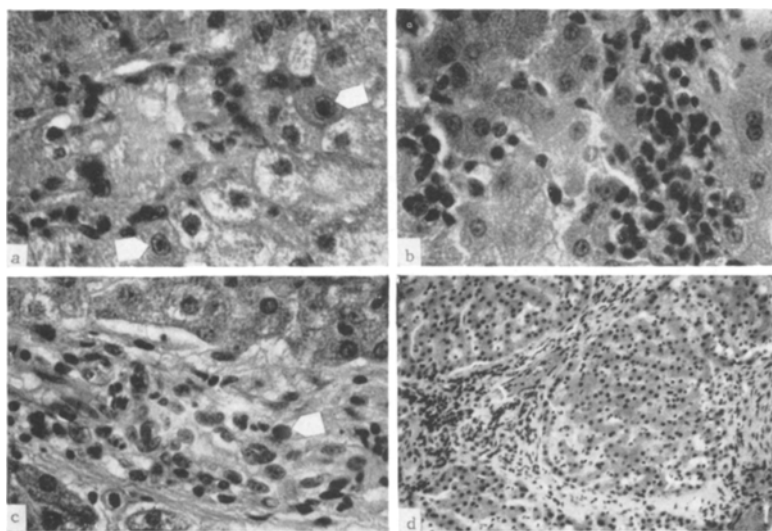


body weight had been reared on an isolated farm and were pre-immunized against distemper and leptospirosis. Upon arrival in the laboratory, they were infected intracocularly with 300 TCID₅₀ of canine hepatitis virus. In contrast to animals with acute disease which died in 4–6 days with extensive hepatic necrosis, these dogs survived the initial phase even though there was definite evidence of viral involvement of the liver. Foci of necrosis with characteristic viral intranuclear inclusion bodies, which stained with fluorescein labelled antiviral antibody, could be demonstrated in the first week after infection (Figure a).

6 of these dogs died 8–21 days after infection. At

course of the infection. Consequently, attempts were made to modulate the disease by intravenous administration of a dose of immune serum calculated to yield serum titers between 1/4 and 1/100 in the animal. Although sufficient time has not yet elapsed for adequate observation of all of these dogs, in at least 5 of 8 animals sequential hepatic biopsies have shown the evolution of the same chronic pattern described above.

Thus, it appears that partial immunity may modify the course of canine hepatitis, with resulting chronic hepatic injury. This modification of viral hepatitis in the dog may provide a model suitable for the study of liver injury resembling chronic hepatitis in man.



Sequential hepatic biopsies demonstrating the evolution of progressive hepatic damage following infection with canine hepatitis virus (dog 'Tally'; pre-infection neutralization titer 1/100; 300 TCID₅₀ of virus intraocularly; hematoxylin and eosin stain). (a) Day 5 after infection: small focus of hepatic necrosis with characteristic intranuclear viral inclusions (arrow). $\times 430$. (b) Day 27 after infection: accumulation of round cells and plasma cells in hepatic parenchyma. $\times 430$. (c) 2 months after infection: portal tract infiltrated with round cells and plasma cells (arrow). $\times 430$. (d) 7 months after infection, post-mortem: section showing chronic inflammation, fibrosis and bridging. $\times 100$.

autopsy, severe hepatic necrosis with dense collections of round cells and plasma cells was found, but the virus could not be demonstrated any longer. The remaining 10 dogs survived up to 8 months.

Serial hepatic biopsies demonstrated the evolution of a pattern characterized by absence of intranuclear inclusions or fluorescent staining, and by the appearance of lymphocytes and plasma cells, predominantly localized in dense collections about the portal regions (Figure b and c). Eventually, fibrosis appeared in these areas and progressed to 'bridge-formation' (Figure d).

It was observed that all the dogs with this chronic disease pattern had low levels of neutralizing antiviral antibody prior to infection. Since animals dying with the acute illness never had detectable antibody, it was suspected that partial immunity may have modified the

Zusammenfassung. 20 junge, nicht immune Beagle Hunde (Neutralisationstiter $< 1/4$) wurden mit 300 ID₅₀ (Gewebskultur) des Hepatitis-canis-Virus infiziert. Alle Tiere starben innerhalb von 4–6 Tagen an ausgedehnter Lebernekrose. Im Gegensatz dazu überlebten 16 partiell immune Tiere (Neutralisationstiter $1/4$ bis $1/100$) die akute Erkrankung. Im Verlaufe einer Überlebenszeit bis zu 8 Monaten entwickelte sich eine der menschlichen Hepatitis chronica ähnliche Lebererkrankung.

