



Over het verband tusschen precipitinen en agglutininen

<https://hdl.handle.net/1874/291035>

4.9.192, 1928.

OVER HET VERBAND TUSSCHEN PRECIPITINEN EN AGGLUTININEN

J. P. G. HULSHOFF POL

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

s.
cht

OVER HET VERBAND TUSSCHEN PRECIPITINEN EN AGGLUTININEN

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK UTRECHT



3969 3845

Diss Utrecht 1928

OVER HET VERBAND TUSSCHEN PRECIPITINEN EN AGGLUTININEN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE

AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT,
OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS DR.
B. J. H. OVINK, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT
DER LETTEREN EN WIJSBEGEERTE, VOLGENS
BESLUIT VAN DEN SENAAAT DER UNIVERSITEIT,
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER
GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN OP DINSDAG
26 JUNI 1928, 'S NAMIDDAGS 4 UUR, DOOR

JAN PIETER GERES HULSHOFF POL

ARTS, GEBOREN TE TANDJONG POERA (DELI), N.O.I.



1928

DRUKKERIJ Fa. SCHOTANUS & JENS, UTRECHT

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

Aan mijn Ouders

Daar mijn academische scholing in dezen arbeid haar einde vindt, grijp ik de gelegenheid aan om U, mijn Leermeesters der Utrechtsche Universiteit, mijn diepgevoelden dank uit te spreken voor de veelzijdige opleiding, die ik door Uw toedoen heb verkregen.

Hooggeleerde EYKMAN, nu dit proefschrift, dat de samenvatting is van in Uw laboratorium gedurende verscheidene jaren voortgezette onderzoekingen, is voltooid, gevoel ik hoezeer Ge mij aan U hebt verplicht met Uw voortreffelijke wetenschappelijke leiding.

Door Uw onafgebroken belangstelling en vriendschappelijke deelname, zijn Uw uitgebreide kennis en kritische zin mij een hoog gewaardeerde steun geweest voor de bewerking van deze dissertatie. De jaren, in Uw laboratorium doorgebracht, beteekenen voor mij een blijvende bron van wetenschappelijke en persoonlijke herinneringen.

Het is hier ook de plaats om den invloed te gedenken dien Gij, Hooggeleerde RINGER, op mijn vorming hebt gehad. De tijd, in het fysiologisch-chemisch laboratorium doorgebracht, deed zich in mijn later werk gelden. U, evenals mijn betreurden Leermeester PEKELHARING, behoort daarvoor mijn dank.

Zeër Geleerde van RIJSSEL, het was in Uw laboratorium, dat ik voor het eerst met de practijk der Serologie en Bacteriologie kennis maakte. Ik vergeet niet, hoe gij mijn belangstelling voor verscheidene harer problemen hebt weten te wekken.

Ofschoon, Zeër Geleerde BIJL, de drukke werkzaamheden aan de Bacteriologische Afdeeling van het Centraal Laboratorium zulks niet gemakkelijk maakten, hebt gij mij in de gelegenheid gesteld om dit proefschrift te voltooien, waarvoor ik U veel dank verschuldigd ben. Uw aangename omgang en die mijner Collegae aan het Laboratorium, stel ik op hoogen prijs.

In het bijzonder wensch ik nog de overwegende beteekenis, die het wetenschappelijk vuur en het voorbeeld mijns Vaders steeds voor mij hebben gehad, in dankbaarheid te gedenken.

INLEIDING

Reeds spoedig na het ontstaan der serologische wetenschap, is men erin geslaagd een groote verscheidenheid van antistoffen in het bloedserum van lijdens aan infectieziekten en van met bacteriën behandelde proefdieren te onderkennen; ook vond men dergelijke antistoffen, die ontstonden na parenterale toevoering van allerlei cellen en opgeloste stoffen aan het menschelijke of dierlijke organisme, welke hieraan vreemd waren. Als de voornaamste groepen dezer antistoffen gelden:

- 1e. de antitoxinen of gif (toxine-) bindende;
- 2e. de precipitinen resp. agglutininen of uitvlokkende;
- 3e. de complementbindende antistoffen.

Hierbij komen nog de opsoninen, die de phagocytose vergemakkelijken ¹⁾. Al deze *antistoffen* gelden als specifiek, d.w.z. ze reageeren uitsluitend of vooral met het *antigeen*, de substantie, die ze heeft doen ontstaan; daar zij het product zijn van een verworven immuniteit, noemt men ze ook immuunstoffen.

Aanvankelijk was men de meening toegedaan, dat men door middel van de verschillende toegepaste methoden (onschadelijk maken van vergiften bij proefdieren, uitvlokingsreacties in reageerbuizen enz.) ook werkelijk geheel verschillende antistoffen kon aantoonen. Wanneer men met een enkelvoudig antigeen — zooals een gezuiverde eiwitstof — een proefdier

¹⁾ De niet geheel in dit kader passende anaphylaxinen laat ik hier buiten beschouwing.

inspuit, dan ontstaat behalve precipitine ook complementbindende antistof. Werkt men evenwel met gecompliceerde antigenen, zooals b.v. het geval is, wanneer men bacteriën of roode bloedlichaampjes inspuit, die opgebouwd zijn uit een aantal verschillende eiwitstoffen, dan is het resultaat nog moeilijker te overzien volgens de oudere opvattingen, daar tegen al deze antigenen alweer verschillende antistoffen zouden worden gevormd. In den nieuweren tijd helt men over naar de opvatting, dat in waarheid het immuniseeringsproces niet zoo ingewikkeld is; voor elk antigeen, dat niet uit een aantal reageerende stoffen is samengesteld, zou men eerder de vorming van één enkele antistof mogen verwachten. De tegenstanders van deze *unitarische hypothese* — waarvan enkele aanhangers zich reeds in het begin van de ontwikkeling der serologie lieten gelden — grondde hun oppositie vooral op het feit, dat in vele gevallen deze antistoffen niet samengaan in hun werking; het komt voor, dat zij niet alle tegelijkertijd in het immuunserum aantoonbaar zijn, ook wanneer hun ontstaan voor een gegeven geval op goede gronden aangenomen mocht worden.

Een studie te leveren, die dit vraagstuk geheel omvat, is nauwelijks mogelijk. Van het oogenblik af, dat ik mijn onderzoekingen over dit onderwerp aanving, heb ik mij beperkt tot de groep der uitvlokkende antistoffen. Ook hier heeft men tusschen de hoofdtypen der specifieke uitvlokkingen: precipitatie en agglutinatie, verschillen opgemerkt, die men als bewijzen tegen de identiteit dezer antistoffen meende te mogen opvatten. Dit proefschrift is het resultaat van een poging, om in deze zaak eenige klaarheid te brengen. Ter verduidelijking zij nog even in herinnering gebracht, dat precipitinen antistoffen zijn, die uitvlokking teweeg brengen van een antigeen in opgelosten toestand, terwijl agglutinen hetzelfde doen met een gesuspenseerd (corpusculair) antigeen, b.v. bacteriën of lichaamscellen.

HOOFDSTUK I

HISTORISCH OVERZICHT EN STAND VAN HET VRAAGSTUK

In 1897 ontdekte *Kraus* (1), dat, door aan filtraten van bacterieculturen in bouillon een weinig serum van tegen deze bacteriën geïmmuniseerde dieren toe te voegen, in het mengsel neerslagen ontstonden, die van even specifieke aard bleken te zijn als de reeds gevonden agglutinatie-reacties. Deze neerslagen ontstonden n.l. alleen bij toevoeging van zulk een homoloog immuunserum; niet indien een serum van een niet behandeld dier (normaal serum) of van een met andere bacteriën geïmmuniseerd dier werd gebruikt. *Paltauf* (2), in wiens laboratorium deze proeven gedaan waren, heeft aanstonds getracht verband te leggen tusschen deze specifieke uitvlokkingen in cultuurfiltraten (precipitaties) en die welke bij de culturen zelf, door samenklontering der in de vloeistof zwevende bacteriën, konden worden opgewekt (agglutinaties). *Kraus* had n.l. gevonden, dat behalve bouilloncultuurfiltraten, ook extracten van de bacteriën zelf dergelijke precipitaties met homologe immuunsera vertoonden. *Paltauf* meende nu te moeten aannemen, dat het eigenlijk alleen op de precipitatie aankwam, en de agglutinatie der bacteriën geheel te verklaren was, doordat deze door het in de vloeistof ontstane precipitaat werden meegesleept naar den bodem van het proefbuisje. In deze theorie van *Paltauf* werd dus aan de bacteriën een geheel

passieve rol toebedeeld, en de ontwerper ervan heeft hiermee den geheelen strijd over het verband tusschen precipitatie en agglutinatie ontketend.

Proeven van Ch. Nicolle. Ch. Nicolle (3) heeft voor deze theorie experimenteele bewijzen zoeken te vinden. Hij herhaalde de proeven van Kraus, en voegde aan de cultuurfiltraten suspensies van geheel andersoortige bacteriën of ook wel anorganisch materiaal toe, en zag dan de suspensiedeeltjes geheel als bij een agglutinatie samenklonteren. Tevens werd een sterk versnelde reactie waargenomen. Zag hij b.v. met een filtraat van colibacillen-cultuur eerst na 15 à 20 uur precipitatie door het immuunserum optreden, bij toevoeging van typhus-, proteus- of psittacosisbacillen was er reeds na $\frac{1}{2}$ uur agglutinatie. Evenzoo: filtraten van den „vibrion de Massaouah” gaven na 24 uur precipitatie met het homologe serum, bij toevoeging van talkpoeder agglutineerden de suspensiedeeltjes reeds na 1 uur.

Kraus heeft zich in een onderzoek samen met Seng (4) voor deze proeven van Nicolle verklaard. Wat Nicolle vond voor de specifieke precipitatie, werd door Kraus en Seng ook aangetoond voor precipitatie van bacteriefiltraat-eiwitten door chemicaliën, zooals alcohol. Werd hierbij aan het filtraat de een of andere suspensie van anorganisch materiaal toegevoegd, dan agglutineerde de suspensie; in een contrôlebuis, waar de suspensie was toegevoegd aan physiologische zoutsolutie (dus zonder bacterie-eiwit), trad met alcohol geen agglutinatie op. Het feit, dat meestal in geagglutineerde bacteriemassa's om de bacteriën geen laagje van geprecipiteerd eiwit kon worden aangetoond, wordt niet aanvaard als tegenargument, daar in de bovengemelde proeven dit laagje (dat toch wel bestaan moet) evenmin door het met een microscoop gewapend oog kan worden ontdekt; zelfs door kleuring wordt het niet zichtbaar.

Niettemin is tegen de „mechanische” theorie van *Paltauf* en *Nicolle* een sterke oppositie ontstaan. Indien werkelijk, zoo redeneerde men, de agglutinatie afhankelijk is van een in de vloeistof gevormd precipitaat, dan moet men ook altijd in gevallen, waar agglutinatie wordt aangetoond, met het filtraat der culturen precipitatie kunnen opwekken. *Tchistovitch* (5), die overigens de proeven van *Nicolle* bevestigde, wees erop dat dit in 't geheel niet het geval is: vaak blijft de precipitatie uit, terwijl de bacteriën goed worden geagglutineerd door het specifieke serum. *Radzievsky* (6) heeft bevestigd, dat inderdaad *agglutinatie en precipitatie niet parallel gaan*. Om goed precipitabele filtraten te verkrijgen, moet men oude culturen, waarvan vele bacteriën zijn afgestorven en door de vloeistof uitgeloofd, filtreren; hiermee krijgt men een overvloedig precipitaat, terwijl zulk een oude cultuur in vele gevallen slecht agglutineert. Omgekeerd worden jonge culturen zeer gemakkelijk geagglutineerd, terwijl de filtraten zeer slechte of geen precipitates geven. Deze resultaten zijn wel algemeen aanvaard, zoodat de theorie van *Paltauf-Nicolle* geen lang leven heeft gehad.

Veeleer neemt men met *Gruber* en *Bordet* aan, dat het proces der agglutinatie zich afspeelt aan de oppervlakte der bacterie zelf, buiten invloed der precipitatie, die eventueel in de vloeistof plaats vindt. Het is evenwel duidelijk, dat deze opvatting op zichzelf geen conclusies toelaat aangaande de vraag, of men bij deze twee reacties met éézelfde antistof, of groep van antistoffen, te doen heeft, daar men bovengenoemde punten van verschil geheel kan terugbrengen tot het al of niet aanwezig zijn van precipitabele of agglutinabele substantie.

Het vraagstuk: *is bacterieagglutinine hetzelfde als bacterieprecipitine*, is, geheel onafhankelijk van de bovenbeschreven opvattingen, het onderwerp van een meningsverschil geweest, dat aanleiding was tot het schrijven van dit proefschrift, zoodat

de argumenten pro en contra dienen te worden uiteengezet. In hoofdzaak kunnen de argumenten, die tegen het z.g. unitarisch standpunt worden aangevoerd, in 3 groepen worden samengevat, waarvan de eerste twee, in tegenstelling met de derde, algemeen zijn erkend en aanvaard.

1e. *Bij de precipitatie-reactie kan men het antigeen sterk verdunnen, terwijl dit met het antiserum niet mogelijk is.* Hoe ver de verdunning van het antigeen (hier = precipitable substantie) kan gaan, is vooral gebleken, sinds men precipitinen tegen menselijke en dierlijke eiwithoudende vloeistoffen (serum, melk enz.) is gaan bereiden. Verdunningen van het antigeen van 1 : 10.000 en meer zijn niets bijzonders, indien men over een sterk antiserum beschikt.

Daartegenover kan men zelfs sterke antisera slechts weinig verdunnen, zonder dat zij hun werking verliezen. In het handboek van *Kolle en Wassermann* vindt men aangegeven dat de grens ongeveer de 1 : 40 bedraagt. In de litteratuur vond ik evenwel meer dan eens titers van $\pm 1 : 100$, terwijl ikzelf éénmaal (met paardeserum als antigeen) den titer 1 : 200 heb behaald.

Ik meen goed te doen erop te wijzen, dat volgens algemeen verbreide opgaven — die ik ook tijdens mijn onderzoek bevestigd vond — een serum ongeveer bij de verdunning 1 : 1000 de grens bereikt, waarbij nog door chemische middelen een eiwitneerslag kan worden verkregen. De specifieke neerslagen, met sterke antigeenverdunningen verkregen, bestaan dan ook bijna geheel uit precipitine van het antiserum afkomstig; het antigeen is dan zoo sterk verdund, dat het op zichzelf geen waarneembaar neerslag meer kan geven. Dit wetende, mag men de juistheid eener bewering als van *Cromwell* (7), die met een (haemoglobine-) antigeenverdunning van 1 : 200.000 en een antiserumverdunning van 1 : 4.000 nog precipitaten zag, met reden betwijfelen.

2e. *Bij de agglutinatie-reactie kan men het antiserum sterk verdunnen, terwijl dit met het antigeen niet mogelijk is.* Bij de agglutinatie is het dus geheel omgekeerd: antiserum-verdunningen van 1 : 10.000 zijn gemakkelijk te bereiken, en herhaaldelijk zijn veel hogere titers waargenomen. Daartegenover staat, dat men een bacteriesuspensie reeds na betrekkelijk geringe verdunning al niet meer voor de agglutinatieproef gebruiken kan. Een verhouding, waarbij het conglomeraat in hoofdzaak uit antistof bestaat (verg. boven precipitinen), komt hier dan ook niet voor.

3e. *Precipitinen en agglutininen zijn niet altijd beide tegelijk in een antiserum aantoonbaar.* Bestaat bij de beoordeeling der twee vorige groepen van gegevens een communis opinio, hier is het geheel anders gesteld: er heerscht in dit opzicht de grootste verwarring en tegenspraak. Na hetgeen zooeven is gezegd over de critiek op *Paltauf* en *Nicolle*, heeft men weinig moeite om in te zien, van welk een belang het is, te letten op *quantitatieve verhoudingen*. Het is *Kraus*, de belangrijkste verdediger van het unitarische standpunt, die hierop sterk den nadruk heeft gelegd. *Radzievsky* in zijn meergemeld onderzoek, en na hem *Bail* (8), vonden dat de vloeistof boven het precipitaat, verkregen door toevoegen van een bacteriefiltraat aan het antiserum, nog bijna even sterk de homologe bacteriën agglutineerde als het serum vóór de toevoeging van het filtraat. *Kraus* en *v. Pirquet* (9) wezen er terecht op, dat de toevoeging van een willekeurige hoeveelheid filtraat niet den minsten waarborg geeft, dat men inderdaad al het precipitine verwijderd heeft. Zij herhaalden deze proeven, en wisten de verhouding antiserum-filtraat zoodanig te kiezen, dat met het precipitaat vrijwel alle agglutininen werden verwijderd.

Ingewikkelder is de polemiek, te voorschijn geroepen door de *onderzoekingen van Gaethgens* (10). Deze verrichtte een onderzoek bij konijnen, die hij met typhusbacillen inspoort en

die hij 24 uur later bloed aftapte ter bepaling van het gehalte aan precipitinen en agglutininen tegenover typhus. De meeste dezer dieren gaven een serum, dat met bacillen en hun filtraat geen specifieke reactie vertoonde; enkele gaven echter een positieve precipitatiereactie, terwijl de agglutinaties negatief was. Weliswaar moet men in aanmerking nemen, dat de precipitineproef — verricht volgens de ringmethode — gedaan kan worden met onverdund serum, terwijl men, om onspecifieke (d.i. niet door de specifieke antistof gegeven) agglutinaties te ontgaan, het serum moet verdunnen (*Gaethgens*, die met jonge konijnen experimenteerde, paste de verdunning 1 : 5 toe). Toch blijft dit resultaat merkwaardig, als men zich herinnert dat men de agglutinatietoets met zoo verbazend geringe hoeveelheden antistof kan uitvoeren, in tegenstelling met de precipitatieproef. Ook de precipitinogenen zouden zich anders gedragen dan de agglutinogenen; zij zouden n.l. sneller uit het bloed verdwenen zijn (aangetoond door het serum bij andere dieren in te spuiten).

Tegenspraak is evenwel niet uitgebleven. *Fukuhara* (11) sprak het onderzoek van *Gaethgens* op alle punten tegen, na herhaling van zijn proeven. Hij meende diens waarnemingen te moeten toeschrijven aan onspecifieke precipitaties. *Gaethgens* nam onmiddellijk dit argument over, en sprak in een verweer (12) op zijn beurt twijfel uit over de precipitatietechniek van *Fukuhara*. Door *Amiradzibi* en *Kaczijnski* (13), die zich op aandringen van *Kraus* in de polemieken hebben gemengd, en eveneens *Gaethgens* op alle punten bestrijden, wordt deze vraag alweer naar voren gebracht: is de ringproef bruikbaar voor het aantoonen van zwakke specifieke reacties? Deze zuiver technische kwestie heeft veel aandacht getrokken, en zal later in dit proefschrift nader worden besproken; het is evenwel zeker, dat deze critiek het standpunt van *Gaethgens* heeft verzwakt. Anderen zijn hem echter bijgevalen; zoo vond *Müller* (14), dat bij inspuiting van caviae met malleus-culturen

eerst precipitinen, en dan agglutininen aantoonbaar zijn, terwijl bij konijnen het omgekeerde werd waargenomen: eerst agglutinatie, en later precipitatie.

