



# Mitteilungen

für Wissenschaft und Technik



**Bd. VI, Nr. 3** Januar 1974

und DÖRMER 1972). Die Einzelwerte werden wieder zusammen mit den statistischen Berechnungen ausgegeben und nach Gegenwichtung in Form von Häufigkeitsverteilungen geplottet (Abb. 13). Wenn der Thymingehalt der diploiden Zelle bekannt ist, kann sodann die DNS-Synthesedauer berechnet werden (DÖRMER und BRINKMANN 1970 a, 1970 b). Auch diese Daten werden in derselben Weise wie die vorhergehenden statistisch berechnet, umgerechnet und ausgegeben (Abb. 14).

#### Zusammenfassung

Die Entwicklung der Auflicht-Hellfeld-Photometrie in der quantitativen Autoradiographie führt zur elektronischen Datenverarbeitung hin. Bei dieser Tendenz erweist sich eine Technik des Meßablaufes am einfachsten, die von den Gegebenheiten der elektronischen Datenverarbeitung her bestimmt ist. Ein neuer und variabler Reflexionsstandard, der mit einem Objektiv verbunden ist, bedeutet eine wesentliche Vereinfachung der Meßprozedur. Dieser Standard befindet sich neben dem Meßobjektiv am Objektivrevolver und wird zur Eichung in den Strahlengang gebracht. Der Reflexionsstandard kann auch dazu benützt wer-

den, die jeweils eingestellte Meßblendenfläche in einfacher Weise zu bestimmen. Die Meßblendenfläche wird benötigt, um rechnerisch eine Linearisierung der Photometerwerte, eine Berücksichtigung der Strahlengeometrie bei <sup>14</sup>C-markierten Zellen und eine automatische Untergrundkorrektur durchzuführen. Für diese Prozeduren wird der Reflexionsstandard nach jeder Silberkornmessung einmal in den Strahlengang gebracht und bei den vorgegebenen photometrischen Einstellungen gemessen.

Am Beispiel der Messung der DNS-Synthesegeschwindigkeit und DNS-Synthesedauer einzelner, in vitro markierter Zellen wird der Ablauf eines Datenerfassungs- und -verarbeitungsprogrammes skizziert. Die DNS-Synthesedauer der Einzelzelle ist ein Parameter, der bisher mit keiner anderen Methode zu erhalten war. Hierbei können auch menschliche Zellen untersucht werden.

Für die Unterstützung von seiten des Rechenzentrums der Physikalisch-Technischen Abteilung der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München, bin ich insbesondere Herrn Ing. W. Schmolke dankbar. Herrn H.-J. Brück, Ernst Leitz K.G., München, danke ich für die Durchsicht des Manuskriptes und für seine kritischen Diskussionen.

Anschrift des Verfassers: Priv.-Doz. Dr. P. Dörmer, Institut für Hämatologie der GSF, 8 München 2, Landwehrstraße 61.

#### Literatur:

- Brinkmann, W., und P. Dörmer:** In vitro-Verfahren zur Bestimmung der DNS-Synthese-Dauer einzelner Zellen. Biochemische Voraussetzungen und Ergebnisse. *Histochemie* **30** (1972), 335–343.
- Dörmer, P.:** Erfahrungen mit der photometrischen Silberkornzählung in der Autoradiographie. *Leitz Mitt. Wiss. Techn.* **IV** (1967 a), 74–78.
- Dörmer, P.:** Auflichtphotometrische Untersuchungen zur Größe der Koizidenz in der Autoradiographie mit Tritium. *Histochemie* **8** (1967 b), 1–8.
- Dörmer, P.:** Photometric methods in quantitative autoradiography. In: U. Lüttge (ed.), *Microautoradiography and electron probe analysis*, p. 7–48. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1972.
- Dörmer, P.:** Erythropoietic cell proliferation kinetics in normal and anemic man. A new approach using quantitative <sup>14</sup>C-autoradiography. *Progr. Histochem. Cytochem.* **6** (1973), 1–82.
- Dörmer, P., und W. Brinkmann:** Silberkornzählung mit dem Auflicht-Mikroskopphotometer. Ein Beitrag zur quantitativen Autoradiographie. *Acta histochem. (Jena) Suppl.* **8** (1968), 163–169.
- Dörmer, P., und W. Brinkmann:** Auflichtphotometrie von Mikroautoradiogrammen für quantitative Einbaustudien an Einzelzellen. *Z. analyt. Chem.* **252** (1970 a), 84–89.
- Dörmer, P., und W. Brinkmann:** Estimation of the DNA synthesis rate of bone marrow cells after administration of labelled thymidine in vitro. *Proceedings of the IAEA symposium on "In vitro procedures with radioisotopes in medicine"*. Wien: IAEA press 1970 b.

