

or cells plus buffer. On day 8 the liver/serum ratio was 0.5 in the former group but was 0.9 in the latter, indicating that in the absence (or near-absence) of serum protein in the inoculum an equilibrium was established between the active protein of the liver and (via the protein of the blood plasma⁹) that of the ascites serum. These findings give no evidence for any escape of active protein from the cells to the serum, indicating that the radioactivity lost from the protein fraction left the cells in the form of acid-soluble glycine. It is therefore concluded that the proteins of the Landschütz tumor undergo intracellular turnover during growth. Attempts to enhance the loss of activity from the tumor protein by injecting physiological amounts of unlabelled glycine or leucine were unsuccessful, though injecting alanine or large amounts of glycine could cause cell damage.

This work was supported by the Swedish Cancer Society, the Wallenberg Foundation, and the National Cancer Institute, U.S. Public Health Service, of which one author (J. S. F.) was a post-doctoral research fellow.

J. S. FINLAYSON, A. FORSSBERG,
and G. DREYFUS

Institute of Radiophysics, Stockholm (Sweden), November 17, 1958.

Zusammenfassung

Untersuchungen über die Stabilität der Eiweißstoffe von Landschütz-Aszites-Tumoren wurden an C¹⁴-Glykoholl-, -Valin oder -Leucin markierten Zellen durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass während der Zellteilung und des Wachstums kontinuierlich etwa 5–10% pro Tag der einmal gebundenen C¹⁴-Aktivität als niedrigmolekulare Komponenten in die Aszitesflüssigkeit ausgeschieden wird. Diese Instabilität kommt offenbar durch intrazelluläre Umsetzung der Eiweißstoffe und nicht durch Ausscheidung ganzer Eiweißmoleküle zustande.

⁹ R. L. STRAUBE, Cancer Res. 18, 57 (1958).

Nachweis von Nahrungsmittel-Antikörpern mittels der Hämagglutination

Immunantikörper gegen Kuhmilch können sowohl mittels der Präzipitinreaktion wie mit der Methodik der Komplementbindung aufgedeckt werden. In der Praxis, das heißt bei dem Versuch des Nachweises von Kuhmilchartikörpern beim Menschen, versagt jedoch häufig das erste Verfahren, weil der Titer ein geringer ist. Überlegen ist die Methodik der Komplementbindungsreaktion, und zwar besonders dann, wenn das Gemisch aus Antigen-Kuhmilchverdünnung, Prüfungsserum und Komplement über Nacht bei Eisschränktemperatur gehalten wird. Bei der Verwendung der Komplementbindungsreaktion ergab sich, dass während der ersten 12 Lebensmonate bei Säuglingen und Kleinkindern, die mit Kuhmilch oder mit kuhmilchhaltigen Produkten ernährt waren, ein hoher Prozentsatz der Probanden mit der Bindung von Kuhmilch-Antikörpern reagierte. Die Zahl der von den einzelnen Autoren erhaltenen positiven Antikörper-Befunde ist jedoch Schwankungen unterworfen, über die an anderer Stelle zusammenfassend berichtet wurde¹. Bei diesem Bericht wurde auch darauf hingewiesen, dass bei Säuglingen und Kleinkindern der Übertritt von Kuhmilch aus

dem Magen-Darmtrakt in die Blutbahn mit Antikörperbildung fast ein physiologisches Phänomen darstellt, welches nur selten zu Krankheitserscheinungen führt.

Als Nachteile der Komplementbindungsreaktion sind die Schwierigkeiten der Ablesungen zu erwähnen, die darin bestehen, dass in den starken Antigenkonzentrationen das Reaktionsgemisch ein so trübes ist, dass Fehlen oder Eintritt von Hämolyse als Indikator zustandekommener oder ausgebliebener Antigen-Antikörper-Reaktion sich kaum beurteilen lässt. Auch die Tatsache, dass man bei der Komplementbindungsreaktion den Antikörper-Titer nicht dadurch ermittelt, indem man das zu prüfende Serum verdünnt, sondern indem man Dilutionen der Kuhmilch herstellt, deren Antikörper-Bindungsvermögen als Titer bezeichnet wird, liess es als wünschenswert erscheinen, die bisherigen Verfahren durch eine Methodik zu ergänzen bzw. zu ersetzen, welche zu einer direkten Aussage über den Gehalt an Antikörpern im Serum berechtigt.