Een en ander rechtvaardigt de opvatting, dat inderdaad in een immuunserum, ook met een betrouwbare en zorgvuldig uitgevoerde techniek, niet altijd tegelijk precipitinen en agglutininen tegenover de gebruikte bacteriestam zijn aan te toonen. Wij zijn dus verantwoord door deze waarnemingen, om de onder de 3e groep samengevatte stelling voorloopig als werkhypothese te aanvaarden.

De theorie van Bordet betreffende het verschijnsel der agglutinatie heeft de physisch-chemische beschouwingswijze der immuniteitsreacties in eere gebracht. *Bordet* heeft het eerst gewezen op de overeenkomst, die er bestaat tusschen het samenklonteren van bacteriën onder den invloed van een immuunserum, en de uitvlokking van gesuspendeerd anorganisch materiaal (15, 16). Hij toonde aan, dat voor het een, zoowel als voor het ander, de aanwezigheid van zouten een groote beteekenis heeft. Sinds zijn onderzoekingen zijn we gewoon het agglutinatieproces te verdeelen in 2 fasen: 1e de binding van het agglutinine aan de bacteriën, waarbij geen invloed van zouten is vast te stellen, en 2e de uitvlokking der met agglutinine beladen bacteriën, die onder den invloed van zouten plaatsvindt, en bij afwezigheid van zouten uitblijft.

Hier worden met agglutinine beladen bacteriën vergeleken met suspensies, als die van kaoline, die reeds uit zichzelf de eigenschap hebben van door geringe hoeveelheden chloornatrium of andere zouten uit te vlokken. In deze beschouwingswijze van *Bordet* is geen plaats voor de precipitinereactie, waarbij het antiserum inwerkt op het colloidaal opgeloste antigeen in plaats van op een suspensie van organisch materiaal. Ik heb mij afgevraagd, of wellicht uit dit verschil van physisch-chemischen aard de tegenspraak, die op dit ge-

bied heerscht, kan worden afgeleid, en of de hierboven beschreven tegenstellingen tusschen precipitatie en agglutinatie kunnen worden verklaard door de afwijkingen in verdeeling van het antigeen (fijne, colloïdale of grove, microscopische) in aanmerking te nemen.

De opzet der proeven, van dit gezichtspunt uit genomen, zal in het volgende hoofdstuk worden medegedeeld. Het beginsel, waarvan ik uitging, was als volgt: indien wij als *werkhypothese* aannemen, dat agglutinatie en precipitatie, bij een typhusbacillencultuur b.v., worden veroorzaakt door precies dezelfde antistof of antistoffen, dan moet het gelukken door een willekeurig colloïdaal opgelost antigeen te veranderen in een gesuspendeerd antigeen, het karakter der immuniteitsreactie zoodanig te wijzigen, dat men in plaats van een precipitatie, een agglutinatie met haar typische kenmerken ziet optreden. Ik meende het best zulk een colloïdaal opgelost antigeen in een gesuspendeerd te kunnen veranderen, door het te adsorbeeren aan fijn verdeeld suspensiemateriaal.

HOOFDSTUK II

ALGEMEENE TECHNIK DER ONDER- ZOEKINGEN

Precipitatietechniek.

Voor mijn proeven werden een aantal konijnen geïmmuniiseerd met Paardeserum (P.S.) en andere met Caseïne, uit koemelk bereid (Cas.), waarbij van de ontstane antistoffen in studie werden genomen de precipitinen. Het optreden van agglutinen is iets, dat bij deze methodiek kan worden uitgesloten. Agglutinen zijn immers antistoffen, die ontstaan na het toevoeren van cel-elementen van vreemde herkomst (bacteriën, roode bloedlichaampjes) aan het proefdier en het vermogen bezitten om deze cellen uit te vlokken. Weliswaar kunnen agglutinen ontstaan na injectie van celvrije vloeistoffen; in dit geval kan men er b.v. op rekenen, dat door de injectie van paardeserum agglutinen tegenover de erythrocyten van het paard ontstaan. Men kan dit niet opvatten als een bewijs, dat precipitinen en agglutinen hier gelijk zijn, daar er voorbeelden te over zijn van het optreden van antistoffen voor antigenen van zeer verschillende herkomst, bij het injecteeren van één dezer (heterologe antigenen). Maar wèl is het een feit, dat agglutinine ontstaat na de injectie van het bacterie-extract; dit kan ook het geval zijn bij het inspuiten van serum, daar dit bestanddeelen van erythrocyten kan bevatten, en geringe hoeveelheden antigeen antistoffen kunnen doen ontstaan.

Ik ben daarom een stap verder gegaan en heb op een later uitvoerig te beschrijven manier mijn colloidaal opgeloste antigenen gebracht in den vorm van suspensies, met bacteriën vergelijkbaar, door ze n.l. aan organisch of anorganisch suspensiemateriaal te adsorbeeren.

Nu reeds kan ik mededeelen, dat zoodoende met agglutinaties nauw verwante reacties door middel van immuunsera konden te voorschijn geroepen worden. Voor het paardeserum geldt nog de tegenwerping, dat dit verontreinigd kon zijn met bestanddeelen van bloedcellen (agglutinogenen); voor het caseïne is dit moeilijk te aanvaarden, daar dit met veel zorg werd gezuiverd.

Bereiding van zuivere caseïne uit koemelk. Een afgemeten hoeveelheid taptemelk, die eerst nog eenige malen door een dik papierpapfilter was heengezogen, werd met het viervoudige volume leidingwater verdund, en daarna met 5 % azijnzuur gemengd, totdat een maximale uitvlokking werd bereikt. Dan werd de vloeistof afgefiltreerd, en het neerslag met gedestilleerd water gewasschen, totdat het waschwater met lakmoespapier geen verkleuring meer gaf. Vervolgens werd het neerslag uitgeperst tusschen filtreerpapier, en met 0.6 % NaOH en physiologische zoutoplossing (phys. NaCl) opgelost, waarbij zorg werd gedragen, dat de vloeistof niet alkalisch werd. Met deze neutrale oplossing werd nog 3 maal de bewerking herhaald; de laatste maal geschiedde de wassing grondiger, met het doel een zorgvuldiger reiniging te verkrijgen: het waschwater werd met zilvernitraat en salpeterzuur onderzocht op chloorionen, en de bewerking voortgezet totdat deze niet meer aan te toonen waren.

Aan de laatste wassing ging nog vooraf de *steriliseering*, die noodig werd geoordeeld om te verhinderen, dat de proefdieren werden geïnfecteerd met levende, pathogene kiemen. Daar Wright (17) heeft aangetoond, dat eerst bij zeer lang-

durige verhitting van een neutrale caseïne-oplossing racemiseering optreedt van het caseïne-molecuul, mag men aannemen dat de veranderingen, die men vóór dien tijd waarneemt (moeilijke oplosbaarheid o.a.), berusten op fysische veranderingen. Het bleek, dat wij genoeg hadden, voor ons doel, aan een éénmalige verhitting bij 100° C. in den stoomcylinder gedurende $\frac{1}{2}$ uur.

De gezuiverde en gesteriliseerde caseïne werd op een glazen plaat dun uitgespreid en in de broedstoof bij 37° gedroogd. Het bleek, dat na 48 uur in de stoof gebleven te zijn, de eiwitmassa een constant gewicht had bereikt, maar na 24 uur is toch de droging al zeer dicht hiertoe genaderd, zoodat ik op den duur met 24 uur drogen kon volstaan.

Bereiding van caseïne-oplossingen. Hiertoe werd een bepaalde hoeveelheid caseïne afgewogen, en in een kolfje, met phys. NaCl in een waterbad van $46-50^{\circ}$ C. geplaatst. Hierbij zwelt de caseïne door wateropneming, hetgeen noodig is om een volledige oplossing te bereiken. Dit weeken kan men ook bij lagere temperatuur doen, maar dan moet men het kolfje gedurende langeren tijd in de ijskast zetten (om bacteriegroei te voorkomen). De geweekte caseïne wordt in een mortiertje gewreven, onder toevoeging van het weekwater en NaOH 0.6 %, waarbij ze grootendeels, maar niet geheel oplost. Daarna brengt men de massa quantitatief over in een buis, waar met een glaspotlood-streep het verlangde volume is aangegeven op den buitenkant, vult met phys. NaCl aan tot de streep, en nu wordt meestal alles opgelost door de buis in een waterbad van $60-62^{\circ}$ C. te plaatsen gedurende 10—15 minuten. De reactie moet nu tegenover lakmoes amphoteer of zwak alkalisch zijn.

Zulke caseïne-oplossingen werden herhaaldelijk gecontroleerd op steriliteit door aërobe en anaërobe cultuur; nooit werden levende bacteriën aangetoond, ook niet als de op-

lossing eenige weken was bewaard. Microscopisch, in den hangenden druppel, zag ik evenmin bacteriën; wèl ziet men nog vrij veel fijne droppeltjes zweven, die naar alle waarschijnlijkheid uit vet, afkomstig van de melk, bestaan. Het zou voor de hand liggen, ter wille van een zuiver caseïne-preparaat, dit vet uit de gedroogde caseïne te extraheeren; evenwel zag ik daarvan af, daar in de eerste plaats het niet gemakkelijk is eiwit zodoende geheel van vet te ontdoen, en verder de inwerking van extractie-middelen als aether, alcohol en aceton, het eiwitmolecuul chemisch kan aangrijpen en zodoende de caseïne althans gedeeltelijk zou veranderen. Daar het nu bewezen is, dat chemische veranderingen samen-gaan met wijziging van de serologische eigenschappen van een eiwit, zou hierdoor het groote voordeel van het enkelvoudige antigeen, dat wij in caseïne bezitten, verloren gaan. Vet daarentegen bezit, zooals bekend, geen antigene eigenschappen en kan dus in dit opzicht niet storend werken.

Techniek der precipitatie-reactie. Met de aldus bereide steriele caseïneoplossingen en met steriel gewonnen paardeserum werden konijnen intraveneus ingespoten, waarbij in den regel tusschen-ruimten van 7 dagen tusschen twee opeenvolgende injecties werden in acht genomen: alleen om bijzondere redenen werd van dezen regel afgeweken. De hoeveelheid geïnjectieerd *anti-geen* bedroeg — met uitzondering van de allereerste injectie, die vaak kleiner werd genomen — voor het paardeserum 2 à 3 cc. en voor caseïne een overeenkomstige hoeveelheid, berekend naar het eiwitgehalte van paardeserum. Ter wille van de overzichtelijkheid der gegevens werd deze verhouding uitgedrukt in de eenheid S. Deze drukt uit een eiwitgehalte, ongeveer gelijk aan dat van paardeserum, dat $\pm 8\%$ eiwit bevat.¹⁾ De meestal voor injectie gebruikte caseïne-oplossingen bevatten 4% caseïne, dus de sterkte was $\frac{1}{2}$ S.

¹⁾ Zie Hammarsten, Lehrbuch d. physiol. Chemie, 1922, p. 213, 214.

Dezelfde methode werd gebruikt voor het noteeren der antigeenverduunningen, die bij de eigenlijke precipitatieproef werden gebruikt. Ik merk nog op, dat met betrekking tot de antigenen steeds van *verduunning* wordt gesproken in dit proefschrift; met het woord *titer* wordt steeds de *titer der serumverduunning* bedoeld, zulks om verwarring tusschen precipitatie- en agglutinatietiter (welke laatste steeds door de serumverduunning wordt aangegeven) te voorkomen.

De sera werden gewonnen door het bloed uit de oorvena of uit het hart (door punctie) af te tappen, en 24 uur te laten staan. De bloedkoek werd zooveel mogelijk afgecentrifugeerd, en het vervolgens afgegoten serum door centrifugeeren van bloedlichaampjes bevrijd. De bloedafneming geschiedde steeds, vóórdat een nieuwe injectie werd gegeven. Door de dieren, volgens het voorschrift, tevoren minstens 18 uur te laten hongeren, slaagde ik er in vele gevallen in, een volkomen helder serum te verkrijgen. Evenwel lukte dit toch zelfs met genoemde voorzorg niet altijd, zoodat een aantal sera toch eenigszins opalescent waren. Bovendien ontstaat bij het afnemen van grootere hoeveelheden bloed licht haemolyse, vooral wanneer de bloedwinning op bezwaren stuit (kleine vaten, slechte punctie). Inactiveering der sera (bij 55° C.) had niet plaats.

Ringmethode of mengmethode? Deze twee factoren, opalescentie en haemolyse, die soms niet te vermijden zijn, gaven ernstige moeilijkheden, toen ik de ringmethode, die het meest gebruikelijk is, toepaste. Hetzij men het verdunde antigeen op het serum laat vloeien (*Ueberschichtung* volgens *Ascoli*), of het serum onder het verdunde antigeen brengt (*Unterschichtung* volgens *Uhlenhuth*), in beide gevallen ondervindt men het bezwaar, dat bij onvolkomen heldere of haemolytische sera eenerzijds ringvormige nevels (*pseudoringen*) ontstaan, anderzijds werkelijk specifieke precipitatieringen moeilijk waar te nemen zijn. Het eerste feit, dat ik zelfs bij heldere sera waar-

nam na toevoeging van phys. NaCl, is o.a. uitvoerig besproken in de reeds vermelde discussie naar aanleiding van *Gaethgens'* precipitatieproeven, en is aanleiding geweest, dat men *Gaethgens* en zijn dualistische medestanders heeft verdacht van het aflezen van onspecifieke reacties. Hiertegen hebben zij aangevoerd, dat men geen gevaar loopt van zich te vergissen, indien men het let op de kwaliteit van den ring: dichte, „dekkleurige” ring tegenover lichte, „lakkleurige” ring, welke laatste onspecifiek is. Bovendien moet bij een positieve ringproef den volgenden dag een neerslag op den bodem van het buisje te zien zijn.

Wat het eerste betreft: dicht en licht zijn in de practijk niet altijd gemakkelijk te onderscheiden. Bovendien, als men aan den ring zeer strenge eischen stelt, om met zekerheid dit gevaar te ontgaan, dan lijdt de gevoeligheid van de methode. Hetzelfde geldt voor den eisch, dat men een neerslag moet kunnen waarnemen. Men vraagt zich af: als het toch om een neerslag te doen is, zou het dan niet eenvoudiger zijn om de vloeistoffen te mengen?

Een nieuwere methode, door *Friedberger* en zijn school (18, 19) in zwang gebracht en die berust op een verschijnsel, reeds door anderen (*Fornet*, *Müller*) waargenomen, schijnt meer zekerheid te brengen, maar mist alweer groote gevoeligheid. Zoo zou volgens *Ikeda* (19) een serum, dat nog een positieve ringproef geeft met antigeen, verdund tot 1 : 20.000, den dubbelen ring van *Friedberger* nog slechts met antigeen 1 : 1000 geven.

Ik heb mij voor dit onderzoek, uit onvoldaanheid met de ringproef, gewend tot de *mengmethode*, waarbij ik, na de noodige ervaringen, vergissingen kon uitsluiten, terwijl de methode toeliet om met zeer sterke verdunningen, zoowel van antigeen als antiserum, te werken. De gevoeligheid der methode bleek zelfs voor mijn doel, waar het erop aankwam om ook zwak precipiteerende sera te titreeren, geheel voldoende. Door

te werken onder contrôle met phys. NaCl, zoowel als heteroloog antigeen, kwam ik een factor te onderkennen, die voor deze methode een gevaarlijke bron van fouten genoemd mag worden, en toch als zoodanig niet in de door mij bestudeerde litteratuur wordt vermeld.

Het natroevelen der sera is deze factor, die niet bij alle sera in gelijke mate optreedt, en naar het schijnt niet door de mij bekende critici der mengmethode als bron van fouten is onderkend. Wanneer b.v. *Gaethgens* en *Müller* 24 uur na menging van normale sera met bacterie-filtraten of -extracten fijne nevels waarnemen, dan meen ik, dat zij waarschijnlijk dezelfde nevels hebben gezien, die bij sommige konijnensera reeds 24 uur na de gewinning optreden, en bedrieglijk veel lijken op specifieke precipitaten. De contrôle met phys. NaCl of heteroloog antigeen wijst deze natroevelingen onfeilbaar aan, en men hoeft deze contrôles niet eens tegelijk met de specifieke proef te nemen, daar zij in het ongemengde serum even snel ontstaan.

Het bedrieglijke van deze troebelingen is, dat zij in het onverdunde serum niet altijd makkelijk waar te nemen zijn.

Het kan b.v. gebeuren, dat men meent een vrijwel helder serum te gebruiken, en door eenvoudige verdunning met phys. NaCl eensklaps de fijne vlokjes ziet. Nauwkeurige contrôle met de loupe toont deze dan ook zonder uitzondering in het onverdunde serum aan, waarvan het hooge gehalte aan colloidien wellicht aansprakelijk is voor het gezichtsbedrog.

Wanneer men tracht, ter wille van de nauwkeurigheid der proef, deze natroevelingen door het voor de hand liggende middel, centrifugeeren, te verwijderen, dan komt men bedrogen uit. Urenlang centrifugeeren vermag zulk een serum niet geheel te verhelderen. Waar ik het noodig vond dit te bereiken, heb ik de sera van troebelheid bevrijd door ze 8—12 maal door een klein papierfilter te halen. Ik moet erbij zeggen, dat de troebeling meestal niet zoo sterk is, dat zij voor den

geofende, die erop verdacht is, de waarneming der toch anders gevormde, specifieke precipitaten stoort. Is dit wèl het geval, dan doet men het best, zulk een serum eenige dagen te laten staan, alvorens het te filtreeren, daar de troebeling zich dan niet zoo spoedig herhaalt. Slechts in één geval heb ik een voortgezette neiging tot uitvlokken bij een konijneserum gezien, waarbij in enkele weken steeds grootere precipitaten zich op den bodem van de serumbuis ophoopten, ofschoon het serum steriel bleek te zijn. Dit geval betrof een konijn, dat te gronde ging onder verschijnselen, die op chronische anaphylaxie wezen, en stervende was toen de punctie verricht werd.

Ik heb wel eens gemeend, dat deze natroebelingen door herhaald injecteeren en bloedafappen ontstonden, maar ik heb het verschijnsel sedert zoo vaak gezien bij sera van normale, niet tevoren behandelde of afgetapte dieren, dat deze opvatting niet houdbaar bleek te zijn.

Toepassing der mengmethode. Meestal worden precipiteerende sera niet getriteerd naar de serumverduunning, maar men bepaalt hun sterkte door de verduunning van het antigeen, waarmee de precipitatie nog is waar te nemen. Daar het in mijn bedoeling lag de precipitatie met de agglutinatatie te vergelijken, heb ik daarentegen steeds de sterkte van een precipiteerend serum bepaald door den *serumtiter* ten opzichte van een bepaalde antigeenverduunning; hierdoor kreeg ik met de agglutinatatie beter vergelijkbare waarden.

Ik ging steeds als volgt te werk: serum en opeenvolgende verduunningen daarvan worden gemengd met gelijke deelen antigeenverduunning. De laagste serumtiter was dus steeds $\frac{1}{2}$.

Voor het antigeen vindt men in de proeven en tabellen steeds opgegeven de verduunning van het antigeen, die aan het serum en deszelfs verduunningen wordt toegevoegd. Om

de antigeenverduunning in het mengsel te weten, moet men den opgegeven verdunningsgraad dus verdubbelen.

Ten slotte nog een woord over de noteering der precipitaten, waarbij in den regel de 3 volgende graden werden onderscheiden, met de bijgegeven teekens:

++ = met het bloote oog zijn vlokken waarneembaar, met een duidelijk precipitaat op den bodem van het buisje.