- Dörmer, P., und W. Brinkmann:** Quantitative <sup>14</sup>C-Autoradiographie einzelner Zellen. *Histochemie* **29** (1972), 248–264.
- Dörmer, P., W. Brinkmann, A. Stieber und W. Stich:** Automatische Silberkornzählung in der Einzelzell-Autoradiographie. Eine neue photometrische Methode für die quantitative Autoradiographie. *Klin. Wschr.* **44** (1966), 477–482.
- Gullberg, J. E.:** A new change-over optical system and a direct recording microscope for quantitative autoradiography. *Exp. Cell Res., Suppl.* **4** (1957), 222–230.
- Jacob, H., E. Knickrehm, J. Koch, E. Mundry und P. Veith:** Elektronische Datenerfassung und -verarbeitung bei der mikroskopischen Reflexphotometrie fester, fossiler Brennstoffe. *Leitz Mitt. Wiss. Techn.* **V** (1970), 65–77.
- Rogers, A. W.:** A simple photometric device for the quantitation of silver grains in autoradiographs of tissue sections. *Exp. Cell Res.* **24** (1961), 228–239.
- Rogers, A. W.:** Die Mikroskopie von Autoradiographien. *Leitz Mitt. Wiss. Techn.* **III** (1964), 43–47.
- Rogers, A. W.:** *Techniques of autoradiography*. Amsterdam, London, New York: Elsevier Publishing Company 1967.
- Rogers, A. W.:** Photometric measurement of grain density in autoradiographs. *J. Microscop.* **96** (1972), 141–153.
- Williams, M. A., and D. J. Goldstein:** Comparison of quantitative microscopic methods for the study of autoradiographs. *J. Anat. (Lond.)* **108** (1971), 584.

® = Eingetragenes Warenzeichen

# Moderne Immunfluoreszenzmikroskopie und ihre Anwendung in der klinischen Immunologie

Von R. C. NAIRN und J. S. PLOEM

Department of Pathology, Monash University,  
Melbourne/Australia, and Department of Pathology,  
University of Leiden/Holland

Neben der Aufgabe des Beherrschens aller technischen Probleme einer hochspezialisierten Mikroskopie bestehen für den Immunologen noch genügend Fragen bei der routinemäßigen Anwendung der Immunfluoreszenz. Man betrachtet es heute als die Pflicht verantwortungsbewußter Hersteller von Fluoreszenzmikroskopen, bei diesen Instrumenten die Möglichkeit optimaler Nutzung im Rahmen ihrer speziellen Anwendung vorzusehen und ein Mindestmaß an Fehlbedienung zu garantieren. Die Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie hat heutzutage einen Stand erreicht, bei dem sie im Grunde genommen jeder nur möglichen Aufgabe gewachsen ist, die innerhalb der derzeitigen Grenzen der Immunbiologie voraussichtlich gestellt werden könnte. Es ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, ein vereinfachtes Instrumentarium vorzustellen, das für allgemeine Untersuchungen mit Immunfluoreszenzmikroskopie und insbesondere für eine Übernahme in den Routinebetrieb diagnostischer Laboratorien sehr geeignet ist.

Wir sind der festen Überzeugung, daß jedes Labor – ganz gleich für welchen Zweck es Immunfluoreszenztechnik praktiziert und vor allem, wenn es noch keine große Erfahrung im Mikroskopieren besitzt – für die Fluoreszenztechnik ausschließlich ein speziell ausgerüstetes Mikroskop benutzen sollte. Nur auf diese Weise können all die Fehler, die ein dauerndes Wechseln von Beleuchtung, Filtern und Optik mit sich bringt, vermieden und eine Minderleistung der von allen Variablen am einfachsten zu kontrollierenden Mikroskopie ausgeschlossen werden. Irgend eines der zahlreichen fluoreszenzmikroskopischen Systeme mit dem ein Laborpersonal vertraut ist wird bei optimalem Einsatz zu besseren Resultaten führen als die falsche Anwendung einer hochspezialisierten Ausrü-

stung. Das hier zu beschreibende System ist durch seine gleichbleibend hohe Leistungsfähigkeit besonders geeignet.

