol and mount in balsam.

The bacterial capsules are blue, bacteria are red. It is also possible to make use of a GRAM's staining instead of simple ZIEHL's carbolic fucsin, but in this case it is advisable to reapply the solution of Alcian Blue after the alcoholic differentiation for 1 min. Of course the contrast between the capsula and Gram-positive bacteria is less evident.

Finally the method is very easy to perform and always gives good results. Excellent results have also been obtained in staining the walls of fungi.

A. NOVELLI

*Department of General Pathology and Bacteriology,
University of Genoa, August 26, 1952.*

Riassunto

Viene descritto un nuovo metodo di colorazione delle capsule batteriche, su strisci e nei tessuti, basato sull'impiego di un nuovo colorante: l'Alcian Blue 8GN 150. Tale colorante ha dimostrato di possedere un'affinità per i polisaccaridi capsulari.

Il metodo, di semplice e rapida esecuzione, è pure indicato per la colorazione delle pareti cellulari dei miceti.

PRO EXPERIMENTIS

Über Arbeitsstörungen bei serologischen Untersuchungen, verursacht durch ein Waschmittel

Im Sommer und Herbst 1951 befassten wir uns mit der Hämagglutination nach MIDDLEBROOK und DUBOS (HMD.) für die Untersuchung auf Rindertuberkulose.

Die Arbeitstechnik entsprach den Angaben von BRODHAGE¹.

Als Testflüssigkeit dienten die mit Tuberkulin (PPD.-Kopenhagen) sensibilisierten und in der Kochsalzlösung suspendierten Hammelerythrozyten.

Die Proben wurden in Kahn'schen Röhrchen angesetzt, jedem Röhrchen, das 0,3 cm³ der entsprechenden Serumverdünnung enthielt, wurde die gleiche Menge (0,3 cm³) Testflüssigkeit hinzugefügt. Nach zweistündigem Bebrüten im Thermostat wurden die Gläser bei Zimmertemperatur die Nacht hindurch aufbewahrt, anschliessend die Resultate abgelesen.

Im Verlauf von etwa 6 Wochen stellten sich Störungen ein, indem die für die Testierung der Proben zugesetzte Erythrozytenaufschwemmung hämolytisch wurde. Die Hämolyse betraf in erster Linie die hohen Serumverdünnungen, indem sie zuerst die Testflüssigkeitskontrolle (Testflüssigkeit + NaCl) angriff, um dann stufenweise auf die höchsten Serumverdünnungen überzugehen, wobei die niedrigen meistens intakt blieben. Die Zeit des Hämolyseauftritts beschränkte sich auf 20–30 min nach der Abfüllung der Testflüssigkeit, unabhängig von der Temperatur, sowohl im Zimmer wie auch im Thermostat.

Nachdem die Nachprüfung sämtlicher Reagenzien auf Reinheit und die Verwendung von Erythrozyten anderer Tiere keine Änderung bewirkten, wurden sämtliche an der Reaktion beteiligten Substanzen in ein anderes Institut verbracht und die Reaktion mit den dortigen Gläsern angesetzt. Die Hämolyse trat hier nicht auf².

Als dies festgestellt war, unterlag es schon keinem Zweifel mehr, dass der Fehler irgendwie mit unsern Gläsern zusammenhing. Da wir aber diese Röhrchen früher störungslos verwendet hatten, musste der Fehler nicht auf das Glasmaterial selbst, sondern nur auf die Reinigungsart zurückgeführt werden. Zur Zeit wurde in un-

¹ H. BRODHAGE, Acta Davosiana, 10, H. 4 (1951).

² Schweizerisches Forschungsinstitut für Tuberkulose in Davos.

¹ Produced by Imperial Chemical Industries Limited, London.