+ = met het bloote oog zijn in de vloeistof vlokken waarneembaar, zonder een gemakkelijk waarneembaar precipitaat.

± = opalescentie der vloeistof; met een zwakke loupe ziet men duidelijk vlokjes (bij lamplicht te bekijken).

Evenwel is deze noteering niet altijd gebruikt; men zal tabellen aantreffen waar alleen het teeken + gebruikt is.

Adsorptietechniek.

Naast de eigenlijke precipitatie-reactie werd, zooals gezegd, een methode toegepast, waarbij het antigeen (caseïne of paardeserum) werd geadsorbeerd aan een suspensie (zie pag. 18 en 20). Teneinde verwarring te voorkomen, zal in het vervolg de methode, waarbij immuumsera inwerken op deze suspensies, waaraan antigeen was geadsorbeerd, die der *suspensie-precipitatie* worden genoemd; hiervan wordt de precipitatie met colloïdaal opgelost antigeen als *sol-precipitatie* onderscheiden.

Het geluk diende mij, dat deze proeven eerst verricht werden met caseïne, daar dit voor dit doel meer geschikt bleek te zijn dan paardeserum. Mijn uitgangspunt was het onderzoek van *Landsteiner* en *Uhlirz* (20), die serumeiwitten aan silicaten en andere fijnkorrelige materialen adsorbeerden, en vonden dat daarbij een groot gedeelte der eiwitten werd geadsorbeerd, en wel te meer naar mate het eiwit gemakkelijker is uit te zouten met ammoniumsulfaat. Van het euglobuline (gemakkelijkst uitzoutbare fractie) werd zoo gevonden, dat uit de verdunde oplossing 71 % van het eiwit wordt

verwijderd; bij sterker oplossingen daalt dit percentage, terwijl toch de totale hoeveelheid geadsorbeerd eiwit stijgt. Verder vonden zij, dat zure en basische silicaten beter eiwit adsorbeerden dan neutrale.

Deze onderzoeken zijn geheel in overeenstemming met hetgeen ons bekend is omtrent *adsorptie van eiwitten aan suspensies*.¹⁾

Eiwitten hebben in het algemeen in fysisch-chemisch opzicht de eigenschappen van hydrophile colloïden, die hun naam ontleenen aan het feit, dat zij uit den vasten toestand (gedroogd of uitgezouten) gemakkelijk door oplossing in vloeibaren (hier: in water) overgaan. Zulke hydrophile colloïden kunnen eerst door grootere hoeveelheden neutraal zout worden uitgevlokt.

Hiertegenover staan de hydrophobe (moeilijk in water oplosbare) of suspensiecolloïden, die met kleine hoeveelheden zout reeds uitvlokken. Deze eigenschap hebben de suspensiecolloïden gemeen met de eigenlijke suspensies, die in tegenstelling met alle colloïden uit microscopisch waarneembare deeltjes bestaan.

Wanneer men opgelost eiwit samenbrengt met suspensies van kool, kaoline enz., dan wordt het aan de oppervlakte sterk geadsorbeerd; een merkwaardigheid hierbij is, dat de adsorptie min of meer irreversibel is.

Verder is het opmerkelijk, dat als adsorbens zowel zure als basische suspensies kunnen dienst doen. Men is gewend bij colloïden waar te nemen, dat zij geadsorbeerd worden aan suspensies van tegengestelde elektrische lading. Eiwitten uit physiologische vloeistoffen plegen electronegatief geladen te

¹⁾ Voor de volgende uiteenzetting ontleen ik aan R. Höber, *Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe*, 1924. Weliswaar worden in dit werk voorbeelden genoemd van suspensies met fijner korrel dan de bij deze onderzoeken gebruikte (b.v. onoplosbare kalkzouten, p. 288), doch dit bleek in 'beginsel geen verschil uit te maken.

zijn, daar zij zwak zuur reageeren, en in het lichaam door middel van alkali zijn opgelost, zoodat men de verbinding, b.v. Na^+ —eiwit— krijgt. Nu zou men verwachten, dat zulk eiwit enkel door electropositief geladen (basische) suspensies wordt geadsorbeerd. Dat dit niet het geval is, maar ook electronegatief geladen (zure) suspensies eiwitten goed adsorbeeren, wordt toegeschreven aan het amphotere karakter dezer stoffen, waardoor zij in licht alkalische oplossing toch ook kationen (positieve ionen) kunnen vormen. Toch pleegt de adsorptie aan alkalische suspensies gemakkelijker en vollediger plaats te vinden.

Wanneer eiwit in voldoende quantiteit wordt geadsorbeerd, neemt men het verschijnsel waar, dat de suspensiedeeltjes de eigenschappen van het geadsorbeerde eiwit eenigermate gaan overnemen, d.w.z. zij gedragen zich nu in sommige opzichten als hydrophile colloïden. Men kan dit opmerken, doordat de suspensie bestendig is geworden tegenover verdunde zoutoplossingen. Het ongevoelig worden voor een zwakke zoutoplossing kan men dus gebruiken als symptoom van een adsorptieproces.

Adsorptie van caseïne. Hiervoor werden als adsorbens achtereenvolgens beproefd: *anorganische*, en wel zure, n.l. kaoline, talk, acidum silicicum, terra silicia — zoowel als basische, n.l. magnesiumoxyd, magnesiumhydraat; vervolgens *organische*: colophonium en zink-stearaat waren hiervan de voornaamste.

Van de anorganische voldeden het best kaoline en magnesiumoxyd. Een afgewogen hoeveelheid adsorbens werd gemengd met een weinig phys. NaCl en verschillende hoeveelheden caseïneoplossing; deze werden samen in buisjes geschud, en 2 uur in de langzaam bewegende schudmachine of in de mengmachine gehouden. Nu liet ik de grovere deeltjes bezinken, en pipetteerde de bovenstaande vloeistof weg;

daarna werd de suspensie tot een geschikte dichtheid verdund. Meestal was voor het verkrijgen van een goede suspensie een gewichtsverhouding caseïne-adsorbens van ongeveer 1 : 10 noodig; om dit te bereiken werd aan 0.4 gr. kaoline 1 cc. caseïne $\frac{1}{2}$ S. toegevoegd. Voor het basische materiaal werd meer eiwit vereischt; dit materiaal was evenwel ook meer volumineus.

De aldus verkregen suspensies vlokten onder den invloed van phys. NaCl niet meer uit.

Met de organische materialen stond de zaak eenigszins anders. *Colophonium* werd van de onderzochte, meest bekende harssoorten het beste bevonden. Hier werd niet uitgegaan van het vaste materiaal, maar van een alcoholische oplossing, die werd verdund volgens het volgende schema:

In een maatglas van 100 cc. wordt 2 cc. van een alcoholische colophoniumoplossing gebracht, en hier gelijkmatig, onder langzaam schudden, aq. dest. bijgevoegd; de snelheid van toevoeging heeft weinig beteekenis. Aan deze suspensie wordt het eiwit geadsorbeerd, met inachtneming van de physiologische NaCl-concentratie (het gedestilleerd water werd met een gelijk volume van een dubbel-geconcentreerde, dus 1,7%, oplossing op physiologisch peil gebracht). Het bleek, dat zulk een colophonium-suspensie lang niet zoo gemakkelijk uitvlokt als een suspensie van anorganisch materiaal, b.v. kaoline; over deze en andere technische bijzonderheden zal uitvoeriger in het volgende hoofdstuk worden bericht. Ik deel alleen nog mede, dat toevoeging van kleine hoeveelheden caseïne een neerslag in de suspensie geeft, en eerst bij vermeerdering van de hoeveelheid de suspensie stabiel wordt. De verhouding caseïne—suspensie was hier ongeveer 1 : 6.

Zinkstearaat is het eigenaardigste van de gebruikte materialen. Het is niet te suspenderen in vloeistoffen als phys. NaCl of gedestilleerd water, daar het hardnekkig samenklontert. Eerst na toevoeging van eiwit gelukt het de massa tot een

stabiele suspensie te verwrijven. Dit is een bezwaar voor de toepassing, maar er zijn voordeelen aan verbonden, die het verkieslijk maken boven de andere suspensies. De onverdunde suspensie blijft een nacht over staan; de grovere korrels zakken deels uit, voor een ander gedeelte stijgen ze naar de oppervlakte.

Adsorptie van paardeserumeiwit. Hierbij was dezelfde techniek van toepassing, als beschreven voor caseïne. Wél zijn er afwijkingen in de verhoudingen geconstateerd. Zoo bleek dat het alkalische magnesiumoxyd hier *minder* noodig had dan het zure kaoline; de gewichtsverhoudingen waren 1:12 en 1:6. En terwijl het zinkstearaat ten opzichte van caseïne de verhouding 3:1 vertoonde, was dit voor paardeserum 3:2.

Er zij nog op gewezen, dat men niet mag verwachten, dat de eiwitten van het paardeserum worden geadsorbeerd in dezelfde verhouding als ze in het serum voorkomen in opgelosten toestand, op grond van de afwijkingen, die door *Landsteiner* en *Uhlirz* bij hun, op pag. 27 reeds aangehaald, onderzoek werden vastgesteld. Hier kan ik nog aan toevoegen, dat het zeer verschillend gedrag van eiwitten tegenover adsorbentia een bekend feit is.

Duur van het adsorptieproces. Deze is in het algemeen vrij kort; 20 minuten geldt als een tijd, waarin het evenwicht tusschen oppervlak en grenslaag zich in alle gevallen heeft ingesteld. Aanvankelijk heb ik een langeren tijd gebruikt voor mijn adsorptieproeven; het bleek mij spoedig, zooals in het volgende hoofdstuk wordt beschreven, dat een veel kortere tijd voldoende is.

HOOFDSTUK III

OVER SOL-PRECIPITATIE, VERGELEKEN MET PRECIPITATIE VAN SUSPENSIES

Precipitatie van colloidaal opgelost antigeen (sol-precipitatie).

Chemische kenmerken der precipitatie-reactie. Indien men de verhouding antigeen-antiserum op een geschikte wijze kiest, vindt men een bepaalde optimale verhouding, waarbij zoowel het precipitine als het antigeen totaal worden uitgevlokt (*Von Dungern* (21)). Evenwel is het moeilijk om deze verhouding te treffen, vooral bij een zwak precipiteerend serum. Vaker vindt men in de vloeistof boven het precipitaat of nog precipitine, of nog antigeen over; soms ook treft men beide tegelijk in de heldere vloeistof aan, hoewel in kleine quantiteit. Dit laatste feit doet sterk denken aan een chemische evenwichtsreactie, waarbij de componenten gedeeltelijk worden gebonden, maar ook ten deele vrij blijven. (*Eisenberg* (22)). *Von Dungern* heeft dit ook aangetroffen in het serum van konijnen, die hij met andersoortig bloedplasma had ingespoten, wanneer hij betrekkelijk kort na de injectie het bloed van zijn proefdieren aftapte. Hij meende dit te moeten toeschrijven aan het naast elkander gevormd worden van afzonderlijke precipitinen (Partialimmunkörper) tegenover de verschillende eiwitten van het ingespoten plasma. Hierbij worden tegenover de verschillende antigenen, niet even snel en niet even rijkelijk,

precipitinen gevormd — een feit, sedert bekend geraakt onder den term: antigenen-concurrentie van *Michaelis* — zoodat het kan gebeuren, dat van het één nog geen precipitine aanwezig is, en het antigeen nog niet is verwijderd, terwijl een ander antigeen tot sterke antistof-productie aanleiding gaf, waardoor het werd gebonden en verwijderd.

Hetzelfde, wat volgens *Von Dungern* in vivo gebeurt, ziet men wanneer men de precipitatie in vitro doet. Ook hier een complex antigeen, waarvan de afzonderlijke eenheden verschillend kunnen reageeren, zoodat in de bovenstaande vloeistof eenerzijds antigeen, anderzijds antistof aantoonbaar is. Daarom leek het mij nuttig, om de caseïne-precipitatie in dit verband te onderzoeken.

De proef werd als volgt gedaan: van een konijn, dat 4 injecties met caseïne had ontvangen, werd 8 dagen na de laatste injectie uit het hart bloed genomen en serum gewonnen. Gelijke hoeveelheden van dit serum werden in buisjes gedaan en gemengd met even groot volume antigeenverduunningen, in de concentraties $\frac{1}{50}$ S— $\frac{1}{1000}$ S¹⁾. De zes buisjes bleven 6 uren bij 37° C. staan, waarna de ontstane neerslagen werden afgecentrifugeerd (het grootst was het neerslag met Cas. $\frac{1}{50}$ S). Dan werden de heldere vloeistoffen afgezogen, en elk in

TABEL I.

	I	II	III	IV	V	VI
Precipitaat verkregen met Cas.	$\frac{1}{50}$ S	$\frac{1}{200}$ S	$\frac{1}{400}$ S	$\frac{1}{600}$ S	$\frac{1}{800}$ S	$\frac{1}{1000}$ S
Vloeistof reageert met antiserum	+	—	—	—	—	—
„ Cas. $\frac{1}{400}$ S	—	+	+	+	+	+
„ phys. NaCl	—	—	—	—	—	—

Afgelezen met zwakke loupe bij daglicht.

¹⁾ Zooals gezegd (pag. 22) geeft het teeken S een eiwitoplossing aan ter sterkte van $\pm 8\%$.

drieën verdeeld: één portie ontving een gelijk volume anti-serum, één een gelijk volume antigeen (Cas. $\frac{1}{400}$ S) en één phys. NaCl. M.a.w. er werd achtereenvolgens gereageerd op in de vloeistof achtergebleven antigeen en antiserum, met een contrôle; deze reacties werden afgelezen na 24 uur staan bij kamertemperatuur.

Het blijkt, dat in deze reeks de beide reactie-componenten niet naast elkander in de vloeistof boven het precipitaat konden worden aangetoond. Om zekerheid te hebben, werd de proef herhaald. Zooals men hierboven kan aflezen, zou men in de buurt van het buisje II de optimale antigeen-concentratie voor de binding mogen vermoeden, daar hier geen antigeen meer werd teruggevonden, terwijl bij I het precipitine verbruikt was.

Bij de nieuwe proef werd op achtergebleven precipitine onderzocht met Cas. $\frac{1}{200}$ S.; de aflezing werd nu gedaan met een agglutinoscoop.

TABEL II.

	I	II	III	IV	V	VI
Precipitaat verkregen met Cas.	$\frac{1}{50}$ S	$\frac{1}{200}$ S	$\frac{1}{400}$ S	$\frac{1}{600}$ S	$\frac{1}{800}$ S	$\frac{1}{1000}$ S
Vloeistof reageert met antiserum	+	+	+	+	—	—
„ Cas. $\frac{1}{200}$ S	+	+	+	+	+	+
„ phys. NaCl	—	—	—		—	—

Het blijkt dat hier in verscheidene buisjes *antigeen en precipitine naast elkaar in aantoonbare hoeveelheid opgelost voorkwamen*. Ter verklaring van dit verschil met de vorige proef is het volgende aan te voeren:

1e. Er was ditmaal gewerkt met een zwakker serum (van hetzelfde konijn, maar 6 dagen later afgetapt); zwakke sera hebben behalve een lageren titer gewoonlijk ook minder snelheid van uitvlokken (geringer aviditeit).

2e. Er was afgelezen met den agglutinoscoop, die sterker vergrootte dan de loupe.

3e. Kan van invloed zijn geweest het feit, dat nu de neerslagen waren afgecentrifugeerd na 4 uur staan bij 37° C.

De antigeenconcentratie van buisje II bleek ook hier zeer geschikt: de neerslagen van antigeen en precipitine beide waren in buisje II zeer klein. Nu was ook deze concentratie voor de titratie op de vloeistof gebruikt.

Naar aanleiding van deze ervaringen werd in het vervolg voor de precipitatie met caseïne de antigeenverduunning $\frac{1}{200}$ S, en later $\frac{1}{250}$ S gebruikt. Het blijkt verder, dat, als men de reactie met een sterke precipitineconcentratie uitvoert, deze snel afloopt. Voor reacties met kleine hoeveelheden is het evenwel noodig, dat men de buisjes langer laat staan.

De *temperatuur* schijnt geen anderen invloed te hebben, dan dat bij 37° de vlokvorming iets sneller optreedt; in den regel heb ik echter de buisjes *bij kamertemperatuur laten staan* tot den volgenden dag.

Het is nog van belang op te merken, dat een precipitatie-reactie door zeer sterke antigeenoplossingen in hooge mate wordt geremd; men ziet in zulke buisjes een opalescentie, maar geen of weinig precipitaat. De precipitatie heeft plaats in een *zône*, die zich bevindt tusschen zeer sterke en zeer zwakke antigeenverduunningen; dit verschijnsel heeft men het *zônephenomeen* gedoopt.

Antigene eigenschappen van caseïne en paardeserum. Caseïne staat, wat betreft precipitine-vormend vermogen, ten achter bij paardeserum. Terwijl ik met caseïne bij konijnen geen hoogere serumtiters wist te behalen dan $\frac{1}{50}$, kreeg ik met paardeserum vaak $\frac{1}{100}$, éénmaal $\frac{1}{200}$. Ook had ik herhaaldelijk gelegenheid op te merken, dat met caseïne de precipitinevorming pas later zichtbaar werd.

Om die reden heb ik nog nagegaan, of er waarheid school

in de bewering van *P. Müller* (23), dat Calciumzouten voor de precipitatie van caseïne noodig zouden zijn. Deze bewering van *Müller* is reeds door anderen weersproken; ook ik vond, dat de precipitatie door toevoeging van chloorcalcium aan een, uit zuiver NaCl en gedestilleerd water bereide, physiologische zoutsolutie volstrekt niet werd bevorderd.

Caseïne neemt, met enkele andere lichaamseiwitten (o.a. lens-eiwit en fibrinogeen), een eenigszins afzonderlijke positie in onder de precipitinogenen. Terwijl b.v. serumeiwit voor de diersoort specifieke precipitinen opwekt, verkrijgt men door injectie van caseïne eener willekeurige diersoort een precipitine, dat met caseïne van andere diersoorten zelfs beter reageert dan met het weieiwit of serumeiwit van de eigen diersoort. Het was dan ook niet te verwachten, dat in mijn proeven het paardeserum en het rundercaseïne met elkaars sera zouden reageeren. Inderdaad bleek bij contrôle met een sterk anti-paardeserum, dat het caseïne hiermee totaal niet reageerde, en omgekeerd.

Evenmin vond ik ooit reacties van mijn antigenen met normaal konijnsersum. Er bestond dus bij deze precipitatieproeven, naar men mag aannemen, *volstreckte specificiteit*. Voor misleiding door bedriegelijke reacties zij verwezen naar hoofdstuk II.

Het is nog van belang te weten, dat *normaalserum* geen invloed heeft op de precipitatie met serumverduunningtitratie, zooals door mij gedaan werd. Dit feit wordt wel in toepassing gebracht, indien men met de ringproef reageert op verwante antigenen — zooals bij het onderzoek op bloedsoorten voor gerechtelijke doeleinden geschiedt — waarbij men door serumverduunning de specificiteit der proef verhoogt. Door nu als verdunningsvloeistof te gebruiken normaalserum, behoudt men het voordeel, dat onverdund serum geeft, van een scherp scheidingsvlak te leveren bij de ringproef (zie *Hektoen* (24)).