Für die Routineuntersuchung schlagen wir vor, sich auf die Immunfluoreszenzmarkierung mit Fluoresceiniso-thiocyanat zu beschränken. Zur Mikroskopie ist dafür ein Zweiwellenlängen-System zu empfehlen:

1. Ultraviolettanregung in Verbindung mit einem farblosen Sperrfilter. Sie ergibt ein polychromatisch grünes Fluoreszenzbild des Tracers auf ungefärbtem, meist in schwachen Blautönen eigenfluoreszierendem Untergrund.
2. Schmalband-Blauanregung im Absorptionsmaximum des Fluoresceins in Verbindung mit einem gelbgefärbten Sperrfilter. Sie führt zu einem monochromatisch grünem Fluoreszenzbild der Tracer-substanz mit größerer Leuchtkraft gegen einen sehr viel blässeren, ungefärbten grünlichen Untergrund.

Die zur Zeit beste Lichtquelle für diese Mikroskopier-technik ist die Quecksilberdampf-lampe, die eine diskontinuierliche spektrale Emission mit vergleichsweise reichhaltigem Vorkommen der erforderlichen Wellenlängen besitzt. Lichtquellen mit kontinuierlicher Strahlung im Sichtbaren sind dagegen nicht geeignet. Allgemein gebräuchliche Quecksilberdampflampen sind die HBO (Osram) und CS (Philips) 50, 100 und 200 Watt. Die 100-W-Lampe ist am hellsten; aber sie erfordert zum Betrieb ein relativ teures Gleichstrom-Vorschaltgerät. Die 50-W- und 200-W-Hg-Lampen sollte man nach dem ersten Einschalten 2 bzw. 6 Stunden erschütterungsfrei „einbrennen“ lassen, damit nur ein einziger Krater und Brennfleck im Bereich des Entladungsbogens entsteht und ein flak-