R. PREISIG, D. GÖCKE, T. MORRIS,
and S. E. BRADLEY

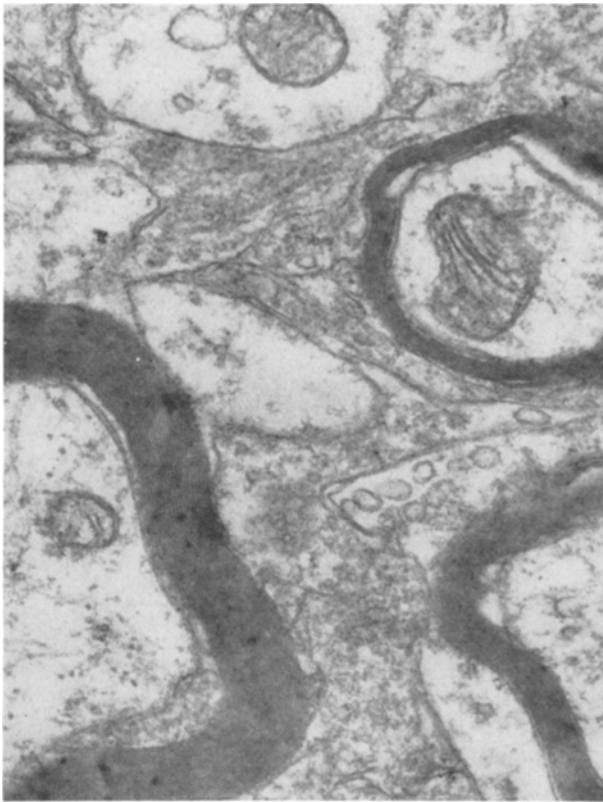
Department of Clinical Pharmacology, University of Berne (Switzerland) and Department of Medicine, Columbia University, New York (N.Y., USA), June 13, 1966.

A Useful New Stain for Electron Microscopy

The use of aqueous salts of dodeca-tungstoboric acid for negative contrast examination of protein molecules has been suggested by ROWE¹; it was said to be preferable to phosphotungstate because it caused less molecular aggregation. I thought that tungstoborate might also be a good direct stain, that is, useful for the electron microscopic examination of ultra-thin sections of embedded tissues. This has proved to be so.

Tungstoboric acid crystals (Hopkin and Williams) are very soluble both in water and in alcohol. For staining they have been used at 10% concentration w/v in ethanol. In this form the intensity of staining seems of the order obtained with 2% uranyl acetate in methanol, but with the advantage that no contaminating precipitate is obtained by exposure to the atmosphere.

¹ A. J. ROWE, Proc. R. Soc. B 160, 437 (1964).



Section of posterior pituitary gland, osmium-fixed and embedded in Vestopal, stained 20 min in 10% w/v tungstoboric acid in ethanol. $\times 45,000$.

In aqueous solution the stain is strongly acidic, but in ethanol this acidity is suppressed so that, at room temperature, it is some hours before a copper grid shows evidence of being attacked. Various ways have been tried to counteract the acidity, and it seems adequate to stand the ethanolic solution over solid sodium bicarbonate. Unfortunately, neutralizing the acidity also decreases the staining intensity, particularly with respect to cytoplasmic material.

The stain will not mordent subsequent staining with lead salts² in the way that uranium does; nor can it equal the staining intensity of uranium-lead, or lead staining at its best. Nevertheless, trials have so far shown that it is a convenient general stain, giving clean, finely-stained results with Araldite-, Epikote-, and Vestopal-embedded tissues such as blood platelets, human skin, and posterior pituitary gland.

Zusammenfassung. Die Kontrastierung von elektronenmikroskopischen Gewebsschnitten mit einer 10%igen alkoholischen Lösung von Dodekatungstoborsäure wird beschrieben. Diese Säure wird von der atmosphärischen Kohlensäure nicht beeinflusst.