Zu diesem Zwecke bedienten wir uns der Hämagglutinationsmethode in der von BOYDEN² angegebenen Technik, in welcher die auf ihre Agglutinierbarkeit zu prüfenden Blutkörperchen durch Versetzen mit Tannin so sensibilisiert wurden, dass ihre Ausflockung besonders leicht erfolgte. VON BOYDEN zeigte, dass Schafblutkörperchen nach Sensibilisierung durch Tannin die verschiedensten Antigene adsorbieren und in Gegenwart der korrespondierenden Immunseren durch hochgradige Dilutionen zur Agglutination gebracht werden. Auch bei dem von WITEBSKY³ et al. neuerdings erbrachten Nachweis, dass die Entstehung bestimmter Formen chronischer Schilddrüsenentzündung auf eine Autoantikörperbildung zurückzuführen ist, spielte die Verwendung von Null-Erythrozyten, die mit Tannin sensibilisiert waren, eine entscheidende Rolle.

Unser Vorgehen bei dem Ansetzen des Hämagglutinationsversuches zwecks Nachweis von Kuhmilchartikörpern in Seren von Säuglingen und Kleinkindern gestaltete sich folgendermassen:

1. Wir verwendeten Null-Blutkörperchen, die aus den Blutproben des eingehenden Untersuchungsmaterials gewonnen waren und keinerlei Zusätze enthielten. Nach Entfernung des Blutkuchens wurden die restlichen Blutkörperchen dreimal mit isotonischer veronalhaltiger Kochsalzlösung gewaschen und mit ihr wieder aufgefüllt, so dass eine etwa 5% ige Suspension von Erythrozyten resultierte.

2. Mit *acidum tannicum* wurde in destilliertem Wasser eine 0,5-prozentige Lösung hergestellt, aus der wir durch Aufnahme in Veronal-Kochsalz-Lösung eine Verdünnung von 1:25 000 gewannen (0,1 cm³ *acidum tannicum* 1:100 plus 12,4 cm³ Veronal-NaCl-Lösung).

3. Zwecks Sensibilisierung der Null-Erythrozyten wurden 5 cm³ der nach 1 hergestellten Suspension mit 5 cm³ der nach 2 präparierten *acidum tannicum*-Lösung versetzt, das Gemisch 30 min bei Zimmertemperatur gehalten und anschliessend 4mal mit Veronal-NaCl-Lösung so gewaschen, dass wieder eine 5%ige Erythrozyten-Suspension resultierte.

4. Diese Erythrozyten-Aufschwemmung wurde zu gleichen Teilen mit Kuhmilch versetzt, welche zuvor mit Veronal-NaCl-Lösung in eine 1%ige Dilution gebracht worden war. Das Gemisch hielten wir 60 min bei 37°C, zentrifugierten es, wuschen es einmal mit Veronal-NaCl-

² S. V. BOYDEN, J. exp. Med. 93, 107 (1951).

³ E. WITEBSKY; N. R. ROSE, K. TERPLAN, J. R. PAINES und R. W. EGAN, J. Amer. med. Assoc. 164, 1439 (1957).

Tabelle I

Antigen Kuhmilch- verdünnung	Komplement- bindungs- reaktion Serum von Din	Serum- verdünnung	Hämag- glutinations- test Serum von Din
100	+++	5	+
900	+++	10	+
300	+++	20	+
2700	+++	50	+
8100	+++	100	+
24300	+++	200	-
72900	+++	500	-
218700	+++	1000	-
656100	++		
1968300	++		
5904900	-		
		<i>Kontrollen</i>	
		1. 0-Ery- throzyten ohne Tannin (ohne Serum)	
		2. 0-Ery- throzyten mit Tannin (ohne Serum)	

Lösung und brachten es dann wieder auf das Ausgangsvolumen.