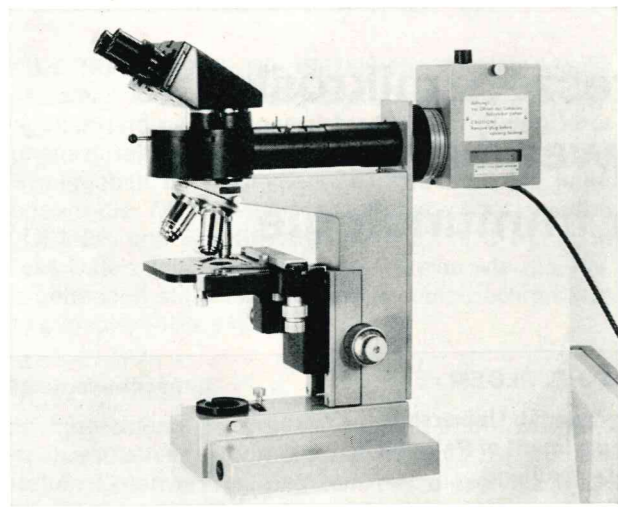


Abb. 1

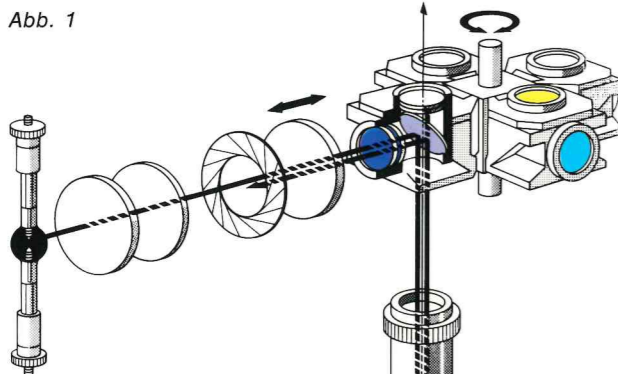


Abb. 2

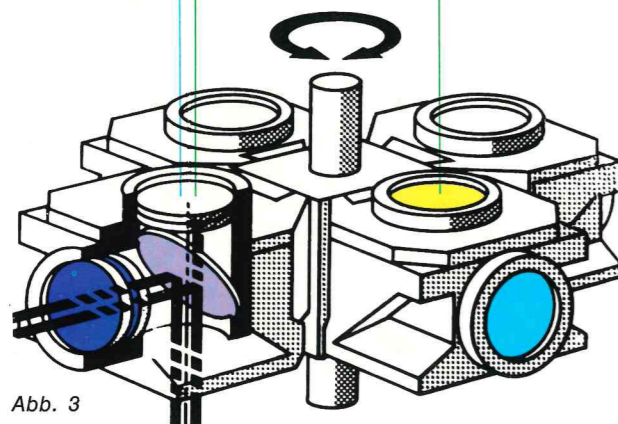
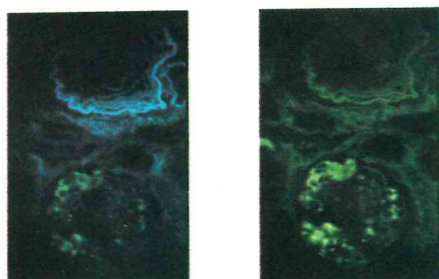


Abb. 3

Abb. 1: LEITZ Auflicht-Fluoreszenzilluminator PLOEMOPAK 2 am Mikroskop DIALUX®. (Ende 1974 lieferbar.)

Abb. 2: Schematische Darstellung des für FITC – Immunfluoreszenzmikroskopie ausgestatteten PLOEMOPAK 2.

Abb. 3: Schema der Zweiwellenlängen-Immunfluoreszenz gemäß Tabelle 1.

Abb. 4: Unfixierter Nierenbiopsie-Gefrierschnitt von einem Patienten mit proliferativer Glomerulonephritis. Unregelmäßige Immunglobulin-Ablagerungen werden durch Immunfluoreszenzfärbung mit fluoreszenzmarkiertem Anti-IgG lokalisiert; Vergrößerung im Mikroskop 100fach;

- a) Ultraviolettanregung und farbloses Sperrfilter ergeben ausgezeichneten Kontrast zwischen grüner Immunfluoreszenzfärbung und blauer Autofluoreszenz, die in der Elastica interna der Arterie (unten) besonders hell ist.
- b) Schmalband-Blauanregung und gelbes Sperrfilter zeigen erhöhte Brillanz der grünen Immunfluoreszenz gegen einen viel schwächeren grünlich autofluoreszierenden Untergrund.
- c) Breitband-Blauanregung und gelbes Sperrfilter zeigen nicht klar definierte Strahlungsintensitäten des Immunfluoreszenz-Tracers und Eigenfluoreszenz des Untergrundes. Die arterielle elastische Membran ist leicht zu verwechseln mit der hellen spezifischen Immunfluoreszenzfärbung.

Abb. 5: Immunfluoreszenzfärbung der Membran lebensfähiger menschlicher Lymphozyten in Suspension durch fluoreszenzmarkiertes Anti-Immunglobulin; Vergrößerung im Mikroskop 200fach.

- a) Die UV-Anregung zeigt die periphere Anfärbung eines Immunglobulin-positiven Lymphozyten („B-Zelle“); IG-negativer Lymphozyt („T-Zelle“) unten rechts, erkennbar durch die blaue Eigenfluoreszenz. Diese Methode erlaubt die Durchführung einfacher T- und B-Zellzählungen.
- b) Schmalband-Blauanregung zeigt eine erhöhte Brillanz der Membranfärbung der B-Zelle. Die T-Zelle ist unsichtbar. Hier ist das Studium der B-Zellen und ihre mikrofotografische Dokumentation leichter möglich, obgleich die Differentialzählung der T- und B-Zellen nicht durchführbar ist.

Abb. 6: Immunfluoreszenzfärbung von Mitochondrien in den Nierentubuli der Ratte mit Autoantibody-Humanserum; Vergrößerung im Mikroskop 50fach.