Voor al bij de dubbele ringproef, waar men liefst met geconcentreerde antigenen werkt, is deze methode van belang, en wordt dan ook door *Ikeda* in zijn reeds vermeld onderzoek aanbevolen. *M. Nicolle*, *Césari* en *Debains* (25) hebben de origineele gedachte gehad, als verdunningsvloeistof vloeibare, zuurvrije 10 % gelatine te gebruiken; na stolling van het mengsel gieten zij het antigeen op de vaste oppervlakte uit. Al deze voorzorgen zijn evenwel bij de mengmethode overbodig. Ik heb nog getracht, door toevoeging van een heteroloog precipiteerend serum aan een precipiteerend mengsel uit te maken, of zulk een immuumsérum wellicht een onspecifieke, precipitatie-bevorderende stof bevatte. Daarvoor werd caseïne $\frac{1}{250}$ S toegevoegd aan met phys. NaCl verdund precipiteerend sérum, en aan met anti-typhusserum verdund precipiteerend sérum. Ik zag daarbij geen waarneembaar verschil, en werd zodoende eveneens tot de algemeen geldende opvatting gebracht, dat het precipitaat bij een specifieke precipitatiereactie vrijwel geheel uit de antigeen-antistofverbinding bestaat.

Bepaling optimale antigeenconcentratie. Bij de boven aangehaalde proeven met caseïne was het reeds gebleken, dat er een antigeenconcentratie bestond, waarbij de reactie optimaal was, geheel in overeenstemming met wat daarover in de litteratuur gemeld wordt. Bij de verdere proeven zou het van groot belang zijn een antigeenconcentratie te gebruiken, waarbij nu niet de componenten der reactie zoo volledig mogelijk werden verbruikt, maar een, waarmee zeer kleine hoeveelheden precipitine nog zouden reageeren. Daarom werd een proef ingericht als volgt:

Een konijn, dat is ingespoten geworden met paardesérum, levert een sérum met een middelmatig hoogen titer. Hiervan worden nu verschillende verdunningen gemaakt. Van elke verdunning wordt een serie gebruikt, waarbij gelijke hoeveel-

heden elk worden voorzien met antigeen, varieerende in de verdunningen 1 : 10 tot 1 : 5000. Zodoende krijgt men een goed overzicht over de verhoudingen bij verschillende precipitinehoeveelheden. De noteering geschiedt alweer op de gebruikelijke wijze: immuumsertititer wordt aangegeven naar de totale verdunning in het buisje; antigeenverdunning naar de concentratie van het toegevoegde antigeen. Aflezing, als voortaan steeds, na staan bij kamertemperatuur den volgenden dag.

TABEL III.

Antigeen P.S.	1:10	1:25	1:50	1:100	1:250	1:500	1:1.000	1:2.500	1:5.000
Antiserum titer $\frac{1}{50}$				—	—	—	—	—	—
" " $\frac{1}{25}$	—	—	—	—	±	±	—	—	—
" " $\frac{1}{10}$	—	—	—	++	±	±	±	±	—
" " $\frac{1}{5}$	±	±	++	++	++	++	±	±	±

In deze tabel ¹⁾ ziet men heel goed het „zônephenomeen”, en ook dat deze precipiteerende zône naar beide kanten zich uitbreidt, naarmate er meer precipitine aanwezig is. Men ziet nog iets anders: waar dit noodig was, is de sterkste precipitatie van een serie aangegeven door een accolade: $\underbrace{\quad}$. Nu blijkt, dat bij toenemende hoeveelheden precipitine deze zône van optimale neerslagen zich naar links verplaatst. Verder valt nog iets merkwaardigs op: zoodra men een weinig meer antigeen toevoegt dan bij de optimale neerslagen het geval was, houdt het verschijnsel spoedig op en men ziet alleen nog wat opalescentie (= oplossing van het precipitaat in overmaat antigeen); verdunning van het antigeen wordt veel beter verdragen dan concentrering ervan.

¹⁾ Noteering zie pag. 27.

Wat nu betreft het eerste doel van de proef: antigeen 1:250 en 1:500 gaven de beste neerslagen, en daar bij grootere hoeveelheden precipitine de optimale neerslagzône zich naar links verplaatst, werd voor de verdere precipitatieproeven als regel het gebruik van *P. S. 1:250* aangenomen.

Precipitatie van geadsorbeerd antigeen (suspensie-precipitatie).

Nadat aldus de precipitatietechniek methodisch was uitgewerkt, ben ik op de reeds aangegeven manier (hoofdstuk II) suspensies gaan bereiden, die vervolgens werden getitreerd met precipiteerend serum, ter vergelijking met de eigenlijke precipitatieproef.

Proeven met caseïne geadsorbeerd aan kaoline kwamen het eerst aan de beurt. Kaoline is een materiaal, dat zoowel in geconcentreerde als verdunde suspensie gemakkelijk door zouten uitvlokbaar is; door schudden is het dan weer gemakkelijk fijn te verdeelen. Mijn kaolinemateriaal vlokke zelfs met gedistilleerd water uit, als de suspensie dicht was. In dit verband is de volgende proef leerzaam:

In 2 maatglazen van 100 cc. worden elk 0.4 gr. kaoline gedaan. Het eene wordt tot 100 cc. gevuld met gedestilleerd water, het andere met phys. NaCl, en dan beide geschud. Als de suspensies vervolgens eenige oogenblikken hebben gestaan, ontstaat vlokking, waarna beide snel uitvlokken.

Nu schudt men beide maatglazen krachtig, waardoor de deeltjes weer fijn verdeeld geraken, en verdunt ze elk 10 maal met hun eigen suspensievloeistoffen (gedest. water en phys. NaCl). Nu waarnemende, ziet men dat de 10 maal verdunde suspensie in phys. NaCl snel uitvlokt, die in gedestilleerd water stabiel blijft.

Door caseïne toe te voegen in de gewichtsverhouding 1:10 wordt, zooals gezegd, deze neiging tot uitvlokken opgeheven.

Proef: immuunserum, titer met cas. ($1/200$ S) $1/32$ pos., $1/64$ neg.

„ titer met cas.-kaoline $1/200$ pos., $1/300$ neg.

Conclusie: door adsorptie van caseïne aan kaoline wordt de titer van anticaseïneserum verhoogd.

Een positieve reactie werd bij het reageeren volgens de nieuwe methode afgelezen na 24 uur staan, waarbij het buisje op den bodem een vlokkig, in plaats van gelijkmatig bezinksel vertoont.

Proef met normaalserum: de caseïne-kaoline suspensie wordt tot den titer $1/50$ hiermee uitgevlokt.

De lading van het adsorbens is van geen invloed op de uitvlokkig; met het alkalische (electropositieve) magnesiumoxyd kon ik de reactie even mooi krijgen als met het zure kaoline; ook hier wordt de titer van het serum aanmerkelijk verhoogd door adsorptie van het antigeen.

Ik heb nog geëxperimenteerd met de andere in hoofdstuk II genoemde suspensiemiddelen, die ten deele wel voldeden o.a. terra silicia (infusoriënaarde) — maar toch stonden zij bij kaoline en magnesiumoxyd, vooral wat betreft de afleesbaarheid der reactie, ten achter.

Er valt nog iets op te merken met betrekking tot de in de suspensies van kaoline en magnesiumoxyd aanwezige hoeveelheid antigeen. Met verwaarloozing van de kleine hoeveelheid, die met het grofkorrelige suspensiemateriaal bij de bereiding¹⁾ van de suspensie teloor mocht gegaan zijn, werd deze berekend op een antigeenconcentratie van slechts $1/1600$ S. M.a.w. daar de antigeenconcentratie gebruikt bij de solprecipitatie $1/200$ S was. en de titerverhoging bij toepassing der suspensieprecipitatie ongeveer 6 maal de normale titer bedroeg (zie hierboven), kunnen wij concludeeren dat er in dezen eenige proportionaliteit tusschen de antigeenverduunning en de titer-

¹⁾ Hoofdstuk II.

verhooging bestaat. Maar terwijl bij de solprecipitatie anti-geenverduunning verlaging van den titer ten gevolge zou hebben (zie pag. 35 en 38), heeft verdunning ervan door suspensiedeeltjes ermee te bekleeden, waarbij dus de *eigenlijke reageerende eiwitmassa slechts een klein gedeelte uitmaakt van de geheele agglutinabele massa*, juist het omgekeerde gevolg.

Vergelijking met de agglutinatie. Hierin lijkt mij een belangrijke aanwijzing te liggen voor de agglutinatie van bacteriën of andere cellen. Ook hier wordt de antistof gebonden aan suspensiedeeltjes, waarbij de veranderingen aan deze oppervlakte verantwoordelijk moeten worden gesteld voor de uitvlokbaarheid. Ook hier gedraagt zich de geheele suspensiemassa waarschijnlijk min of meer passief tegenover de oppervlaktelaag, die in engeren zin het reageerende antigeen vertegenwoordigt, (zie de samenvatting pag. 86).

Bij dit alles moet men in aanmerking nemen — ik loop hier op een later te geven uiteenzetting vooruit — dat de uitvlokkingsvatbaarheid van bacteriën, zoowel als van suspensies, in vrij sterke mate gebonden is aan de concentratie van de suspensie; te sterk verdunde suspensies reageeren niet meer.

Samenvattende. kom ik tot de *conclusie*, dat een antigeen in suspensie, van zoodanige dichtheid, dat het gemakkelijk uitvlokbaar is, boven een colloidaal opgelost antigeen — eveneens in optimale concentratie — het voordeel heeft van een geringe hoeveelheid antigeen te bevatten, waardoor slechts weinig antistof vereischt wordt voor een specifieke reactie. Hierdoor zou de hoogere titer van het serum tegenover het gesuspendeerde antigeen kunnen worden verklaard. Of deze verklaring de eenig aanvaardbare is, zal nog later worden besproken.

Verbetering der caseine-kaoline suspensies. De tot dusverre gebruikte suspensies gaven wel eens moeilijkheden bij het

aflezen. Ook zonder uitvlokking bezonken zij vrij snel, veel sneller dan een bacteriesuspensie. Ik trachtte hieraan tegemoet te komen, door het soortelijk gewicht en de viscositeit der vloeistoffen te verhoogen, zonder de toevoeging van electrolyten (deze remmen bij overmaat zoowel agglutinatie als precipitatie). Sterke rietsuikeroplossingen waren het middel hiertoe.

Bereiding van suspensies met saccharose: in phys. NaCl werd een 50 % oplossing van saccharose gemaakt; hiermee werd een geconcentreerde caseïne-kaoline suspensie tot de gewenschte dichtheid verdund. Met dit materiaal werden op de gebruikelijke wijze gelijke hoeveelheden van serumverduningen gemengd, zoodat bij de proef de concentratie van rietsuiker 25 % werd.

Het resultaat was, dat de reactie veel fraaier afleesbaar werd. Een positieve reactie uit zich op twee wijzen:

1e. De groote massa van de kaoline slaat niet in een dun laagje neer, als in de contrôlebuisjes, maar komt in één klompje te liggen.

2e. In de bovenstaande vloeistof ziet men fijne vlokjes in een volkomen heldere vloeistof zweven.

De twee verschijnselen zetten zich niet voort in dezelfde serumverduningen; het eerste (klompvorming) zet zich voort in een verdunding 10—20 $\times$ hooger dan de solprecipitatie; het tweede (zwevende vlokjes) in een 8—10-voudige verdunding.

Er werd dus op deze wijze een zeer bevredigende titerverhooging verkregen, Wat betreft de onspecifieke uitvlokbaarheid volgens deze methode: heterologe sera vlokken de suspensies in saccharose uit tot ongeveer denzelfden titer als zonder saccharose.

Met deze verbeterde methodiek trachtte ik de vraag te beslissen: *Heeft de binding van het precipitine plaats aan de oppervlakte der suspensiedeeltjes?* De suspensie werd hiervoor in dichtere concentratie genomen, en op 2 verschillende wijzen

toegevoegd n.l. 1e. met caseïne, vooraf geadsorbeerd, en 2e. caseïne, niet vooraf geadsorbeerd.

Proef:

Maatglas A bevat een oplossing van:

caseïne $\frac{1}{16}$ S 2 cc.)
 saccharose 50 0/0 in 48 cc. 1,7 0/0 NaCl) Cas. $\frac{1}{400}$ S.

Maatglas B bevat:

kaoline in aq. dest. 5 0/0 2 cc. . . .)
 saccharose in aq. dest. 48 cc. . . .) kaoline $\frac{1}{5}$ 0/0

Verder werden van een immuunserum, dat oorspronkelijk een goeden titer had, n.l. $\frac{1}{50}$, maar eenige weken in de ijskast had gestaan, twee serieën buisjes met verdunningen gevuld, zoodanig dat de titers $\frac{1}{50}$ — $\frac{1}{1000}$ zouden bedragen.

In de eene serie werd aan elke cc. serumverdunning toegevoegd 1 cc. van een mengsel, dat uit gelijke deelen van de suspensie B en de caseïne-oplossing A bestond, en eerst 2 uren na menging had gestaan bij kamertemperatuur: serie I.

In de tweede serie werd aan elke cc. serumverdunning eerst $\frac{1}{2}$ cc. caseïne A toegevoegd; na menging met het serum werd dan direct $\frac{1}{2}$ cc. kaolinesuspensie B toegevoegd, en opnieuw gemengd: serie II.

Zodoende ontvangt serie I een suspensie, waaraan eerst caseïne is geadsorbeerd, en serie II een mengsel, waar dit niet is geschied. Kaoline en caseïne komen in alle buisjes van beide serieën in gelijke hoeveelheden voor.

Resultaat na 24 uur:

Serumtiter	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	C.
Serie I	+	+	+	+	—	—
Serie II	+	—	—	—	—	—

Het blijkt dus, dat de suspensie-precipitatie reactie alléén plaats heeft na voorafgaande adsorptie van het antigeen aan

de suspensie; de binding van het precipitine heeft dus plaats aan de oppervlakte hiervan. De positieve reactie in serie B bij $\frac{1}{50}$ hebben wij het recht als onspecifiek te beschouwen (zie pag. 40).

Men zou tegen deze proeven met saccharose kunnen aanvoeren, dat door verscheidene onderzoekers een storende invloed van rietsuiker bij agglutinatie (*Landsteiner en Welecki*) (26) en precipitatie (*Downs en Goodner*) (27) is vastgesteld. Daartegenover staat, dat *Victor Henri* en *Girard-Mangin* (28) vonden, dat saccharose een bevorderenden invloed had op het uitvlokken van roode bloedlichaampjes door colloïden; in navolging hiervan werd de rietsuikermethode uitgewerkt. Ook ik vond bij mijn kaolinesuspensies veeleer een bevorderende dan remmende werking.

Proeven met harsen. Ook de rietsuikermethode voldeed ten slotte niet. Het werken met de strooperige vloeistoffen was omslachtig en ik voelde er meer voor om met bacteriën meer vergelijkbare suspensies te maken, daar de kaoline toch nog vrij sterk korrelig was. Daarom werden proeven genomen met harsen, waarvan het soortelijk gewicht dat van phys. NaCl weinig ontloopt. Fijngewreven leveren verschillende harssoorten een materiaal, dat volstrekt geen verbetering beteekent in vergelijking met kaoline. Ik nam daarop mijn toevlucht tot alcoholische oplossingen, waarvan door verdunning met gedestilleerd water suspensies werden bereid.

Nu moet worden opgemerkt, dat men na lezing van publicaties over fysisch-chemische onderwerpen niet zoo gauw begrijpt, wat men eigenlijk met zoo'n in gedestilleerd water verdunde harsoplossing, in handen heeft. Vaak wordt zoo iets als een suspensiecolloïd betiteld, o.a. in *Höber's* bekende boek. In de litteratuur vindt men daarentegen vaak de benaming suspensie. Om dit punt voor mijzelf duidelijk te maken, heb ik mijn toevlucht genomen tot eigen onderzoek.

Het bleek spoedig, dat verschillende factoren op de vorming der suspensies, zooals ik ze zal blijven noemen, invloed hebben. Zij werden onderling vergeleken *macroscopisch*, met opvallend en doorvallend licht, en *microscopisch* in den hangenden druppel.

Suspensies van de volgende harsen werden bestudeerd: mastix, colophonium, benzoë, guajak en gummi gutti. Het bleek, dat de laatste 3 minder geschikt waren, daar het niet lukte hiermee voor de suspensie voldoende sterke (10 % alcoholische) oplossingen te maken. Dit nu is niet zonder betekenis, zooals vooral uit de proeven met mastix en colophonium zal blijken. Daarom heb ik mij ten slotte tot deze laatste twee beperkt.

Het bleek, dat het een groot verschil maakt, of men van sterke of zwakke alcoholische oplossingen uitgaat. Mastix en colophonium, uit 10 % oplossingen verdund, gaven een melkwitte, geheel ondoorzichtige suspensie, waarin men met de loupe gemakkelijk korrels ziet. Microscopisch ziet men een groote verscheidenheid van bollen; er zijn er, eenige malen grooter dan een leucocyt, en met sterke vergrooing nauwelijks zichtbare.

Uitgaande van een 4 % alcoholische oplossing, merkt men met het bloote oog niet veel onderscheid met de vorige suspensies. Microscopisch heeft men echter een geheel ander beeld voor zich; men kan spreken van een verschuiving naar kleinere afmetingen. Er zijn meer bollen van middelmatige grootte, en vooral ook meer kleine bolletjes. Mastix en colophonium geven hetzelfde beeld.

Ten slotte werden de resultaten van nog zwakker alcoholische oplossingen, n.l. 1 %, vergeleken. Hierbij geschiedde iets verrassends. Terwijl colophonium nu weder een verschuiving gaf naar kleinere bolgrootte, veranderde het mastix totaal van karakter. In plaats van een melkwitte, ontstond een licht troebele vloeistof, die met opvallend licht nu sterk

opaliseerde. Microscopisch was het gezichtsveld bijna leeg; hier en daar een enkel zeer fijn bolletje. M.a.w. het mastix was in colloïdalen toestand verkregen; het was dus nu voor het doel ongeschikt.

Men heeft het dus, door uit te gaan van alcoholische oplossingen, geheel in de hand om zich een suspensie te bereiden van een verdeeling, welke men wenscht. Colophonium bleek minder neiging te hebben om in colloïdalen toestand over te gaan dan mastix. Om deze reden heb ik op den duur het colophonium voor mijn proeven verkozen. Meestal ging ik uit van een 3,2 % of 4 % alcoholische oplossing. Een sterkere oplossing heeft het voordeel, dat men er minder kans mee heeft om colloïdaal opgeloste deeltjes te verkrijgen. Een groot nadeel is, dat er veel te grove korrels in voorkomen, terwijl een niet onaanzienlijk gedeelte van het hars uit de sterke oplossing bij de verdunning als een beslag zich tegen het glas afzet.

Behalve de besproken methode van concentratie der alcoholische oplossing, heb ik in de litteratuur nog 2 andere methoden gevonden, dienende om de korrel van de suspensie te vergroven. In de eerste plaats kan men dit doel bereiken door te verdunnen met heet water. Zoo verkreeg ik uit een 4 % colophoniumoplossing met kokend heet water een suspensie, die het beeld gaf van een volgens de koude methode uit 10 % oplossing bereide. Eenig voordeel bood de methode echter niet.