5. Den *Hämaggelutinationsversuch* führten wir in der Weise aus, dass wir in Präzipitationsröhren von 9 cm Länge und mit einem Durchmesser von 0,7 cm fallende Dilutionen von Seren einfüllten, welche zuvor zweimal inaktiviert worden waren; das erste Mal unmittelbar nach der Blutentnahme, wobei die Seren 30 min lang bei 56°C gehalten wurden, während eine zweite Inaktivierung kurz vor Versuchsansatz erfolgte und bei gleicher Temperatur 10 min dauerte.

In die einzelnen Röhrchen wurden je 0,2 cm³ Serum-Dilutionen gebracht und anschliessend je 0,2 cm³ der mit Tannin und Kuhmilch präparierten Blutkörperchen-Aufschwemmung. Die *Ableseung* der Hämaggelutination erfolgte mit blossem Auge und wurde zweimal vorgenommen. Das erste Mal nach zweistündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur und ein zweites Mal nach etwa 16ständigem Aufenthalt der Ansätze im Eisschrank bei + 4°C. Die zweite Ableseung diente einzlig der Kontrolle der ersten Protokollierung. Unterschiede zwischen den beiden Resultaten waren gelegentlich zu verzeichnen. Die positiv sehr deutliche Hämaggelutination dokumentierte sich in dem Auftreten von zusammenhängenden, mehrfach gezackten und kompakten Sedimenten, während eine schwächere Reaktion – meist in stärkeren Serumverdünnungen – durch Bildung von feineren Sedimenten in Form von Granula gekennzeichnet war. Blieb die Reaktion negativ, so sedimentierten die Blutkörperchen als gleichmässige oval-runde Scheiben, die beim Aufschütteln sich leicht homogenisieren liessen. Die Unterschiede zwischen positiver und negativer Reaktion waren ausgeprägt, und Übergänge zwischen positiven und negativen Resultaten waren kaum zu verzeichnen.

In einem ersten Versuchsansatz prüften wir ein Serum «Din», welches von einem 6 Monate alten Kind stammte, eine Probe, bei der wir mittels der Komplementbindungsreaktion Antikörper gegen Kuhmilch nachgewiesen hatten. (Bezüglich der dabei benutzten Technik siehe unter 1.)

Tabelle II
Ergebnis der vergleichenden Untersuchungen mittels der Komplementbindungsreaktion und des Hämaggelutinationstest

Name	Komplement- bindungsreaktion Titer ermittelt durch Verdünnung der Kuhmilch	Hämaggeluti- nationstest Titer ermittelt durch Verdünnung des Serums
A	1. Bor.	72900
	2. Ban.	8100
	3. Dop.	810
	4. Hem.	72900
	5. Acs.	17714700
	6. Din.	1968300
	7. La.	17714700
	8. En.	218700
	9. Kai.	1968300
	10. Al.	900
	11. Sp.	1968300
	12. We.	1968300
	13. Ma.	218700
	14. Fl.	656100
	15. Bur.	218700
	16. Kes.	656100
	17. Mül.	300
	18. Mäd.	8100
B	1. H. v. W.	negativ
	2. Tsch.	negativ
	3. Rey.	negativ
	4. Wi.	negativ
	5. Ehr.	negativ
	6. La.	negativ
	7. Blu.	negativ
	8. Käp.	negativ
	9. Bes.	negativ
	10. Ex.	negativ
	11. Jo.	negativ
	12. Sch.	negativ
	13. Tsc.	negativ
	14. Arn.	negativ
C	1. Meu.	fraglich
	2. God.	fraglich
	3. Ger.	fraglich