- a) Die Ultraviolettanregung ergibt das übliche polychromatische Bild. Man beachte hier wiederum die blaue elastische Innenmembran der Arterie oben rechts.
- b) Schmalband-Blauanregung zeigt verstärkte, optisch spezifische Strahlungsintensität der Immunfluoreszenzfärbung.
- c) Breitband-Blauanregung ergibt ein schwächeres und morphologisch unklares Bild.

Alle Mikroaufnahmen wurden mit dem ORTHOMAT® W auf hochempfindlichen Umkehrfarbfilm hergestellt: ANSCO-CHROME® (500 ASA) für Abb. 4, EKTACHROME® (320 ASA) für Abb. 5 und 6. Die Belichtungszeiten betragen bei Schmalband-Blauanregung 5 bis 10 Sekunden; bei Ultraviolettanregung waren sie um etwa den Faktor 4–8 länger.

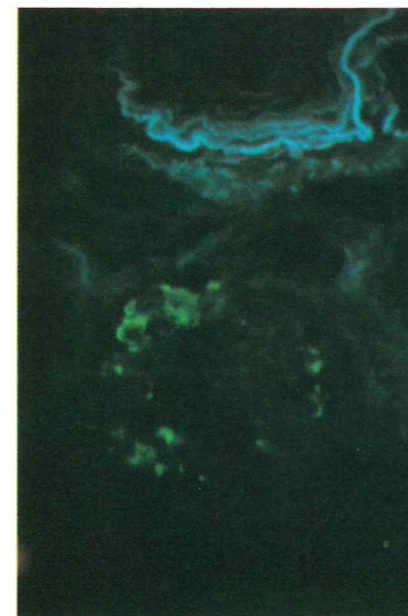


Abb. 4a

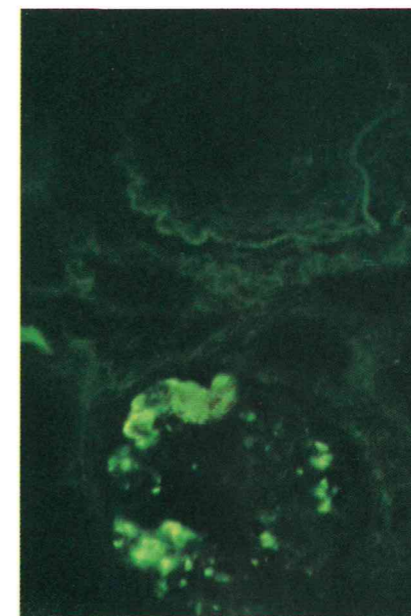


Abb. 4b

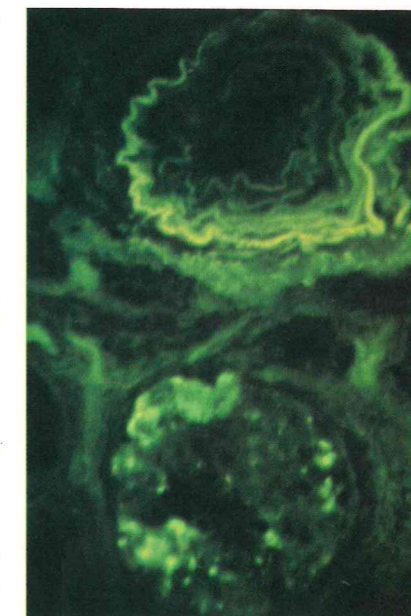


Abb. 4c



Abb. 5a



Abb. 5b

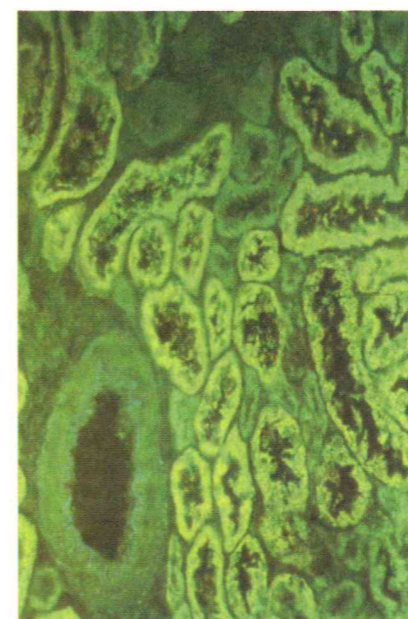


Abb. 6a

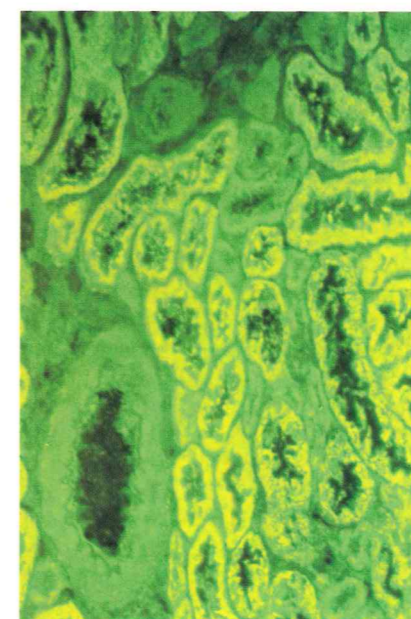


Abb. 6b

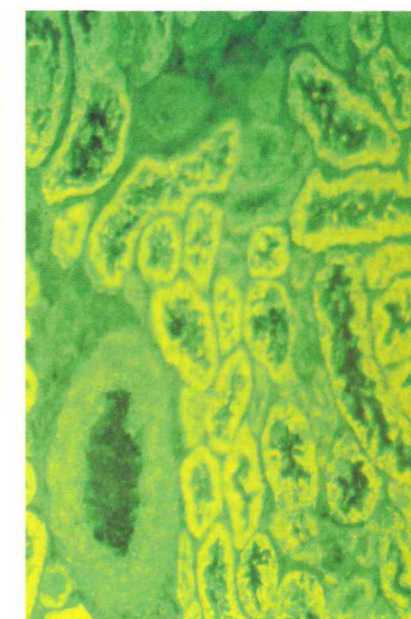


Abb. 6c

kerfreies Brennen bei der anschließenden Benutzung garantiert ist. Ein Wechselstrom-Stabilisierungsgerät ist für den Netzanschluß zu empfehlen, um evtl. Spannungsänderungen auszugleichen.