Verder heeft *Sachs* (29) aangegeven, dat men, van éénzelfde mastixoplossing (1 % alcoholisch) uitgaande, twee zeer verschillende verdeelingen in gedest. water kan bereiden: indien men de oplossing vlug in het water blaast, ontstaat een zwak doorschijnende emulsie; druppelt men de oplossing in het water onder aanhoudend schudden, dan ontstaat een melkwitte vloeistof. Deze laatste methode werd niet toegepast, daar zij mij onzeker leek. Ter voorkoming van misverstand

zij nog medegedeeld, dat ik er zorg voor droeg, dat in de bereide suspensies, die werden vergeleken, steeds gelijke hoeveelheden hars zich bevonden.

Een aardige proef om ad oculos het verschil in dispersiegraad tusschen verschillend bereide suspensies te demonstreeren, is de volgende.

Maatglas I ontvangt colophonium 10 % in alcohol 2 cc.
aq. dest. tot volledig neerslaan.

alcohol 48 % 6 „

Totaal volume op 25 cc. gebracht.

Maatglas II ontvangt colophonium 4 % in alcohol 5 cc.

aq. dest. ad. 25 „

Aan beide maatglazen waren dus colophonium, alcohol en water in gelijke hoeveelheden toegevoegd.

Door papierfilter gefiltreerd, loopt de vloeistof uit maatglas I (grove korrel) eerst licht troebel door en dan, tengevolge verstopping der filterporiën, helder; die uit maatglas II loopt even melkwit door als de oorspronkelijke suspensie.

Ten slotte nog iets over de alcoholverduunningen. Ik heb gebruikt oplossingen in 96 % alcohol. In de litteratuur wordt aangegeven, dat men gewoonlijk 10 maal met water verduint; de practijk leerde mij, dat men minstens 8 maal met water moet verdunnen, om het hars volledig in suspensie over te brengen.

Caseïne gesuspenderd aan mastix en colophonium.

Wegens het alcoholgehalte der vloeistoffen was het noodig, aan suspensies te adsorbeeren, die aanmerkelijk meer verdund waren dan die voor adsorptie werden gebruikt met anorgaanisch materiaal. Hier overkwam mij de verrassing, dat een dergelijke meer verdunde suspensie (zonder adsorbaat) niet met physiologische keukenzoutoplossing uitvlokt. Inderdaad blijkt, dat deze suspensies alleen in geconcentreerden vorm door zouten werden uitgevlokt, en dan nog in het bijzonder door NaCl-concentraties, die boven de physiologische liggen.

Zoowel voor colloïdaal gedisperseerd als voor grover verdeeld hars geldt dit. Mastix en colophonicum gedragen zich in dit opzicht (binnen eenigszins ruime grenzen) ongeveer gelijk.

Van de proeven, in dit verband genomen, geef ik er één, die uitgekozen werd, omdat zij de aanleiding was tot de proevenreeks, die in hoofdstuk V beschreven wordt.

Colloïdaal mastix werd bereid uit 1 % alcoholische oplossing. Drie verschillende verdunningen werden gebruikt, n.l. 0.4 %, 0.04 % en 0.004 %; deze worden elk met verschillende concentraties NaCl in gelijke hoeveelheden gemengd, zoodanig dat de zoutconcentraties der mengsels bedragen resp. 15 %, 5 % en 2 %.

TABEL IV.

Mastix, toegevoegde concentratie	0.4 %	0.04 %	0.004 %
<i>In NaCl 15%</i> , na $\frac{1}{2}$ u.	troebel, vlokking	sterk opalescent	—
<i>In NaCl 15%</i> , na 4 u.	troebel, vlokking	sterk opalescent	—
<i>In NaCl 15%</i> , na 24 u.	troebel, vlokking	sterk opalescent	—
<i>In NaCl 5%</i> , na $\frac{1}{2}$ u.	uitgevl. helder	opalescent	—
<i>In NaCl 5%</i> , na 4 u.	uitgevl. helder	uitgevl. helder	—
<i>In NaCl 5%</i> , na 24 u.	uitgevl. helder	uitgevl. helder	licht opalescent
<i>In NaCl 2%</i> , na $\frac{1}{2}$ u.	uitgevl. helder	—	—
<i>In NaCl 2%</i> , na 4 u.	uitgevl. helder	—	—
<i>In NaCl 2%</i> , na 24 u.	uitgevl. helder	—	—

Het blijkt uit dit staatje, dat de colloïd-concentratie in de eerste plaats grooten invloed heeft op de uitvlokbaarheid. Alleen een geconcentreerde harsdispersie kan door al de gebruikte NaCl-oplossingen worden uitgevlokt. Van deze keuken-

zoutoplossingen is alleen de 5 0/0 oplossing in staat het sterk verdunde mastix uit te vlokken, resp. te veranderen. De physiologische zoutsolutie is dus voor dit doel ongeschikt en evenzeer voor colophonium, zooals mij gebleken is.

Al mist men nu de opheffing der electrolytvlokkings als symptoom van eiwitadsorptie, men kan daarvoor een ander verschijnsel gebruiken, waarvan ik hier een voorbeeld geef.

TABEL V.

	I	II	III	IV	V	VI	Contr.
Caseïne $\frac{1}{250}$ S.	0.1	0.2	0.5	1	2	3	0 cc.
Mastix 0.32 0/0 (in aq. dest.) .	1	1	1	1	1	1	1 cc.
2 $\times$ phys. NaCl (= 1.7 0/0) . .	1	1	1	1	1	1	1 cc.
Phys. NaCl	7.9	7.8	7.5	7	6	5	8 cc.
Verhouding $\frac{\text{caseïne}}{\text{mastix}}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{3.3}$	
Uitslag na 24 uur	neer- slag	vlok- king	hel- der	hel- der	hel- der	hel- der	hel- der

Er ontstaat dus in de buisjes met zeer weinig eiwit een neerslag, dat niet te zien is bij toevoeging van meer caseïne. Dit eerste neerslag mogen wij wel opvatten als symptoom van beginnende adsorptie; voor mijn proeven werd gewoonlijk de verhouding van $\frac{1}{10}$ gekozen; later ook $\frac{1}{5}$ met colophonium.

Van mastix heb ik voor de volgende proeven afgezien, maar de bereiding van de caseïne-colophoniumsuspensie geschiedde volgens een gelijksoortig schema.

Proeven met caseïne-colophonium. Colophonium is een hars, dat men door verhitting van zijn vluchtige bestanddeelen heeft bevrijd, hetgeen mij voor deze proeven ook een voordeel leek te zijn. Daar het soortelijk gewicht laag is, blijft het fraai in suspensie.

Met dit materiaal werden de titers der anticaseïne-sera niet onbelangrijk verhoogd, n.l. gemiddeld 5 maal, terwijl de caseïneconcentratie in de suspensies 6—8 maal geringer was dan in de voor de precipitatie-proef gebruikte oplossingen. Het lijkt ook hier, of er een zekere *verhouding tusschen titerverhooging en antigeenverduunning* bestaat.

Uitvoeriger zal over de proeven met caseïne-colophonium worden bericht in het volgende hoofdstuk. Hier wil ik nog erop wijzen, dat normale sera eveneens met deze suspensie reageeren, tot den serumtiter $\frac{1}{50}$. Dit geschiedt op een eigenaardige wijze, die ik het „*ophelderings-effect*” heb genoemd. Voegt men bij een lage serumverduunning (normaal- of immuun-serum) een gelijke hoeveelheid suspensie, dan ziet men in eenige minuten de buisjes geheel opklaren, alsof er een nevel optrekt. Spoedig is, ook met de loupe, van de suspensie vrijwel niets meer te zien; het is alsof de deeltjes zijn opgelost. Onder het microscoop ziet men evenwel dat in zulk een menging al de bolletjes nog te zien zijn, maar in kleine klompjes gegroepeerd. Hoe het komt, dat deze klaarblijkelijk uitgevlokte deeltjes niet meer te zien zijn, kan ik niet verklaren; het lijkt me toe, dat we hier met een zuiver optisch effect te doen hebben, veroorzaakt door de hooge aanwezige concentratie van eiwitten, ¹⁾ of misschien speelt adsorptie dezer eiwitten een rol.

Proeven met typhus-colophonium. Het leek nuttig, deze gemakkelijk hanteerbare methode eens te vergelijken met de agglutinatie bij typhus. Extracten van typhusbacillen werden bereid door agarcultuurmassa's met droog NaCl in een mortier te wrijven, daarna te suspendeeren en, nadat ze eenige uren bij 37° C. hadden gestaan, door een kaars te filtreeren. Deze bacillen-extracten werden aan colophonium geadsorbeerd, en

¹⁾ Verg. hoofdstuk II over de natroeelingen.

met deze suspensies vervolgens antityphus-sera (van typhus-lijders en konijnen) getitreerd. Dit liep evenwel uit op een grooten tegenvaller: geen enkele positieve reactie werd verkregen, nergens was in de proefbuisjes specifieke uitvlokking waar te nemen.

Proeven met paardeserumsuspensies. Ook hier kwam een teleurstelling: met geen der beproefde materialen gelukte het ook maar een schijn van een specifieke uitvlokking te krijgen!

Deze tegenslagen hadden het gevolg, dat ik opnieuw naar suspensie-materiaal ging zoeken, en dit ten slotte vond in zinkstearaat, een in water onoplosbare verbinding van stearine-zuur met zink.

Proeven met zinkstearaat. Dit materiaal wordt weer anders verwerkt, als in hoofdstuk II beschreven. De verkregen suspensies lijken bedriegelijk veel op die van b.v. typhusbacillen. Na 24 uur staan ziet men in de contrôlebuisjes op den bodem alleen een zeer klein koepeltje van witte stof, die door schudden gemakkelijk weer in de vloeistof verdeeld wordt. Er is één verschil: de suspensie is iets grover van korrel, waarom het niet aan te raden is om af te lezen met een loupe, maar met het bloote oog bij kunstlicht.

Er zijn aan deze suspensie twee groote voordeelen verbonden, vergeleken met de vorige:

1e. Men heeft zeer weinig last van onspecifieke reacties; de suspensies konden gemakkelijk zóó worden ingesteld, dat normaal serum in den titer $1/20$ geen reactie meer gaf.

2e. Paardeserum als adsorbaat geeft hiermee even fraaie reacties als caseïne.

Een *positieve reactie* ziet er eenigszins anders uit, dan b.v. een positieve Widal; de ontstane conglomeraten zijn nooit meer dan korrels, die bovendien niet bezinken, daar het materiaal ongeveer hetzelfde soortelijk gewicht schijnt te

hebben als phys. NaCl. Als positief gold alleen een buisje, waar in een volkomen heldere vloeistof met het bloote oog scherp te onderscheiden korrels zweven.

Regelmatig werd met deze suspensies, zoowel voor caseïne als paardeserum, een titer bereikt, 10 maal hooger dan die van de precipitatie. Dit is merkwaardig, omdat de suspensies hier werden ingesteld op een hoog antigeen-gehalte; ze bevatten n.l. resp. P.S. $\frac{1}{300}$ en Cas. $\frac{1}{660}$ S. M.a.w.: vergeleken met wat gevonden werd bij kaoline- en colophonium-suspensies, had de *hoogere titer een verder verwijderd verband met de mindere hoeveelheid antigeen in de suspensie*. Het is verder opmerkelijk, dat terwijl voor de sol-precipitatie met paardeserum en caseïne beide dezelfde antigeenverduunning werd gebruikt ($\frac{1}{250}$ S.), toch de zeer verschillende hoeveelheden antigeen bevattende suspensies allebei den titer 10 maal verhoogden. Uitvoerige tabellen zijn in het volgende hoofdstuk te zien.

Ik heb mij nog de vraag voorgelegd, of het aanbeveling zou verdienen, proeven te doen met antigenen *geadsorbeerd aan organisch materiaal*, b.v. bacteriën. Daarvan werd evenwel afgezien, om de volgende redenen:

1. onderzoeken hebben geleerd, dat lichaamseiwitten niet gemakkelijk worden geadsorbeerd aan organisch materiaal; de hoeveelheden geadsorbeerd eiwit waren nauwelijks aantoonbaar (30 en 31);

2. autoagglutinabele bacteriën, die in de bacteriewereld het standpunt innemen van anorganisch suspensiemateriaal als kaoline, wat betreft gemakkelijke uitvlokbaarheid met geringe zoutconcentraties, kan men door middel van eiwit-toevoeging (Schutzkolloid) niet in suspensie houden. Mij althans is dit met 2 autoagglutinabele *Proteus*-stammen en 1 autoagglutinabele *Shiga-Kruse* stam niet gelukt.

Het was dus te voorzien, dat met de bovenstaande proeven

vergelijkbare uitkomsten niet zouden worden verkregen, om welke reden ik ervan afzag.

Kort samengevat, werd met deze proeven aangetoond, dat het gebruik van een antigeen in den vorm van een suspensie, den onderzoeker in staat stelt, aanmerkelijk hoogere serumverduunningen met positieven uitslag te bereiken, dan wanneer het antigeen colloïdaal is opgelost in physiologische zoutsolutie.

Dit voor drie jaren aangevangen onderzoek was reeds afgesloten, toen ik een recent onderzoek van Jones (32) in handen kreeg, waarin deze de resultaten van een met gelijke bedoelingen ondernomen proefreeks mededeelt, die de in dit hoofdstuk tot dusverre gegeven onderzoekingen in hoofdzaak bevestigen.

Wat het gebruik van harsen betreft, valt op te merken, dat deze reeds toepassing vonden bij immuniteitsreacties. O.a. pasten Dujarric de la Rivière en Roux (33) benzoëhars toe bij precipitatie met extracten van meningococcen en gonococcen.

Hoe verhoudt zich nu de *precipitatie met verdunde suspensies* tegenover die met sterk verdund colloïdaal antigeen?

Zooals reeds werd medegedeeld, geldt als een kenmerkend verschil tusschen precipitatie en agglutinatie het feit, dat men bij de eerste het antigeen buitengewoon sterk kan verdunnen, terwijl men met een sterk verdunde bacteriesuspensie geen agglutinatie meer kan verkrijgen (zie hoofdstuk I). Nu is dit een feit, dat men niet zonder meer moet aanvaarden. Weliswaar kan men b.v. een paardeserum, dat als antigeen gebruikt wordt, zeer sterk verdunnen, maar men moet bedenken dat zulk een serum zeer veel precipitabele stof ($\pm 8\%$ eiwit) bevat. Als men dit vergelijkt met een bacteriesuspensie, zooals men die verkrijgt door een agarbuis of plaat met bacteriecultuur af te spoelen door middel van phys. NaCl, dan vergelijkt men geheel ongelijkwaardige hoeveelheden. Zelfs een zeer

dichte bacteriesuspensie bevat betrekkelijk weinig vaste stof, zooals men gemakkelijk aan kan toonen door haar uit te antrifugeeren, waarbij men slechts een vrij dunne laag op den bodem van het buisje verkrijgt.

Het leek daarom bij de hier te beschrijven proefneming juister, om die antigeenverduunningen te vergelijken, welke een optimale reactie met het immuunserum gaven.

Bij deze proeven werd als antigeen paardeserum, en paardeserum geadsorbeerd aan zinkstearaat, gebruikt. Voor precipitatie met paardeserumverduunningen was reeds gevonden, dat de verduunning 1 : 250 een optimale reactie gaf (pag. 38).

Bepaling van de optimale reactie met zinkstearaat. Hiertoe bediende ik mij van den nephelometer van *Mc. Farland*¹⁾. Deze bestaat uit een serie van buizen van gelijke wijdte, die gevuld zijn met stijgende hoeveelheden bariumsulfaat in suspensie, waarvan de achtereenvolgende suspensies telkens met een gelijke hoeveelheid toenemen. Zodoende krijgt men verschillende graden van dichtheid: 1, 2, 3 enz. — resp. corresponderende met suspensies van bariumsulfaat van 0.0112 %, 2×0.0112 %, 3×0.0112 % enz. —, waarmee men nu de gebruikte antigeensuspensies kan instellen door de dichtheid met die van de nephelometerbuizen te vergelijken. Ik droeg er steeds zorg voor, dat de gebruikte buizen van gelijke wijdte waren, en vergeleek ze steeds op dezelfde wijze n.l. bij opvallend licht tegen wit-zwarten achtergrond, na de nephelometerbuizen eerst behoorlijk te hebben geschud.

Het bleek dat de hoogste titers met P.S.-zinkstearaat werden verkregen met suspensies, die een dichtheidsgraad van 1 tot en met 5 bezaten. Ik gaf er de voorkeur aan, te werken met een dichtheid 5, daar deze het gemakkelijkst afleesbare reacties gaf.

¹⁾ Overgenomen uit *Kolmer : Infection, Immunity and Biologic Therapy*, 1924, pag. 195.

1e Proef. Serum konijn D, titer $\frac{1}{50}$ met P.S. $\frac{1}{250}$, wordt getitreerd met 4-voudig en 20-voudig verdund antigeen (dus P.S. $\frac{1}{1000}$ en P.S. $\frac{1}{5000}$). Resultaat:

TABEL VI.

Serum D titer	$\frac{1}{50}$
Antigeen P. S. $\frac{1}{250}$, onverdund	++
Antigeen P. S. $\frac{1}{250}$, 4 $\times$ verdund	++
Antigeen P. S. $\frac{1}{250}$, 20 $\times$ verdund	$\pm$
C (phys. NaCl).	—

Hetzelfde werd nu gedaan met een suspensie P.S.-zinkstearaat van een dichtheid 5, eveneens onverdund en 4 $\times$ en 20 $\times$ verdund. Resultaat:

TABEL VII.

Serum D titers	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	C phys. NaCl
P. S. stearaat onverdund . .	+	+	+	+	+	—	—
P. S. stearaat 4 $\times$ verdund .	+	+	+	+	+	—	—
P. S. stearaat 20 $\times$ verdund .	+	+	—	—	—	—	—

Als men deze resultaten met elkaar vergelijkt, dan ziet men, dat verdunning van het opgeloste antigeen alleen tot gevolg heeft, dat de precipitaten geringer in omvang worden, terwijl de titer van het serum ($\frac{1}{50}$) niet daalt. Evenwel is het met de suspensie anders gesteld: geringe verdunning heeft geen invloed, terwijl bij 20-voudige verdunning de titer zakt tot den sol-precipitatietiter.

Hetzelfde werd gedaan met het serum van konijn E, titer met P.S. $\frac{1}{250}$ was $\frac{1}{10}$. Dit zwakkere serum bleek iets sterker den invloed der P.S.-verdunning te ondergaan.

2e Proef: serum konijn E, met P.S. $\frac{1}{250}$ en P.S.-zinkstearaat dichtheid 5.

TABEL VIII.

Serum konijn E titers	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$
P. S. $\frac{1}{250}$, onverdund	++	++	++
P. S. $\frac{1}{250}$, 4× verdund	++	+	+
P. S. $\frac{1}{250}$, 20 × verdund	±	±	—

TABEL IX.

Serumtiters	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	C
P. S.-zinkstearaat, onverdund	+	+	+	
P. S.-zinkstearaat, 4× verdund	+	+	+	
P. S.-zinkstearaat, 20× verdund	—	—	—	

Met het P.S. $\frac{1}{250}$ 20 maal verdund waren de positieve reacties zwak; er was zeer duidelijke opalescentie, terwijl met de zwakke loupe zeer fijne vlokjes waarneembaar waren. De 20 maal verdunde stearaat-suspensie gaf geen vlokking; wèl was er een opheldering te bespeuren, evenals bij de eerste proef. Het bleek evenwel, dat precies hetzelfde te zien was met normaal konijneserum:

TABEL X.