Dieses Serum wurde in einem Parallelversuch mittels der Komplementbindungsreaktion einerseits und des Hämaggelutinationstestes andererseits auf Anwesenheit von Antikörpern gegen Kuhmilch geprüft. Aus der Tabelle I, in der die vergleichenden Resultate der beiden Methoden eingetragen sind, geht hervor, dass beim Hämaggelutinationstest in einer Serumverdünnung von 1:5 bis 1:100 Kuhmilch-Antikörper nachweisbar waren. Bei der Komplementbindungsreaktion wurde die positive Reaktion mit einer Serum-Verdünnung von 1:4 erhalten.

In der Tabelle II sind drei Arten von Serumproben, welche mit dem Hämaggelutinationstest geprüft wurden, zusammengestellt. Die Gruppe A enthält 18 Seren, welche bei der Komplementbindungsreaktion positiv mit Kuhmilch reagiert hatten. In der Gruppe B finden sich 14 Seren, welche bei der Komplementbindungsreaktion negativ reagiert hatten, während die Gruppe C drei Seren enthält, welche bei der Komplementbindungsreaktion als «fraglich» bezüglich des Gehaltes an Kuhmilch-Antikörpern bezeichnet waren⁴.

⁴ In der Zwischenzeit wurden noch weitere 6 Seren im Hämaggelutinationstest geprüft. Drei Proben fielen positiv und drei negativ aus. Auch diese 6 Befunde deckten sich mit den Ergebnissen der Komplementbindungsreaktion.

Aus der in der Tabelle II enthaltenen Zusammenstellung lassen sich folgende Ergebnisse ableiten:

1. Von 18 bei der Komplementbindungsreaktion als Kuhmilch-Antikörper positiv erkannten Seren reagierten sämtliche im Hämagglutinationstest eindeutig, und zwar so, dass in einer Reihe von Fällen die Seren bis zu einer Verdünnung von 1:200 mit Kuhmilch reagierten.

2. Von 14 Seren, welche bei der Prüfung mittels der Komplementbindungsreaktion als frei von Antikörpern gegen Kuhmilch gefunden wurden, erwiesen sich 12 auch im Hämagglutinationstest als negativ, während zwei (Nr. 6 und 14) positiv reagierten. Demnach besteht zwischen den beiden Proben nicht eine völlige Parallelität. Auf Grund unseres allerdings nicht sehr reichen Materials scheint jedoch der Hämagglutinationstest die empfindlichere Probe zu sein, da sie auch bei negativer Komplementbindungsreaktion positiv ausfiel.

3. In diesem Sinne spricht auch die Tatsache, dass die drei bei der Komplementbindungsreaktion auf Kuhmilch-Antikörper als fraglich bezeichneten Proben im Hämagglutinationstest deutlich positiv mit einem Titer von 1:20 ausfielen.

E. BERGER und R. CH. BAUER

Kinderspital Basel, Rhesus-Laboratorium, 12. Januar 1959.

Summary

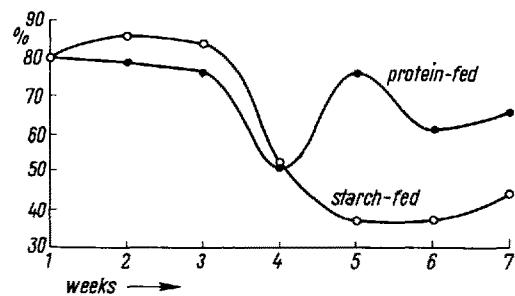
By means of a haemo-agglutination test using erythrocytes sensitised with tannic acid, we were able to demonstrate the presence of cow's milk antibodies in humans. The use of the haemo-agglutination test enables us now to give exact information on the titer value of the antibody in human serum. Previously this was limitately possible using the method of antibody demonstration by means of the complement-compound reaction.

We have well-established reasons to assume that other antibodies caused by various antigens, can be determined by means of the haemo-agglutination test.