Am einfachsten ist die Fluoreszenzmikroskopie mit Auflichtbeleuchtung (PLOEM 1967) (Abb. 1 u. 2). Den höchsten Wirkungsgrad besitzt die Auflichtbeleuchtung in Verbindung mit Objektiven hoher numerischer Apertur, da Präparatbeleuchtung und Aufnahme der Fluoreszenzstrahlung quadratische Funktionen der numerischen Apertur des Objektivs sind. Immersionsobjektive verringern die Reflexion von Erregerlicht am Deckglas des Präparates und sind daher Trockensystemen vorzuziehen. LEITZ hat eine neue Serie von Wasserimmersionsobjektiven (W 25/0.60, W 50/1.00 und W 100/1.20) entwickelt. Diese Objektive erleichtern sehr das Arbeiten mit in Wasser eingeschlossenen Immunfluoreszenzpräparaten.

Auflichtbeleuchtung ist bei höheren Vergrößerungen (z. B. mit dem 50fachen Wasserimmersionsobjektiv) praktisch heller als die alternativ anwendbare Durchlicht-Dunkelfeldbeleuchtung und sie bleicht nur den Teil des Präparates aus, der sich effektiv im Objektfeld befindet. Für die Fluoreszenzmikroskopie mit schwachen Vergrößerungen (z. B. 25fache Wasserimmersion) und insbesondere bei UV-Anregung bevorzugt man jedoch das Durchlicht-Dunkelfeld.