Serum titers normaal serum	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	C.
P.S.-zinkstearaat 20 × verdund	opheldering	opheldering	—	—	—

Dergelijke ophelderingen, die bij zeer verdunde suspensies den indruk van een positieve reactie mochten geven, kon ik dus niet laten gelden; zooals gezegd, was van een vlokking bij deze verdunde suspensie geen sprake bij de laatste proef en slechts in zeer geringe mate bij de eerste proef.

Conclusie: gesuspendeerd antigeen verdraagt verdunning veel minder goed dan antigeen in oplossing, ook als men de voorzorg neemt bij de verdunning uit te gaan van antigenen in optimale concentratie.

Met de proeven, in dit hoofdstuk beschreven, meen ik te hebben aangetoond, dat wanneer men een antiserum laat inwerken op het homologe antigeen, geadsorbeerd aan een suspensie (suspensie-precipitatie), er karakteristieke verschillen optreden, vergeleken met de reacties, die men verkrijgt door het antiserum te laten inwerken op het homologe antigeen in colloïdale oplossing (sol-precipitatie). Deze verschillen uiten zich eenerzijds, doordat de titer van het serum door toepassing van de suspensie-precipitatie wordt verhoogd; anderzijds hierin, dat men het antigeen door het in den vorm eener suspensie aan te wenden, niet meer sterk kan verdunnen. M.a.w. de antigeen-suspensies gedragen zich tegenover precipitinen eenigszins als bacterie-suspensies tegenover agglutinenen.

HOOFDSTUK IV

ONGELIJKTIJDIG OPTREDEN EN VER- DWIJNEN VAN SOL- EN SUSPENSIE- PRECIPITATIE

Het standpunt, bereikt door de proeven, in het vorige hoofdstuk vermeld, heb ik getracht te bevestigen, door na te gaan of in andere gevallen de resultaten verkregen met colloïdaal opgelost en met gesuspendeerd antigeen, evenmin parallel gaan. Zooals reeds werd uiteengezet, hebben sommigen op grond van het niet gelijktijdig aantoonbaar zijn van precipitinen en agglutininen, ten opzichte van deze immuunstoffen het dualistische standpunt verdedigd (zie hoofdstuk I).

De in dit hoofdstuk te beschrijven proeven werden gedaan met de antigenen caseïne en paardenserum, en de adsorbentia colophonium en zinkstearaat.

Vergelijkende proeven met caseïne en cas.-colophonium.

Twee konijnen, I en II, ontvangen 150—200 mgr. caseïne intraveneus, telkens met een week tusschenruimte; alleen na de eerste injectie was het interval 6 dagen. Vóór elke nieuwe injectie werd bloed afgetapt en het serum van beide dieren getitreerd met caseïne en caseïne-colophonium. Zodoende verkreeg ik een goed overzicht van de onderlinge verhouding der twee reacties tijdens de immuniseering. Voor de bereiding

der antigenen werden steeds dezelfde colophonium- en caseïne-oplossingen bereid en steeds volgens dezelfde methode.¹⁾

De resultaten der titraties worden hier stuk voor stuk weergegeven.

1 September: eerste injecties aan I en II.

7 September: bloed afgetapt en met sera gereageerd.

Resultaat na 24 uur:

TABEL XI.

Titers van de sera	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	C. phys. NaCl
I met caseïne ($\frac{1}{200}$ S.) .	—	—	—	—	—	—	—
I met cas. ($\frac{1}{1500}$ S.) — col.	+	+	+	+	+	+	—
II met caseïne ($\frac{1}{200}$ S.) .	—	—	—	—	—	—	—
II met cas. ($\frac{1}{1500}$ S.) — col.	+	+	+	+	+	+	—

Dit resultaat was zeer verrassend. Zooals uit de hier gegeven tabel blijkt, waren de sol-precipitaties bij de beide konijnen I en II volkomen negatief, terwijl de suspensie-precipitaties als positief moesten gelden. De reacties met caseïne-colophonium immers waren sterker positief dan men met een normaal serum pleegt te zien, dat hoogstens tot den titer $\frac{1}{50}$ nog eenige inwerking vertoont. Om evenwel zeker te zijn, dat er geen vergissing was begaan, titreerde ik nu een normaal serum met het gebruikte colophonium antigeen; dit was dus geheel hetzelfde als dat van de vorige proef, alleen had het 24 uur lang gestaan, hetgeen echter volgens mijn ervaring — door speciale proeven gestaafd — geen verschil maakt.

¹⁾ Op verschillende wijzen bereide suspensies van gelijke dichtheid geven overigens, mits met dezelfde verhouding antigeen en adsorbens, dezelfde resultaten.

TABEL XII.

Titers van het serum	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	C (phys. NaCl)
Normaal serum cas-col.	+	+	+	+	+ zeer zwak	—	—

Het is dus bewezen, dat aan een fout in de suspensie deze positieve reacties niet mogen worden geweten.

In het vervolg werden de titraties alle gedaan met iets meer verdunde materialen, n.l. caseïne $\frac{1}{250}$ S en caseïne ($\frac{1}{1050}$ S)-col.

14 September. Weer bloed afgenomen en gereageerd. ¹⁾

TABEL XIII.

Titers	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	C
I met caseïne .	+	+	+	+	+	—				—
I met cas.-col. .					+	+	+	—	—	—
II met caseïne .	+	+	+	+	—	—				
II met cas.-col. .					+	+	—	—	—	

Als met een sprong is de precipitatietiter hier omhoog gegaan.

De mogelijkheid is niet ontkennen, dat het gebruik van een iets meer verdund precipitatie-antigeen wel invloed zou kunnen hebben. Evenwel kan dit de stijging van den precipitatietiter van 0 op $\frac{1}{20}$ en $\frac{1}{50}$ niet verklaren. Ook in een later in dit hoofdstuk te beschrijven proefreeks vond ik, dat na injectie van caseïne een week later nog geen precipitinen aantoonbaar zijn (met caseïne $\frac{1}{250}$ S), en na nog een injectie er gewoonlijk een vrij goede precipitinevorming optreedt

¹⁾ De notering + beteekent in deze serie niet meer dan positief.

(zie pag. 67). De hier gegeven resultaten lijken me dus geheel betrouwbaar te zijn.

In deze serie zien we nu voor het eerst de verhouding tusschen caseïne-proef en suspensieproef optreden ($\pm 1:5$), die de meest voorkomende is.

Bijzonder opmerkelijk is het feit, dat II nu een behoorlijken precipitatietiter heeft gekregen, terwijl met de suspensie de titer dezelfde bleef!

21 September. Weer bloed afgenomen en getitreerd. Bij het bloedafnemen door hartpunctie bezweek helaas konijn I, zoodat het voor het laatst in deze tabel verschijnt.

TABEL XIV.

Serumtiters	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	C.
I met caseïne. .	+	+	+	+	+	—				—
I met cas.-col. .					+	+	+	—	—	—
II met caseïne. .	+	+	+	+	—	—				
II met cas.-col. .					+	+	—	—	—	

Dus geen verschil met den vorigen keer.

28 September. Konijn II bloed afgenomen en getitreerd.

TABEL XV.

Serumtiter	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	C.
II met caseïne. .	+	+	+	+	—	—				—
II met cas.-col. .					+	+	+	—	—	—

Hier is nu de titer met de suspensiemethode 10 maal verhoogd. Evenwel is het niet raadzaam, aan dergelijke kleine

wisselingen waarde te hechten, daar op den precipitinetiter $\frac{1}{20}$ eerst $\frac{1}{50}$ volgt ($\frac{1}{40}$ is misschien wel positief). Maar als voorspel tot de volgende titratie is het niet zonder belang.

5 October. Konijn II bloed afgenomen en getitreerd.

TABEL XVI.

Serumtiter	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	C.
II met caseïne . .	+	+	+	+	—	—				—
II met cas.-col. .					+	+	+	+	+	—

Bij constant blijvenden precipitatietiter, wordt de suspensie tot een titer van $\frac{1}{1000}$ uitgevlokt! Vergeefs heb ik gebracht in de gevolgde bereidingsmethode van de suspensie een fout te vinden. Voor een hernieuwde titratie was geen serum meer over.

12 October. Konijn II bloed afgenomen en getitreerd.

TABEL XVII.

Serumtiter	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	C.
II met caseïne . .	+	+	+	+	+	—				—
II met cas.-col. .					+	+	+	—	—	—

Wonderlijk genoeg, neemt nu de titratie der twee methoden een tegenovergesteld verloop: de titer met caseïne stijgt, die met caseïne-colophonium daalt en gemeenschappelijk wordt de normale onderlinge verhouding hersteld.

Wanneer men deze gegevens in het kort samenvat, krijgt men het volgende verloop: I en II krijgen al spoedig na de eerste injectie een titer met de suspensie, terwijl er van pre-

cipitatie in het geheel niets te bespeuren is (dit laatste kwam regelmatig na één caseïne-injectie voor); spoedig stelt zich een verhouding in tusschen de twee methoden, die gelijk blijft; als met II de proef wordt vervolgd, zet zich een tweede afzonderlijke stijging in van den suspensie-titer, die wederom wordt gevolgd door een stijging van den precipitatietiter, en herstel van de normale verhouding tusschen de twee antigenen.

Er bestond dus in deze proeven geen volkomen parallelisme tusschen de twee methoden.

Nog op een andere manier werd op parallelisme getoetst, door nl. de in de vorige proefreeks verkregen antisera op verschillende temperaturen, en gedurende verschillende tijden, te verhitten. *Pick* (34) is de eerste geweest, die een verschillende gevoeligheid van precipitinen en agglutinininen tegenover verhitte meende vast te stellen. Hij verhitte anti-typhus en anti-cholera sera (van paarden) gedurende $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$ uur op $58-60^{\circ}$ C., en zag nu met de homologe cultuurfiltraten en -extracten geen precipitaties meer, terwijl de agglutinatietiter door de verhitte zelfs verhoogd. Hierin zag *Pick* alweer een bewijs, dat precipitinen en agglutinininen in de onderzochte sera niet identiek konden zijn.

Proeven met verhitte anticaseïne sera.

Ik geef deze proeven precies in dezelfde volgorde waarin ze werden genomen, op gevaar af, dat men de indeeling willekeurig zal vinden.

De sera I en II van 14 September worden gedurende 50 minuten op $59-60^{\circ}$ C. verhit. Vervolgens werd getitreerd met de gewone caseïneoplossing en -suspensie. Resultaat na 24 uur:

TABEL XVIII.

Titer verhit serum	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	C.
I met caseïne	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I met cas.-col. . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
II met caseïne	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
II met cas.-col. . . .	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—

Hier werd dus bij serum I — dat vrij sterk haemolytisch was — een negatieve reactie met beide methoden bereikt; bij II was de reactie met de suspensie positief, met de opgeloste caseïne negatief. Ik merkte evenwel op, dat wel is waar nergens vlokking zichtbaar was, maar wel opalescentie. Daar ik voor een positieve precipitatie (evenals met een suspensie) steeds duidelijk zichtbare vlokking eischte, konden deze opalescenties niet als positieve precipitaties worden genoteerd. Daarom werd na nogmaals 24 uur wederom afgelezen.
 Resultaat na 2×24 uur:

TABEL XIX.

Titer verhit serum	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	C.
I met caseïne	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
I met cas.-col. . . .	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—
II met caseïne	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
II met cas.-col. . . .	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—

Het is nu wel duidelijk geworden, dat de waargenomen opalescenties eenvoudig vertraagde precipitatie-reacties waren. Bij I was de reactie met de suspensie dus eveneens sterk vertraagd, bij II slechts weinig.

Ten overvloede werden nog de verhitte sera met phys. NaCl getitreerd; hierbij zag ik geen opalescenties.

Het serum II van 21 September wordt gedurende 2 uur op 49° C. verhit. Resultaat der reacties na 24 uur:

TABEL XX.

Titer verhit serum	1/2	1/5	1/10	1/20	1/50	1/100	1/200	1/500	1/1000	C.
Met caseïne . .	+	+	+	+	—	—				—
Met cas.-col. .					+	+	—	—	—	—

M.a.w. deze lage verhitting had geen invloed.

Het serum II van 21 September (2de portie, licht haemolytisch) wordt gedurende 2 uur op 58° C. verhit. Resultaat der reacties na 24 uur:

TABEL XXI.

Titer verhit serum	1/2	1/5	1/10	1/20	1/50	1/100	1/200	1/500	1/1000	C.
Met caseïne . .	±	±	±	±	—	—				—
Met cas.-col. .					+	+	+	—	—	—

Voor het eerst werd hier de noteering ± ingevoerd. Ik kreeg n.l. weer dezelfde opalescenties zonder vlokvorming. Toen ik evenwel de buisjes met de loupe bekeek *bij lamplicht*, werd het duidelijk, dat de opalescentie door vlokjes werd gevormd. Dergelijke fijne reacties werden later ook met onverhitte sera gevonden en als specifieke precipitaties onderkend.

De suspensie reageert weliswaar met iets fijner vlokking op de verhitting van het serum, maar de titer is gestegen! (verg. pag. 63). Dit feit, dat volgens de serologische terminologie dus neerkomt op vermindering van de aviditeit der binding, gepaard gaande met verhooging van den titer, wordt wel meer vermeld in de litteratuur.

Het serum II van 28 September wordt gedurende 22 uur op ongeveer 49° C. verhit. In dezen tijd heeft de temperatuur van het waterbad eenigszins gewisseld, van 48° C. in het begin tot 50° C. op het einde der verhitting. Daarna wordt op de gewone manier getitreerd. Resultaat na 24 uur:

TABEL XXII.

Titer verhit serum	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	C.
Met caseïne . .	—	—	—	±	—	—	—	—	—	—
Met cas.-col. .	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—

Met caseïne werd dus alleen in de verdunning $\frac{1}{20}$ zwakke vlokvorming gezien; bij $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{10}$ was er alleen opalescentie (met lamplicht afgelezen). Met de suspensie was de titer een weinig gedaald, terwijl de vlokvorming in de positieve buisjes iets flauwer was, maar in den loop van den dag van aflezing nam de grootte der vlokken toe.

Deze proeven gaven den indruk, dat de titratie door middel der suspensiemethode, door de verhitting der sera wel nadeel ondervond, maar toch minder achteruitging dan de eigenlijke precipitatieproef. Hier was al spoedig van een typische precipitatie niet veel meer te zien. Er was wel samengang (al de reacties werden vertraagd), maar geen werkelijk parallelisme bij deze proeven, zoodat men tot de conclusie zou kunnen komen, dat men met twee verschillende antistoffen te doen had. Waar nu de sol-precipitatie werd gedaan met optimale concentratie van het antigeen, is er te meer reden om aan de proeven van Pick verricht met cultuurfiltraten en extracten (pag. 63), geen groote beteekenis te hechten.

Proeven met Zinkstearaat.

Dit materiaal stelde mij in staat om onder aanwending van uitvoeriger contrôle de proeven voort te zetten, daar zoowel

caseïne als paardeserum uitstekende suspensies hiermee gaven, die goed reageerden op de werking van antiserum. Bij de vorige proeven moest ik mij noodgedwongen beperken tot caseïne, daar het toen gebruikte suspensiemateriaal geen goede uitkomsten gaf met paardeserum en typhusbacillen-extract en kon ik daardoor de mogelijkheid niet uitsluiten, dat sommige behandelde dieren een verhoogd onspecifiek uitvlokkingsvermogen ten opzichte van suspensies hadden gekregen. Door het nieuwe materiaal was eindelijk de gelegenheid open tot het nemen van kruisproeven.

Alvorens deze proeven nader te beschrijven, valt eerst het verschil te demonstreeren tusschen caseïne en paardeserum, wat betreft de antigene eigenschappen, welk verschil hier op zeer opmerkelijke wijze aan den dag trad.

Konijnen no. 7, 8 en 9 ontvingen elk 1,5 cc. paardeserum intraveneus.

Konijnen no. 10, 11 en 12 ontvingen elk 5 cc. caseïne $\frac{1}{2}$ S intraveneus. Ruim een week later werd bloed afgetapt en getitreerd met de homologe antigenen. Resultaat:

Konijnen 7, 8 en 9 titers $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{10}$ en $\frac{1}{20}$ alle positief.

Konijnen 10, 11 en 12 titers $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{10}$ en $\frac{1}{20}$ alle negatief.

Ik veronderstelde, dat wellicht (mede in verband met de iets grootere caseïne-dosis) de caseïne-dieren iets later zouden reageeren. Daarom kregen deze dieren een nieuwe injectie — de paardeserum konijnen niet — en werd gewacht totdat in het geheel 24 dagen na de eerste injectie waren verlopen, en toen nogmaals de caseïne-dieren getitreerd. Resultaat:

TABEL XXIII.

Serumtiters	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	C.
Caseïne-konijn 10 . .	+	+	—	—	—	—	—
„ „ 11 . .	—	—	—	—	—	—	
„ „ 12 . .	—	—	—	—	—	—	

Bij deze dieren was het resultaat dus wel heel mager! Geen van hen kreeg nog een injectie; maar de sera werden 3 maanden later alle opnieuw getitreerd met de homologe antigenen. Resultaat:

TABEL XXIV.

Serumtiters		$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	C.
P.S.	Konijn 7	+	±	±	—	—
	" 8	+	±	±	—	—
	" 9	±	±	±	—	—
Caseïne	" 10	++	++	++	+	—
	" 11	++	++	++	++	—
	" 12	++	++	++	±	—

Conclusie: de caseïne-konijnen reageeren toch niet zoo heel slecht, mits men 2 injecties geeft en desnoods langer wacht met het bloed afnemen. In elk geval was de reactie bij deze 3 caseïne-dieren veel slechter dan bij de proeven met caseïne-colophonium.

Ik richtte nu een nieuwe proef in, waarbij het de bedoeling was weer het oogenblik te treffen, waarop de precipitinen juist zouden zijn aan te toonen.

Konijnen A, B en C ontvangen elk intraveneus $\frac{1}{2}$ cc. caseïne S.

Konijnen D, E en F ontvangen een dag later elk $\frac{1}{2}$ cc. P.S.

De twee groepen wordt bloed afgenomen, resp. 4 en 3 dagen na de injectie, en alle sera werden getitreerd met de beide precipitatie-antigenen en met de beide suspensie-antigenen (kruisproef). Het resultaat was nihil.

Dadelijk krijgen de dieren een nieuwe, nu grootere injectie (1 cc. elk). Na 3 dagen wordt weer bloed afgenomen en getitreerd als tevoren met nog 2 normale sera erbij.

Het resultaat, na 24 uur afgelezen, volgt hieronder:

TABEL XXV.

Titers der sera	Precipitatie				Suspensie			
	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{10}$	C.	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{100}$	C.
Caseïne-konijn A met P.S.	—	—	—	—	—	—	—	—
" " B id.	—	—	—		—	—	—	
" " C id.	—	—	—		—	—	—	
Serum-Konijn D id.	+	+	+		+	—	—	
" " E id.	+	+	—		—	—	—	
" " F id.	—	—	—		—	—	—	
Norm. ser. 1 id.	—	—	—		—	—	—	
Norm. ser. A. 54 id.	—	—	—		—	—	—	
Caseïne-konijn A met Cas.	—	—	—	—	—	—	—	—
" " B id.	+	—	—		—	—	—	
" " C id.	—	—	—		—	—	—	
Serum-konijn D id.	—	—	—		—	—	—	
" " E id.	—	—	—		—	—	—	
" " F id.	—	—	—		—	—	—	
Norm. ser. 1 id.	—	—	—		—	—	—	
Norm. ser. A 54 id.	—	—	—		—	—	—	

P.S. antigeen: oplossing $\frac{1}{250}$ S, suspensie $\frac{1}{300}$ S.