The Effect of Diets on the Utilization of the Food by the African Giant Snail, *Achatina fulica* Bowdich

Lately the problem, whether a particular individual can change its digestive enzyme production to a changed diet, or in other words: to what extent an *adaptation* in its enzyme production can occur, has come more and more to the front. In mammals a few observations seem to point into this direction^{1,2,3}, although such an adaptation apparently needs some time before it is established⁴. In invertebrates the reports are more confusing. A positive correlation was reported in one case⁵, but in another one the opposite was found⁶. This problem was investigated again in *Achatina fulica*, the results of which were rather

confusing⁷. To get a better idea of whether an adaptation to special diets does occur in this snail, the utilization of the food presented was studied. For this purpose 2 batches of 4 mature snails were isolated and fed daily with boiled potato (starch diet), and with horse meat (protein diet). It was assumed that, if an adaptation did occur, this might show in an increased resorption of carbohydrates by the first group ('starch' snails), an increased resorption of proteins by the second one ('protein' snails). At the end of each week the snails were fed with a known amount of potato or meat. After 24 h the faeces (and eventually not eaten food rests) were collected and processed. Of the fresh meat and potato a control sample was taken at the same time of feeding, weighed and processed. Thus the contents of carbohydrates and protein-N of the food could easily be computed. From these values those of the 'faeces' were subtracted and the amount resorbed was thus known. This amount was expressed as a percentage of the food given.



To determine the carbohydrate contents of the potato and faeces, the samples were hydrolyzed in 10 ml of 0.1 N HCl on a water bath for 24 h, after which the volume was readjusted to the original 10 ml by adding distilled water. This was neutralized with 10 ml of 0.1 N NaOH and filtered. 5 ml was pipetted off and the amount of reducing sugar was determined with Schoorl's sugar titration⁸ in mg glucose. The protein-N content of sample and faeces of the protein snails was determined with Kjeldahl's method.

The results of the experiments are given in the Figure. From this it is obvious that the starch snails do not show an increase in utilization. Although the curve does show a slight increase during the first 3 weeks, it is questionable from these data alone whether this increase is significant. We must keep in mind that the wet-weight determinations include an error which may easily be of the order of 5 to 10%. A definite drop occurs after 3 weeks and only after 6 weeks a slow rise of the curve appears. This curve therefore does certainly not suggest an adaptation to the diet in the sense that more carbohydrates are resorbed.

The protein utilization curve shows the same dip after 3 weeks (the steady but very slow decrease during the first 3 weeks needs not be significant for the same reason as given above). A definite rise seems to occur after the fourth week, again followed by a decrease (6 weeks) and a second slow rise (7 weeks). The increase from the fourth to fifth week appears large enough to be acceptable. Apparently there is a tendency to utilize more of the meat after a certain period of adaptation, but this 'adaptation', if it is real, is small. In any case there does not seem to exist a clear adaptation of the resorption, when the snails are fed on a special diet of either starch or protein in the

¹ B. T. SQUIRES, J. Physiol. 119, 153 (1953).

² M. I. GROSSMAN, H. GREENGARD, and A. C. IVY, Amer. J. Physiol. 138, 676 (1942-43); 141, 38 (1944).

³ W. E. KNOX, V. H. AUERBACH, and E. C. C. LIN, Physiol. Rev. 36, 164 (1956).

⁴ P. H. GUTH, S. A. KOMAROV, H. SHAY, and C. Z. STYLE, Amer. J. Physiol. 197, 207 (1956).

⁵ G. F. SHAMBAUGH, Ohio J. Sci. 54, 151 (1954).

⁶ M. F. DAY and R. F. POWNING, Austr. J. Sci. Res. [B] 2, 175 (1949).

⁷ C. L. PROSSER and P. B. VAN WEEL, Physiol. Zool. 31, 171 (1958).

⁸ W. RADSMAN, Handl. Pract. Physiol. Chem. 1, 15 (1939).