Die derzeitigen Konstruktionen der schwachvergrößernden Objektive zeigen ein gewisses Maß an — in Zukunft vielleicht korrigierbarer — Fluoreszenz-„Aufhellung“, die möglicherweise durch Reflexionen kurzwelliges Lichtes und durch Eigenfluoreszenz einzelner Linsenglieder unter dem Einfluß von ultravioletter Strahlung bedingt ist. Diese Aufhellung des Bildes kann man im Falle der Routineuntersuchung ohne weiteres in Kauf nehmen — ja selbst bei der Mikrophotographie mit stärkeren Objektiven oder bei Schmalband-Blauanregung stört sie praktisch nicht. Leichtes und rasches Wechseln zwischen Ultraviolett- und Blauanregung (Tabelle 1 und Abb. 3) ermöglicht die spezielle Version des von LEITZ neuerdings entwickelten Vertikalilluminators PLOEMOPAK® 2\*). Dieser Illuminator ist so konstruiert, daß mit einer einzigen Bewegung die kompletten Filtersätze für UV- und Blauanregung in Sekundenschnelle gewechselt werden können, wodurch der unmittelbar aufeinander erforderliche Vergleich derselben Präparatstelle bei der jeweiligen Anregungswellenlänge wesentlich vereinfacht wird.

Ultraviolett-Auflichtbeleuchtung erhält man mit den Glasfiltern 4 mm BG 38 und 4 mm UG 1, die mit dem dichromatischen Teilerspiegel TK 400 und einem farblosen Sperrfilterglas K 400 kombiniert sind. Aufgrund der spektralen Energieverteilung des Hg-Lichtbogens liegt der Strahlungsschwerpunkt im Ultraviolett bei 365 nm.

Schmalband-Blauanregung erhält man mit einem 4 mm BG 38-Filter, zwei KP 490 Interferenzfiltern und einem Farbglas 1 mm GG 475 in Kombination mit dem

\* lieferbar Ende 1974

Tabelle 1: Filterkombinationen im LEITZ PLOEMOPAK 2

	Position		
	1	2	3
Erregerfilter	4 mm BG 38*) 2 + 2 mm UG 1*)	4 mm BG 38*) 2 x KP 490 1 mm GG 475	entfällt
Dichromat-Teilerspiegel	TK 400	TK 510	entfällt
Sperrfilter	K 400	K 515	entfällt
Anregungsstrahlung	Ultraviolett	Schmalband-Blau	entfällt
Fluoreszenzstrahlung	veränderliche grüne FITC-Fluoreszenz/stark blau autofluoreszierender Untergrund	starke Grünfluoreszenz von FITC/schwach grün autofluoreszierender Untergrund	Glühlampenbeleuchtung oder Phasenkontrast für konventionelle Mikroskopie

\*) Mitunter führen dünne Filter zu besseren Ergebnissen.

dichromatischen Teilerspiegel TK 510 und dem Gelbglas-Sperrfilter K 515. Der Schwerpunkt der Anregungsstrahlung liegt nahe dem Absorptionsmaximum von Fluorescein bei 495 nm. Eine etwas breitbandigere Blauanregung für ausnehmend schwache fluoreszierende Präparate wird durch Austausch des 1 mm GG 475 gegen ein 1 mm GG 455 erreicht.

Das Zweiwellenlängen-Beleuchtungssystem sollte für die Immunfluoreszenzmikroskopie bei Durchlicht-Dunkelfeldbeleuchtung ebenfalls Anwendung finden, wenn auch für die Routinearbeit mit dem PLOEMOPAK 2 eine Dunkelfeldeinrichtung nicht erforderlich ist. Zur Ultraviolett-Dunkelfeldbeleuchtung wird ein 2 mm UG 1-Glasfilter mit dem Sperrfilter K 400 kombiniert. Zur Schmalband-Blauanregung im Durchlicht-Dunkelfeld dient die Kombination BG 38, Interferenzfilter KP 490 und 1 mm GG 475 oder 455 mit dem Sperrfilter K 515. Es sei darauf hingewiesen, daß für Durchlicht-Dunkelfeld eine weniger strenge Filterung des Erregerlichtes erforderlich ist als beim Auflichtverfahren.

Zweiwellenlängen-Anregung in der Immunfluoreszenzmikroskopie ist den anderen vergleichbaren Methoden absolut ebenbürtig und beinhaltet darüber hinaus mehrere Vorteile:

1. Die UV-Anregung erlaubt eine morphologische Übersicht über markierte Bereiche gegen einen schwach wahrnehmbaren und durch Autofluoreszenz unterschiedlich gefärbten Präparathintergrund (Abb. 4a). Der leicht zu unterscheidende eigenfluoreszierende Hintergrund ermöglicht es dem erfahrenen Histologen, die Morphologie des Gewebes oft genau so gut wie nach Applizierung konventioneller Färbetechniken zu studieren. Sie stellt die Form der mikroskopischen Untersuchung dar, mit der die meisten Anwender der Immunfluoreszenz bereits vollends vertraut sind.