Cas. antigeen: oplossing $\frac{1}{250}$ S, suspensie $\frac{1}{660}$ S.

Het resultaat was een volkomen verrassing. Weliswaar ging de proef in één opzicht normaal, dat de positieve sera alle reageeren met het homologe antigeen: de sera D en E reageeren alleen met paardeserum, het serum B alleen met caseïne. Maar de verhouding tusschen suspensie- en solprecipitatieproef is totaal zoek! Zooals reeds in het vorige hoofdstuk werd medegedeeld, zag ik regelmatig bij de sera van hooger geïmmuniseerde dieren, dat de suspensie met 10 maal hooger serumverduunningen reageerde. Zoo had serum D met de suspensie van P.S. den titer $\frac{1}{100}$ moeten geven; serum E den titer $\frac{1}{50}$; serum B met de caseïne-suspensie $\frac{1}{20}$. Alle

drie blijven ver onder den verwachten titer, en bij twee precipiteerende sera is er zelfs in het geheel geen reactie met de suspensie. ¹⁾

Bij deze bevindingen heb ik mij niet onvoorwaardelijk neergelegd. Konijn B gaf ik nog 2 injecties met $2\frac{1}{2}$ cc. caseïne S; konijnen D en E kregen nog 2 injecties van $2\frac{1}{2}$ cc. paardeserum. Een week na de laatste injecties werd opnieuw kruisgewijs getitreerd, behalve serum D.

TABEL XXVI.

Serumtiters	Precipitatie					Suspensie				
	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	C.	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	C.
B met Cas. . .	±	—	—	—	—	+	—	—	—	—
E „ . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B met P.S.. . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
E „ . . .	+	+	±	—	—	+	+	+	—	—

Serumtiters	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	C.
D met P.S.	+	+	—	—	—	—	—
D met P.S. suspensie	+	+	+	+	+	—	—

Merkwaardigerwijze heeft de verhouding tusschen precipitatie- en suspensiemethode zich hier nu hersteld, terwijl serum B hierbij niet eens in precipitatietiter gestegen is. Dit laatste — herstel der verhouding, terwijl één der titers constant bleef — zag ik ook in de proeven met caseïne en colophonium; maar overigens is het verloop hier precies andersom: eerst komt de precipitatie, en later de suspensiereactie!

¹⁾ Ik breng in herinnering, dat een serumverduunning $\frac{1}{10}$ nog onspecifieke uitvlokking geeft met zinkstearaat-suspensies.

Het spreekt vanzelf, dat bij deze proeven de antigenen geheel op dezelfde wijze en met dezelfde materialen, met de meeste zorg werden bereid.

Paralleliteit is dus, ook bij het gebruik van zinkstearaat als suspensiemateriaal, niet onder alle omstandigheden aanwezig.

HOOFDSTUK V

ENKELE PHYSISCH-CHEMISCHE GEGEVENS OVER PRECIPITATIE

In de voorgaande hoofdstukken werd een proevenreeks verricht, waarbij de veranderingen in de precipitatie zijn bestudeerd, die werden teweeg gebracht door het antigeen aan suspensies te adsorbeeren. Daarbij werden afwijkingen geconstateerd, zooals verscheidene onderzoekers die bij agglutinatie hebben gevonden, ter onderscheiding van de precipitatie.

Fysische chemie der agglutinatie. Het leek mij wenschelijk, deze gegevens aan te vullen met een onderzoek naar den invloed van zouten op de precipitatie. Voor de agglutinatie is deze 2de phase van het uitvlokkingsproces (*Bordet* zie pag. 17) reeds zeer uitvoerig bestudeerd door *Bechhold* (35), *Neisser* en *Friedemann* (36), *Buxton*, *Shaffer* en *Teague* (37) en anderen. Deze onderzoekers hebben gevonden, dat met agglutinine beladen bacteriën zich ten opzichte van zouten gedragen als electronegatief geladen (d.i. zure) suspensies. Agglutininebacteriën zijn dan ook zwak electronegatief geladen, d.w.z. zij hebben de lading aangenomen van het eiwit van het antiserum, dat op ze heeft ingewerkt (*Shibley*) (38). Over de eigenlijke werking van de zouten bij agglutinatie, waarover we vooral door *Northrop* en de *Kruif* zijn ingelicht, zal ik niet uitweiden; de bedoeling is hier alleen den invloed der zouten bij precipitatie te vergelijken met die bij agglutinatie.

Het uitvlokken van electronegatief geladen suspensiecolloïden tegenover zouten staat vooral onder den invloed van de — electropositieve — *kationen*. ¹⁾ In de eerste plaats overweegt de invloed van de valentie der kationen: éénwaardige kationen als Na vlokken veel minder sterk uit dan 2-waardige als b.v. Ca; deze op hun beurt werken zwakker dan 3-waardige. Onder de éénwaardige kationen hebben nog een sprekende werking de organische en het waterstof (H-)ion, zoomede ionen van zware metalen (Ag.). Bij het werken met kationen van zware metalen is nog gebleken, dat zij op eiwitten en organische suspensies een bijzonder sterke werking uitoefenen, daar zij met deze irreversibele verbindingen aangaan.

Tegenover de werking der kationen staat die der anionen geheel op den achtergrond. Regel is, dat bij de besproken suspensies de *anionen* juist een verminderde werking vertoonen, naarmate de valentie toeneemt.

De werking der ionen wordt bepaald met toevoeging van verschillende zouten, die men kiest naar de ionen, welke men wil bestudeeren, en uitgedrukt door de minimale hoeveelheid zout, die uitvloeking veroorzaakt. Indien men b.v. het anion Cl in de gebruikte zouten heeft, kan men de kationen naar hun werking rangschikken; evenzoo kan men bij constant kation een aantal anionen onderzoeken en rangschikken.

Bij de agglutinatie van bacteriën zijn deze zoutinvloeden door de hierboven genoemde onderzoekers reeds lang nagegaan. Bij de precipitatie vindt men over zoutinvloeden daarentegen uiterst weinig. Het meeste wordt nog medegedeeld door *Eisenberg* in zijn reeds aangehaald autoreferaat (22), die vond dat NaCl-oplossingen — zelfs geconcentreerde — geen invloed hebben op de precipitatie; daarentegen remden $MgCl_2$ en $MgSO_4$ deze in sterke mate.

Het leek niet zonder beteekenis te zijn, dit onderwerp nader

¹⁾ Ik volg hier Höber.

in studie te nemen. Colloidaal opgeloste antigenen (precipitogenen) en serumeiwitten, waartoe waarschijnlijk ook de immuunprecipitinen te rekenen zijn, zijn hydrophile colloïden, d.w.z. zij vlokken door neutrale zouten in hooge concentratie uit, en zijn daarna weer gemakkelijk oplosbaar. Bij de precipitinereactie heeft men evenwel met iets anders te doen: het precipitaat vlokt bij lage — physiologische — zoutconcentratie uit, en is dan eerst met bijzondere kunstgrepen (verwarmen, alkaliën of zuren) weer op te lossen. Mijn *vraagstelling* was deze: Gedraagt zich de eiwit-precipitine verbinding als een suspensie-colloïd, evenals de bacterie-agglutinine verbinding de eigenschappen van een echte suspensie heeft?

De invloed van zouten op de precipitatie van paardeserum.

De eenvoudigste vraag, die men zich kan stellen, is de volgende: heeft de precipitatie, zooals men die gewoon is te doen, n.l. met gebruik van physiologische zoutsolutie, plaats met de voor dit doel meest geschikte NaCl-concentratie? Deze vraag is niet zonder belang, daar het uitvlokken van suspensiecolloïden in verdunden vorm, zeer sterk afhankelijk is van de concentratie van het zout, zooals werd aangetoond voor mastix (zie pag. 48). In de serologie is het niet zonder beteekenis om te weten, op welke wijze men het gemakkelijkst een gevoelige precipitatie kan krijgen. Hiervoor diende de volgende, *oriënteerende proef*. Paardeserum werd 200 maal verdund met oplossingen van zuiver NaCl, en wel in sterkten van $5\times$, $2\times$, $1\times$, $\frac{1}{2}\times$ en $\frac{1}{5}\times$ de normaaloplossing. Door deze oplossingen te mengen met gelijke hoeveelheden precipiteerend serum, dat 10 maal met gedestilleerd water verdund was, en met gedest. water en deze antigeen bevattende oplossingen verder werd getitreerd, kreeg ik dus een aantal titraties met verschillende NaCl-hoeveelheden in de menging. Ter contrôle werd nog een serie getitreerd met gedestilleerd water en één met physiologisch NaCl (èn serum èn antigeen).

Correctie: het spreekt vanzelf dat de proef in dezen vorm niet zuiver is. Zoowel het antiserum als het paardeserum bevatten immers zouten. Ze zijn echter zoo sterk verdund, dat, zooals blijken zal, deze kleine hoeveelheden zout geen invloed konden hebben. Het voor de hand liggende middel *dialyse waagde ik niet toe te passen* bij deze proeven, daar hierbij eiwitneerslagen ontstaan, die de aflezing onbetrouwbaar zouden maken. Dit heeft de agglutinatiemethode voor, dat men zich van een troebeling van het antiserum niet veel hoeft aan te trekken.

TABEL XXVII.

Serumtiters	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	C (P.S. met aq. dest.)
Berekende NaCl conc. $2\frac{1}{2}$ N.	—	—	—	—	—	—	—
idem N.	—	—	—	—	—	—	—
idem $\frac{1}{2}$ N.	±	—	—	—	—	—	—
idem $\frac{1}{4}$ N.	++	—	—	—	—	—	—
idem $\frac{1}{10}$ N.	++	±	—	—	—	—	—
idem 0	—	—	—	—	—	—	—
Met phys. NaCl ($\frac{1}{7}$ N.). . .	++	±	—	—	—	—	—

Conclusies: de sporen zout, die nog in de vloeistoffen aanwezig waren, daar de sera niet gedialyseerd werden, zijn niet voldoende om de precipitatie van het bij $\frac{1}{50}$ nog zwak positieve serum te bewerkstelligen. Het blijkt dat de physiologische NaCl-concentratie vrijwel ligt in de zône van wat ik de *optimale zoutconcentratie* mag noemen. Door het gebruik van meer of minder NaCl neemt de titer niet toe; wél krijgt men bij het gebruik van een weinig minder zout iets grooter neerslagen bij den titer $\frac{1}{20}$.

De physiologische zoutsolutie, die werd gebruikt, bevatte 0.85 % NaCl, hetgeen ongeveer neerkomt op een $\frac{1}{7}$ nor-

male oplossing (normaal = 1 grammolecuul per liter = 5,85 % NaCl).

Het is opmerkelijk, dat verhooging van het NaCl-gehalte tot iets meer dan het physiologische, reeds een nadeeligen invloed heeft.

Proef met een aantal verschillende electrolyten.

De volgende proef werd eenigszins anders ingericht. Ik heb een serum genomen, dat den titer $\frac{1}{100}$ had, en dit 25 maal met gedest. water verdund. Van een aantal zouten werden normale en $\frac{1}{50}$ normale oplossingen gemaakt, zoodanig dat deze tevens paardeserum in de verdunning 1 : 200 bevatten. Met deze stamoplossingen werden serieën buisjes gevuld en verdunningen gemaakt met paardeserum 1 : 200 in gedestilleerd water. Zoo werden telkens 10 buisjes gevuld met oplossingen, die varieerden van $\frac{1}{2}$ N. tot $\frac{1}{2000}$ N., telkens één serie van één zout, terwijl overal paardeserum was in de verdunning 1 : 200. Van het $\frac{1}{25}$ verdunde serum werden telkens gelijke hoeveelheden (1 cc. bij 1 cc.) in de buisjes gedaan en gemengd; na 24 uur werden de precipitaties afgelezen als volgt.

Gebruikte ionen:

Kationen: éénwaardig: Na, K, (NH_4) , morphine; tweewaardig: Mg, Ca, Ba.

Anionen: éénwaardig Cl, NO_3 ; tweewaardig: SO_4 ; driewaardig: citraat.

Van de onderste 3 seriën (tabel XXVIII) vallen de sterkere concentraties weg, wegens gebrekkige oplosbaarheid; daar de serieën hier ten deele ontbraken, werden bij deze dan ook niet, als bij de andere zoutseriën, accoladen $\sim$ geplaatst. Deze accoladen geven voor elk zout weer de buisjes, waarin de uitvlokkingen het grootst waren (*optimale zoutconcentraties*).

Het spreekt vanzelf, dat men ook hier in aanmerking moet

TABEL XXVIII.

Zoutcon- centratie	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$	nor- maal
NaCl . .	±	+	+	+	+	±	—	—	—	—	
KCl. . .	±	+	+	+	+	±	—	—	—	—	
(NH ₄) Cl .	—	+	+	+	+	+	±	—	—	—	
KNO ₃ . .	—	±	+	+	+	—	—	—	—	—	
$\frac{K_2 SO_4}{2}$. .	±	+	+	+	+	—	—	—	—	—	
Mg Cl ₂ . .	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	
Mg SO ₄ . .	—	±	+	+	+	+	+	+	+	—	
Ca Cl ₂ . .	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	
Ba(NO ₃) ₂ .						+	+	+	+	—	
$\frac{K_3 \text{ citraat}}{3}$						+	±	—	—	—	
Morphine- chloride						+	±	—	—	—	

nemen, dat de vloeistoffen bij deze proef eveneens een weinig zout, afkomstig van de gebruikte sera, bevatten (minder dan in de vorige proef!).

Men krijgt hier wel den indruk, dat zeer weinig NaCl voldoende is voor een positieve proef; de optimale zône bevindt zich bij $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{40}$ N., m.a.w. de physiologische zoutconcentratie is juist aan de bovenkant ervan.

Zeër sprekende invloed van de valentie der kationen valt uit deze tabel af te lezen. Zonder uitzondering reageeren de zouten met 2-waardige kationen sterker, wat betreft de minimale zoutconcentratie die nog werkzaam is; bovendien lossen ze bij hogere doses het precipitaat weer spoediger op, al is dit niet zoo buitengewoon opmerkelijk. Men zal in dit ver-

band de 3-waardige kationen missen; de verklaring is deze, dat de gebruikte aluminiumzouten in de concentraties $\frac{1}{400}$ — $\frac{1}{1000}$ oogenblikkelijk na menging neerslagen gaven, die niet werden genoteerd, daar het bleek dat dit onspecifieke reacties waren.

Contrôle: dezelfde proef werd geheel overgedaan, maar zonder toevoeging van P.S. Resultaat; nergens troebeling, behalve bij zwakke concentraties van aluminiumzouten; deze werden daarom van de lijst geschrapt.

De onderzochte éénwaardige ionen gedragen zich onderling geheel zooals het te verwachten is bij electronegatieve suspensiecolloïden: Na en K werken even sterk in (verg. NaCl en KCl); daarentegen werkt (NH_4) Cl iets sterker (NH_4 -ion). Het morphinechloride werkt weer iets sterker dan de vorige drie (organisch ion).

M.a.w. de paardeserum-precipitineverbinding gedraagt zich tegenover kationen geheel als een electronegatief geladen suspensiecolloïd.

Iets moeilijker zijn de gedragingen der anionen te waardeeren. Ter vergelijking geef ik hier een verkorte tabel van *Freundlich*, die de minimale concentraties van verschillende zouten bepaalde, welke het electronegatief geladen suspensie colloïd arseensulfide deden uitvlokken (in millimolen per liter):

NaCl	51.0 millimol p. L.	MgCl ₂	0.717 millimol p. L.
KCl	49.5 " "	MgSO ₄	0.810 " "
(NH ₄) Cl	42.3 " "	CaCl ₂	0.649 " "
KNO ₃	50.0 " "	Ba(NO ₃) ₂	0.687 " "
K ₂ SO ₄	65.6 " "	K ₃ citraat	meer dan 240.0 "
<u>2</u>		<u>3</u>	
		Morph.chloride	0.425 " "

Het 2-waardige SO₄-ion gedroeg zich in mijn proeven als in de tabel van *Freundlich*, d.w.z. het werkte minder sterk dan het 1-waardige Cl-ion. Het 1-waardige NO₃-ion gedroeg

zich niet volgens den regel. In plaats van ongeveer gelijk als het Cl-ion te werken, was er meer van noodig om uitvlokking te verkrijgen, en loste het precipitaat in overmaat weer snel op! Ik merk nog op, dat *Bechhold* voor typhusbacillen met agglutinine gelijke werking van NO_3 en Cl vond, evenwel zagen *Eisenberg* en *Volk* (39), dat nitraten bij overmaat sterker remming gaven dan chloriden (eveneens bij typhusagglutinatie); hetzelfde vonden zij met sulfaten!

Nog vreemder is het gedrag van kaliumcitraat; het citraat-ion deed geheel het tegenovergestelde in mijn proeven, daar het de precipitatie vrij sterk bevorderde!

Met de anionen werden dus afwijkingen gevonden van wat de regel voor suspensiecolloïden voorschrijft.

Om deze gegevens te completeeren, heb ik nog een aantal zouten met meerwaardige kationen willen toepassen, waarvan echter al dadelijk de zware metaal-zouten CuCl_2 en HgCl_2 benevens CdCl_2 en ZnSO_4 afvielen, daar zij al in zeer verdunde oplossingen neerslagen gaven met P.S. $\frac{1}{200}$. Ook het 3-waardige ferri-ion (FeCl_3) kon om die reden geen toepassing vinden, de overige zouten werden precies op dezelfde manier met P.S. $\frac{1}{200}$ aan gelijke hoeveelheden $\frac{1}{25}$ verdund precipiteerend serum toegevoegd. Dit serum was echter een ander dan het vorige; het werkte sterker (de titer was n.l. $\frac{1}{200}$), zoodat wellicht hieraan moet toegeschreven worden, dat het

TABEL XXIX.

Zoutconcentratie	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$	normaal
Ca Cl_2 . .	±	+	+	+	+	+	+	+	±	—	
Mn Cl_2 . .	±	±	+	+	+	+	+	+	+	—	
Co Cl_2 . .	—	±	+	+	+	+	+	+	+	±	
Ni Cl_2 . .	—	—	±	+	+	+	+	+	+	+	

ter contrôle erbij was gevoegd, nu in hogere concentraties nog neerslagen gaf.

In deze serieën schijnt Mn iets sterker te werken dan Ca, Co weer sterker dan Mn en Ni sterker dan Co. Evenwel bleek, dat de stamoplossing $\frac{1}{50}$ N (met P.S. $\frac{1}{200}$) bij Co Cl_2 opalescent was geworden, en bij Ni Cl_2 zelfs den volgenden dag een klein neerslag had gegeven. Daarom werd aan deze twee zouten verder geen aandacht meer gegeven. Mn Cl_2 geeft met een normaalserum $\frac{1}{50}$ geen neerslagen.

Hoe gedragen zich nu *kationen van verschillende valentie naast elkaar* bij de precipitatie-reactie? Het is van belang dit te weten, daar in de lichaamsvloeistoffen één- en tweewaardige kationen in gemakkelijk aantoonbare hoeveelheid aanwezig zijn. *Eisenberg en Volk*, in hun reeds geciteerd onderzoek, vonden dat verschillende kationen elkaar addeeren, wat betreft hun remmende werking, bij overmaat, op de typhus-agglutinatie. Ik heb de werking van Ca en Mn tegenover Na nagegaan.