A. CHARLES

Medical Research Council, Unit for Research on the Experimental Pathology of the Skin, Medical School, University of Birmingham (England), June 9, 1966.

² J. M. FRASCA and V. R. PARKS, J. Cell Biol. 25, 157 (1965).

PRO EXPERIMENTIS

Elektronenoptische Untersuchungen des Hauptstrom-Rauchkondensats der Partikelphase des Zigaretten- und Cigarrenrauchs

Cigarrenrauchteilchen kamen wohl erstmalig durch RUSKA¹ zur direkten elektronenoptischen Untersuchung. HARRIS und KAY² untersuchten ebenfalls nativen Tabakrauch elektronenoptisch. TRILLAT und CUZIN³ bedampften niedergeschlagenen Tabakrauch mit Titan für besagte Untersuchungen. KAHLER und LLOYD⁴ präzipitierten Zigarettenrauch elektrostatisch direkt auf den Trägerfilm und bedampften das Präparat mit Chrom.

Unterschiedliche Interpretationen der aktuellen Ergebnisse experimenteller Tabakforschung, es wurden zur Zeit ca. 500 verschiedene chemische Verbindungen im Zigarettenrauch nachgewiesen⁵, liessen es als aussichtsreich erscheinen, sich weiterhin des Elektronenmikroskops für die Tabakrauch-Forschung zu bedienen.

Die oben genannten Autoren und andere befassten sich mit den Partikeln selbst des nativen Tabakrauch-Aerosols, ihrer Morphologie, Teilchengrößenverteilung usw.

Eigene Untersuchungen ergaben, dass sich der Tabakrauch in vivo jedoch für elektronenoptische Fähdung nach einzelnen Bestandteilen der Partikelphase nicht eignet. Der Teer macht eine elektronenoptische Fokussierung unmöglich. Auf den Trägerfilm aufgebraachte und im Soxhletverfahren mit Solventen gewaschene Rauchkondensate erwiesen sich ebenfalls als ungeeignet. Es galt, aus einem schonend zu erhaltenden Rauchkondensat ein weit-

gehend teerfreies, für elektronenoptische Untersuchungen geeignetes Produkt zu gewinnen. Nur die Partikelphase des Hauptstromrauches interessierte, gewisse Anteile der Gasphase blieben unberücksichtigt.

In jeder Versuchsreihe wurden nacheinander 12 nicht konditionierte aus dem Handel bezogene Zigaretten, ohne und mit Filter, gleicher Marke⁶, bzw. 2 Cigarren⁷ nach den international festgelegten Normen⁸ unter Lichtausschluss abgeraucht. Die Asche wurde ca. 20 cm unterhalb des Rauchvorgangs aufgefangen und laufend beseitigt.

Der Kolben einer 50-ml-Pravazspritze wurde, bei Öffnung eines auf ihr sitzenden 3-Wegehahns ins Freie, manuell nach oben geschoben. Bei Öffnung des 3-Wegehahns zur umgearbeiteten 500-ml-Spritzflasche sank er, mit einem Gegengewicht entsprechend austariert, innerhalb von 2 sec bis zur Marke 35 ml der Spritze, arretiert, ab, 35 ml des Tabakrauchs des von einer konischen «Glaslippe» gehaltenen Rauchgutes durch einen siebartig endenden Glastubus aspirierend (Figur 1).

¹ H. RUSKA und E. FRÜHBRODT, Biologie 9, 69 (1940).

² E. HARRIS und H. F. KAY, Nature 183, 4663 (1959).

³ J. J. TRILLAT und J. CUZIN, C. r. Acad. Sci., Paris 264, 1040 (1958).

⁴ H. KAHLER und B. J. LLOYD, J. natn. Cancer. Inst. 18, 217 (1957).

⁵ Smoking and Health, U.S. Dept. of Pub. Health Serv. Nr. 1103, 1964.

⁶ Overstolz-Zigaretten ohne und mit Filter, 12er Packung.

⁷ Cigarre Schimmelpenninck, rolled by hand from natural leaves with especially chosen Habana, finest Corona, Gewicht ca. 8 g.

⁸ Beiträge z. Tabakforsch., Hamburg, H 8, S. 307, 1962.