2. Die Schmalband-Blauanregung verbindet die optische Spezifität der Markierungen mit der zusätzlichen Möglichkeit des Erkennens sehr kleiner Tracermengen. Dies ist bedingt durch die Tatsache, daß fluoreszeinmarkierte Bereiche zu größerer Brillanz und das andere, eigenfluoreszierende Material nurmehr schwach angeregt werden. Die außerordentlich große Helligkeit verringert die Belichtungszeiten bei der Mikrophotographie beträchtlich. Besonders vereinfacht sich die Herstellung von Immunfluoreszenz-Mikrophotos in Schwarzweiß. Breitband-Blauanregung — sie wird ohne GG-Glasfilter erhalten — sollte man wegen der ihr fehlenden optischen Spezifität heute unbedingt verlassen, obwohl sie in der Immunfluoreszenzmikroskopie noch verbreitet angewendet wird. Denn helle Autofluoreszenz kann man sonst nicht sicher von der eigentlichen Fluoreszenzfärbung unterscheiden (Abb. 4c).

Automatische Mikrophotographie mit dem ORTHOMAT® W ist die Methode der Wahl bei Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit Hilfe der beschriebenen Systeme. Dies gilt sogar im Falle der Membranfärbung an einzelnen Zellen (Abb. 5a u. b). Man sollte die Kamera zusammen mit einem 100% strahlenteilenden Binophototubus benutzen, damit alles Licht sowohl für die Bildeinstellung wie auch für die photographische Belichtung zur Verfügung steht. Empfehlenswert ist es, am ORTHOMAT W die schwache Oku-

larvergrößerung (6,3 x) zu wählen, da die im Mikroskop wahrnehmbare Fluoreszenzintensität mit dem Quadrat der Reduktion der Gesamtvergrößerung zunimmt und somit eine merklich kürzere Belichtungszeit erlaubt. Die Belichtungszeiten sind in der Tat viel kürzer als man annimmt, da die Reziprozitätsfehler des Filmes und unnötiges Ausbleichen der Präparate hierbei abnehmen.

#### Anwendungen

Jede mittels bestehender Methoden angewandte Immunfluoreszenz-Untersuchung (NAIRN 1969) kann man einfacher und mit größerer Empfindlichkeit durchführen, wenn das System der Zweiwellenlängen-Anregung eingesetzt wird. Obwohl sie im Grundsatz durchaus auch entbehrlich ist, bringt die Auflichtbeleuchtung mit ihren Vorteilen dennoch einen zusätzlichen arbeitstechnischen Gewinn: man braucht u. a. weniger einzelne optische Komponenten zu justieren. Das System hat sich für Autoantibody-Erkennung (Abb. 6), für Membran-Immunfluoreszenz zur Zählung von T- und B-Lymphozyten (Abb. 5) und in der Immunhistologie der Glomerulonephritis (Abb. 4) ideal bewährt. Im Rahmen des augenblicklich weltweit wachsenden Interesses für eine „Klinische Immunologie“ als neuem Zweig der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik wird die hier beschriebene vereinfachte und verbesserte Immunfluoreszenzmikroskopie ein wertvolles Werkzeug der medizinischen und veterinärmedizinischen Diagnostik werden.

#### Literatur:

- Nairn, R. C.: Fluorescent Protein Tracing. 3rd Ed., Livingstone, Edinburgh 1969.  
 Ploem, J. S.: The use of a vertical illuminator with interchangeable dichroic mirrors for fluorescence microscopy with incident light. Z. wiss. Mikrosk. 68 (1967), 129.

#### Anschriften der Verfasser:

- Prof. Dr. Richard C. Nairn, Department of Pathology, Monash University Medical School, Prahran, Victoria, Australia,  
 Dr. Johan S. Ploem, Department of Pathology University of Leiden, Leiden, Holland

© = Eingetragenes Warenzeichen