Proef: over een serie van 13 buisjes worden eerst zoutmengsels (1 cc. per buisje) verdeeld op de volgende wijze:

Afdalende hoeveelheden NaCl-oplossing worden gemengd met klimmende hoeveelheden CaCl_2 -oplossing. Beide oplossingen hebben een sterkte van 0.290 N. en bevatten $\frac{1}{200}$ P.S. Als nu elk buisje gemengd wordt met 1 cc. door middel van gedestilleerd water $\frac{1}{50}$ verdund antiserum, dan is de zoutconcentratie in ieder buisje geworden 0.145 N. Dit is juist ook de moleculaire concentratie van het gebruikte phys. NaCl (+ de gebruikelijke correctie).

In de tabel XXX is voor elk buisje de verhouding der zoutmengsels opgegeven. Het gebruikte serum was dat van de eerste proef met verschillende zouten (tabel pag. 77), in dezelfde concentratie.

TABEL XXX.

Buisje	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
NaCl 0.290 N.	1	0.95	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	0
CaCl ₂ 0.290 N.	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	0.95	1
Met ser. $\frac{1}{50}$ in aq.dest.	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—

Titer met phys. NaCl, P.S. $\frac{1}{200}$, $\frac{1}{50} \pm$.

Interessant is het, te letten op het buisje IX, waar juist geen precipitatie meer te zien is. De CaCl₂-concentratie is daar $0.7 \times 0.145 = 0.1015$ N. of vrijwel $\frac{1}{10}$ normaal. Dit is de concentratie, waarbij ons bleek, dat CaCl₂ nog juist precipitatie gaf; bij een sterkere dosis n.l. $\frac{1}{4}$ N. was er niets meer te zien (tabel pag. 77). De toevoeging van een weinig NaCl, n.l. $0.3 \times$ de physiologische concentratie, was reeds voldoende, in deze serie, om de werking van CaCl₂ $\frac{1}{10}$ N. zoodanig te versterken, dat er geen precipitatie meer optrad.

Men krijgt hier sterk den indruk, dat NaCl en CaCl₂ elkaar addeeren in hun werking. Deze proef vertoont dus iets geheel anders, dan wat in de physiologie bekend staat onder den naam van *balanceerende werking van ionen*, waarbij Natrium- en Calcium-ionen elkaars werking schijnen op te heffen. Dit gegeven is volkomen bevestigd door de verdere proeven met CaCl₂ en MnCl₂.

Proeven met verdunde zoutoplossingen. Ik had opgemerkt, dat de neerslagen met zouten van 2-waardige kationen, in de optimale concentraties, zooveel grooter neerslagen gaven dan de buisjes met phys. NaCl. Ter vergelijking werden sera getitreerd, waarbij serieën waren genomen, deels met phys. NaCl, deels met $\frac{1}{100}$ of $\frac{1}{200}$ N. CaCl₂ resp. MnCl₂. Ik geef verkort zulk een titratie weer:

TABEL XXXI.

Serumtiters	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$
Met P.S. $\frac{1}{200}$, CaCl_2 $\frac{1}{110}$ N.	++	++	+	±	±	—

M.a.w. door te titreeren in sterk verdund CaCl_2 (resp. MnCl_2) kan men aanmerkelijk veel hoogere titers verkrijgen.

Verder werd een titratie uitgevoerd, waarbij ik NaCl en MnCl_2 mengde, elk in de concentratie, die juist zich aan de bovengrens van de optimale bevindt, n.l. phys. NaCl en $\frac{1}{50}$ N. MnCl_2 . Het serum werd verdund met phys. NaCl , het antigeen met MnCl_2 $\frac{1}{50}$ N., en de twee in gelijke hoeveelheden gemengd. In de menging waren dus naast elkaar MnCl_2 $\frac{1}{100}$ N. (dat evenals CaCl_2 de titers in de concentratie $\frac{1}{100}$ N. ongeveer 10-voudig verhoogt) en NaCl in de halve physiologische concentratie, (dus nu geheel in de optimale zône).

TABEL XXXII.

Serumtiters	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{20}$
I Serum met phys. NaCl getitreerd.	++	+	±
II Serum met NaCl-MnCl_2 getitreerd.	++	++	±

M.a.w. het sterke precipiteerende vermogen van Mn Cl_2 $\frac{1}{100}$ N is door de aanwezigheid van NaCl in de halve physiologische concentratie bijna geheel genivelleerd. Ook dit wijst op een zuiver addeerende werking.

Uit het reeds gezegde zou men kunnen afleiden, dat het nu een kleinigheid geworden is om de precipitatiemethode te verbeteren, door n.l. te titreeren met oplossingen van zouten van 2-waardige kationen. Inderdaad wordt de titer hiermee

sterk verhoogd, maar het doel om in zwak precipiteerende sera kleine hoeveelheden precipitine aan te toonen, die met phys. NaCl aan de waarneming ontsnappen, heb ik niet kunnen bereiken. Dit tengevolge van:

Onspecifieke reacties met CaCl_2 en MnCl_2 . Als men willekeurige konijnesera verdunt met deze zouten in de concentraties, voor optimale precipitatie geschikt (nu dus zonder P.S.), dan ontstaan precipitaten gewoonlijk tot den titer $1/10 - 1/20$. Als nu de titer van het antiserum heel laag is, dan maakt deze onspecifieke precipitatie een zuivere waarneming onmogelijk. Herhaaldelijk werd getracht, door wijziging der concentraties hierin verbetering te brengen, zonder dat het mij lukte. Bovendien kreeg ik den indruk, dat bij een lageren titer de precipitaten met CaCl_2 of MnCl_2 volstrekt niet zooveel meer overvloedig zijn dan met NaCl; het lijkt alsof het serum steeds beter met NaCl reageert, des te zwakker het is.

Met verdunde NaCl-oplossingen krijgt men deze onspecifieke precipitaten niet; ook kan men, althans met zwakkere sera, hiermee geen verhooging van den specifieke precipitatietiter bereiken.

Ik heb mij nog afgevraagd, of onspecifieke precipitaten ook precipitine bevatten. Bij onderzoek van een serum, dat een titer van $1/50$ (met phys. NaCl) had, bleek dat er na wegcentrifugeeren van zulk een precipitaat met CaCl_2 $1/110$ N., nauwelijks verzwakking van de specifieke precipitatie in het serum te zien was.

SAMENVATTING

Bij het overzien der in dit proefschrift vereenigde gegevens, meen ik dat men gerechtigd is de opvatting te verdedigen, dat tot dusverre door dualistisch gezinde schrijvers te weinig waarde werd gehecht aan den invloed van physisch-chemische factoren bij de beoordeeling der mogelijke identiteit van specifieke precipitinen en agglutininen.

Door colloïdaal opgeloste antigenen, n.l. caseïne en paardeserum, te adsorbeeren aan verschillende suspensies, werden met bacteriesuspensies vergelijkbare antigenen verkregen, die onder de inwerking van precipiteerende, homologe immuunsera uitvlokten. De aldus verkregen reacties gaven niet alleen voor het oog den indruk van bacterie-agglutinaties, maar bleken ook eenige typeerende eigenschappen van deze te vertoonen.

Het toevoegen van suspensies aan colloïdaal opgeloste antigenen, om met agglutinaties vergelijkbare reacties te verkrijgen, werd reeds in 1898 door *Ch. Nicolle* (3) toegepast. Deze onderzoeker schijnt hierbij aan de suspensiedeeltjes een geheel passieve rol te hebben toebedeeld, in de meening dat zij werden meegesleept door het in de hen omgevende vloeistof ontstane precipitaat, zulks in navolging van de opvattingen van *Paltauf* over de agglutinatie (pag. 11); hij heeft de methode dan ook alleen toegepast met antiserum-verdunningen, waarbij met cultuurfiltraten zonder meer nog precipitatie te zien was.

De noodzaak, dat voorafgaande adsorptie moet plaats vinden om de typeerende serumtiterverhooging met suspensiemateriaal

te verkrijgen, werd in dit proefschrift bewezen (pag. 43), en in de onlangs verschenen publicatie van Jones (32) eveneens betoogd.

Het was opmerkelijk, dat nu de precipiteerende sera met dergelijke suspensies in hooge verdunningen specifieke uitvlokking gaven, terwijl omgekeerd verdunning der suspensies slechts in beperkte mate kon geschieden, zonder de reactie te storen. Door deze resultaten hebben de in hoofdstuk I, sub 1e en 2e (pag. 14, 15) genoemde argumenten der dualisten veel van hun waarde verloren.

Bij deze proeven werd aandacht geschonken aan de wenselijkheid, om voor specifieke reacties optimale concentraties der antigenen te bepalen en aan te wenden.

Verder bleek, dat niet onder alle omstandigheden de beschreven sol- en suspensie-precipitaties parallel gingen, nòch in het verloop van een immuniseeringsproces, nòch onder invloed van verhitting der antisera (hoofdstuk IV). Hiermee verloren wederom argumenten der dualisten (hoofdstuk I, sub 3e, pag. 15) goeddeels hun overtuigende kracht, daar ook bij deze proeven slechts van precipitinen sprake kon zijn.

Deze onderzoeken werden aangevuld met proeven over den invloed van zouten op de precipitatie van paardeserum-antigeen. Het bleek, dat hier de invloed der kationen overwegend was, evenals reeds lang was vastgesteld voor het agglutinatie-proces. Tevens was er gelegenheid te wijzen op de beteekenis van onspecifieke precipitaties, zoowel in physiologische zoutsolutie (pag. 25), als in verdunde oplossingen van zouten met 2-waardige kationen (pag. 83).

Ofschoon deze proeven, naar mijn meening, het unitarische standpunt versterken, is het noodig erop te wijzen, dat vaak de omstandigheden ingewikkelder zijn, dan bij de hier beschreven proeven. Het uitgangspunt hierbij was, dat precipitinen en agglutininen zouden inwerken op hetzelfde antigeen,

maar resp. in colloïdaal opgelosten — cultuurfiltraat of bacterie-extract —, en gesuspendeerden — bacteriesuspensie — vorm. Nu zijn gegevens bekend, die ervoor pleiten, dat antisera niet altijd met hetzelfde antigeen — maar in verschillenden vorm — reageeren.

Zoo vond *Demees* (40), dat gezuiverde haemoglobine, bij konijnen ingespoten, wèl aanleiding geeft tot het vormen van een precipitine hiertegen, maar niet van haemolysine, dat zooals bekend ontstaat na injectie van erythrocyten of stromata. Verschillen vond ook *Klein* (41) tusschen erythrocyten-extract en stromata als antigenen, o.a. ten opzichte van de vorming van erythroprecipitine en -agglutinine. De afwijkingen waren hier evenwel slechts relatief. In dezelfde richting zouden de proeven van *Harrison* (42) wellicht kunnen wijzen, waarbij de buitenste laag van bacteriën werd opgelost met pyocyanase, tengevolge waarvan zij met immuunserum niet meer agglutineerden.

Deze proeven bewijzen evenwel niet anders, dan dat de buitenste laag van cellen in sommige gevallen zooveel van den celinhoud kan afwijken in chemische samenstelling, dat deze bestanddeelen als verschillende antigenen ook verschillende antistoffen geven. Heel sprekend is het voorbeeld, door *Demees* geconstateerd, van zuivere haemoglobine en stromata. Doch in gevallen waar dergelijke verschillen niet op den voorgrond treden, is er ten aanzien van precipitinen en agglutininen alle reden voor de paradox ¹⁾: „er zijn juist zooveel antistoffen als er methoden zijn om ze aan te toonen”.

¹⁾ Overgenomen uit: *H. G. Wells, Die Chemischen Anschauungen über Immunitätsvorgänge.*

LIJST VAN GERAADPLEEGDE LITTERATUUR

1. R. Kraus. Wien. klin. Wochenschrift 1897, no. 32, p. 736—738.
2. Paltauf. Wien. klin. Wochenschrift 1897, Protocoll d. Ges. der Aerzte 30 April, no. 18, p. 431.
3. Ch. Nicolle, Annales de l'Institut Pasteur T. 12, p. 161.
4. R. Kraus en Seng. Wien. klin. Wochenschrift 1899, no. 1, p. 1.
5. Th. Tchistovitch. Annales de l'Institut Pasteur T. 13, p. 406.
6. A. Radzievsky. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankheiten Bd. 34, p. 369.
7. H. W. Cromwell. Journal of infectious Diseases 1925, 37, p. 321.
8. Bail. Prag. Med. Wochenschrift, Bd. 36, p. 137.
9. R. Kraus en C. v. Pirquet. Centralblatt f. Bakteriologie O. Bd. 32, p. 60.
10. W. Gaethgens. Centralblatt f. Bakteriologie, O. Bd. 48, p. 223.
11. Y. Fukuhara. Zeitschrift f. Immunitätsforschung, Bd. 2, p. 305.
12. W. Gaethgens. Zeitschrift f. Immunitätsforschung, Bd. 4, p. 559.
13. S. Amiradzibi en Kaczynski. Zeitschrift f. Immunitätsforschung, Bd. 6, p. 694.
14. M. Müller. Zeitschrift f. Immunitätsforschung, Bd. 3, p. 401.
15. J. Bordet. Annales de l'Institut Pasteur, T. 10, p. 193.
16. — Annales de l'Institut Pasteur, T. 13, p. 230.
17. Wright. Biochemical Journal 18.
18. E. Friedberger en T. Ikeda, Klinische Wochenschrift 1925, p. 2149.
19. T. Ikeda. Zeitschrift f. Immunitätsforschung, Bd. 49, p. 481.
20. Landsteiner en Uhlirz. Centralblatt f. Bakteriologie, O. Bd. 40, p. 265.
21. Von Dungern. Centralblatt f. Bakteriologie, Bd. 34, p. 355.
22. Ph. Eisenberg. Centralblatt f. Bakteriologie, Bd. 31, p. 773 (autoreferaat).
23. P. Th. Müller. Münch. med. Wochenschrift, Bd. 44, p. 272.

24. *Hektoen*. The Journal of the American Medical Association 1918, 70, p. 1273
25. *M. Nicolle, E. Césari en E. Debains*. Annales de l'Institut Pasteur, T. 34, p. 149.
26. *K. Landsteiner en St. Welecki*, Zeitschrift f. Immunitätsforschung, Bd. 1, p. 193.
27. *C. M. Downs en K. Goodner*, Journal of infectious Diseases 1926, 38, p. 240.
28. *V. Henri en Girard-Mangin*. Comptes rendus de la Soc. de Biologie 1904, 56, p. 866, 931—936, 974.
29. *H. Sachs*. Zeitschrift f. Immunitätsforschung, Bd. 31, p. 371.
30. *K. Landsteiner en Stankovic*. Centralblatt f. Bakteriologie, O. Bd. 41, p. 108.
31. — Centralblatt f. Bakteriologie, O. Bd. 42, p. 353.
32. *F. S. Jones*. Journal of experimental Medicine 1927, 46, p. 303.
33. *R. Dujarric de la Rivière en E. Roux*. Comptes rendus de la Soc. de Biologie 1925, IIe deel, 409, 419—471.
34. *Pick*. Hofmeisters Beiträge z. Chemie, Physik u. Pathologie, Bd. 1, p. 351.
35. *Bechhold*. Zeitschrift f. physikalische Chemie, Bd. 48, p. 385.
36. *Neisser en Friedemann*. Münch. med. Wochenschrift, Bd. 51, p. 827.
37. *B. H. Buxton, Ph. Shaffer en O. Teague*. Zeitschrift f. physikalische Chemie, Bd. 57, p. 47—90.
38. *G. S. Shibley*. Journal of experimental Medicine 1926, 44, p. 667.
39. *P. Eisenberg en R. Volk*. Zeitschrift f. Hygiene u. Infektionskrankheiten, Bd. 40, p. 155.
40. *Demees*. La Cellule 24.
41. *Klein*, Centralblatt f. Bakteriologie, O. Bd. 39, p. 303, 438.
42. *F. C. Harrison*. Centralblatt f. Bakteriologie, O. Bd. 30, p. 115.

INHOUD

	Bladz.
Inleiding	9

HOOFDSTUK I.

Historisch overzicht en stand van het vraagstuk . . .	11
Theorie van Paltauf-Nicollé. Verschillen tusschen precipitatie en agglutinatíe. Theorie van Bordet.	
Werkhypothese	18

HOOFDSTUK II.

Algemeene techniek der onderzoeken	19
Eerste gedeelte: precipitatietechniek. Bereiding van caseïne. Techniek der precipitatie-reactie. Natroebelen der sera. Toepassing mengmethode.	
Tweede gedeelte: adsorptietechniek. Suspensie- en sol-precipitatie. Adsorptie van eiwitten aan suspensies. Adsorptie van caseïne. Adsorptie van paardeserumeiwit.	

HOOFDSTUK III.

Over sol-precipitatie, vergeleken met precipitatie van suspensies	32
Eerste gedeelte: precipitatie van colloïdaal opgelost antigeen. Chemische kenmerken der precipitatie-reactie. Antigene eigenschappen van caseïne en paardeserum. Bepaling optimale anti-geen-concentratie.	
Tweede gedeelte: precipitatie van gesuspendeerd antigeen. Caseïne gebonden aan kaoline, proeven. Proeven met harsen. Caseïne-mastix en caseïne-colophonium. Typhus-colophonium. Proeven met paardeserum. Zinkstearaat.	

HOOFDSTUK IV.

Ongelijkzijdig optreden en verdwijnen van sol- en suspensie-precipitatie	58
Vergelijking caseïne en caseïne-colophonium. Verhitting van anti-caseïnesera. Proeven met zinkstearaat.	

HOOFDSTUK V.

Enkele fysisch-chemische gegevens over precipitatie	72
Physische chemie der agglutinatie. Invloed van zouten op de precipitatie. Gelijktijdige werking van verschillende kationen. Proeven met verdunde zoutoplossingen. Onspecifieke reacties.	
Samenvatting	84
Litteratuurlijst	87

STELLINGEN

I.

Tegenover een enkelvoudig antigeen wordt in elk afzonderlijk geval slechts één enkele antistof gevormd.

II.

Het gebruik van haemolytische of opalescente patiëntensera voor de reactie van *Wassermann* is af te keuren.

III.

Besmetverklaring van havens wegens pest moet geschieden dadelijk, nadat aldaar rattenpest is geconstateerd.

IV.

De differentieel-diagnose tusschen pokken en waterpokken zal in de practijk in Nederland moeten worden gesteld op de verspreiding der eruptie.

V.

Het ontstaan van encephalitis na vaccinatie met koepokstof, wordt door den leeftijd van het geënte kind beïnvloed.

VI.

Niet alle deficiëntieziekten kunnen worden verklaard, alléén door gebrek aan vitaminen.

VII.

Bij het gonorrhöisch prostata-absces grijpe men chirurgisch in, langs perinealen weg.

VIII.

Het zelden voorkomen van dementia paralytica bij Inlanders kan een oorzaak vinden in het feit, dat malaria in sterke mate endemisch heerscht in Indië.

IX.

Influenza en verkoudheid zijn aandoeningen, uit wier epidemiologische verschillen geen afwijkingen ter zake van haar aetiologie kunnen worden afgeleid.
