



Actieve onvatbaarmaking tegen tetanus

<https://hdl.handle.net/1874/299632>

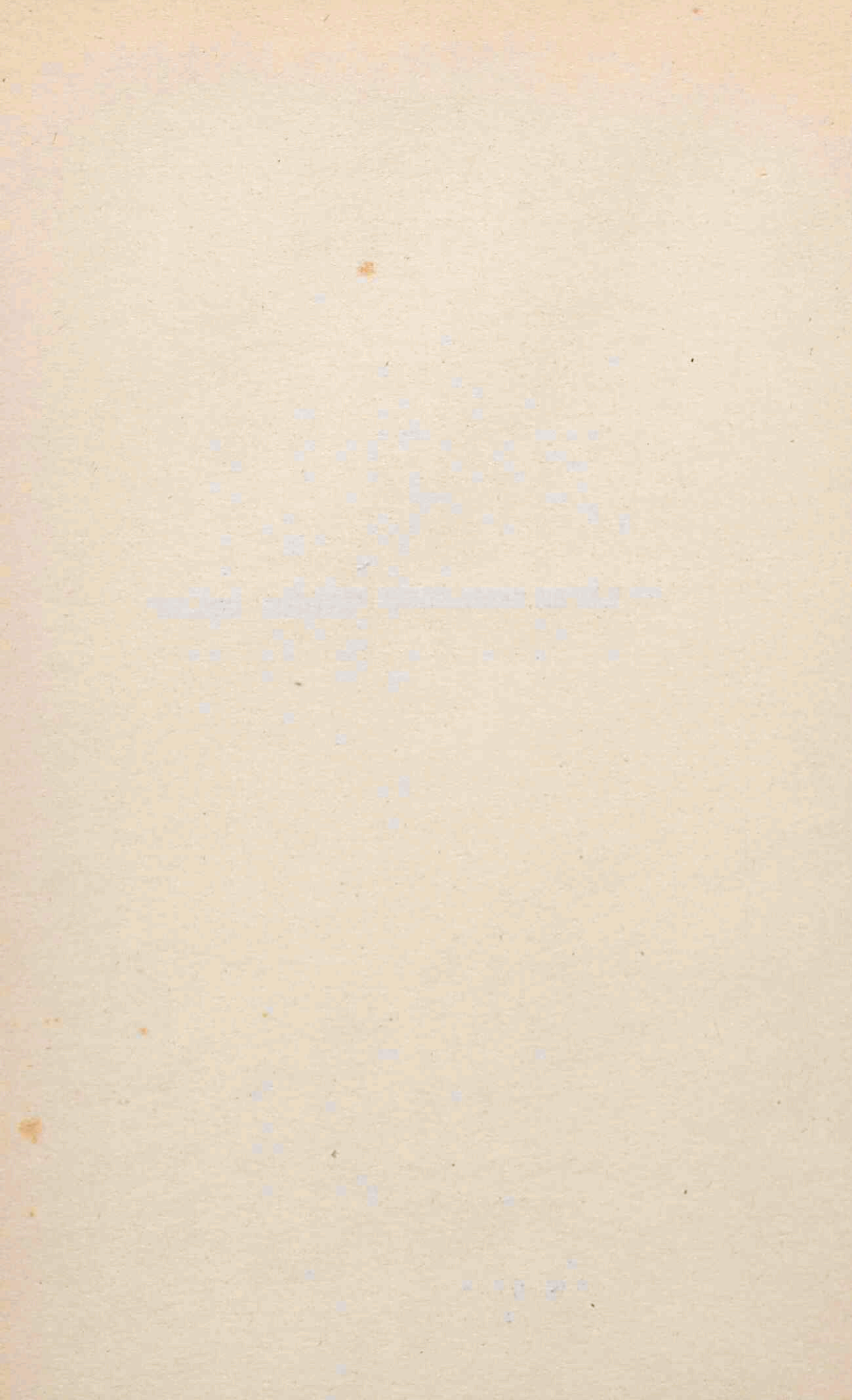
Ag. 192, 1931

ACTIEVE
ONVATBAARMAKING
TEGEN TETANUS

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
BTRE

Sj. P. BOTENGA

ACTIEVE ONVATBAARMAKING TEGEN TETANUS



ACTIEVE ONVATBAARMAKING TEGEN TETANUS

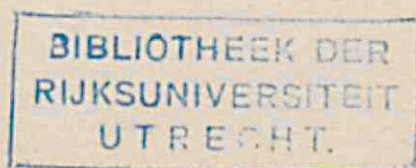
PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN
GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE
AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT
OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS
JHR. MR. B. C. DE SAVORNIN LOHMAN HOOG-
LEERAAR IN DE FACULTEIT DER RECHTS-
GELEERDHEID VOLGENS BESLUIT VAN DEN
SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE
BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER
GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN OP DINSDAG
19 MEI 1931 DES NAMIDDAGS TE 5 UUR DOOR

SJOERD PIETER BOTENGA

ARTS OFFICIER VAN GEZONDHEID
GEBOREN TE ZUTFEN



VAN GORCUM & COMP. N.V.
UITGEVERS
ASSEN



AAN DE NAGEDACHTENIS VAN MIJN VADER

VOORWOORD.

Bij het verschijnen van dit proefschrift is het mij een welkome taak U, Hoogleeraren, oud-Hoogleeraren en Docenten der Medische en Philosophische Faculteiten te Leiden en voorts U allen, die tot mijne medische vorming hebt bijgedragen, te bedanken voor het van U genoten onderwijs.

Hooggeleerde ALDERSHOFF, hooggeachte Promotor, veel dank ben ik U verschuldigd voor alle moeite en tijd, die gij U gegeven hebt bij de totstandkoming van dit proefschrift. Uw uitgebreide kennis, de prettige wijze in Uwe belangstelling hebben den tijd, op Uw Instituut doorgebracht, tot één der aangenaamste van mijn leven gemaakt.

Hoogedelgestrengte VAN REEKUM, niet alleen waart gij één der eersten, die den stoot gaf tot de wording van een proefschrift, maar tevens is Uwe naam door Uwe ongekrompen opmerkingen en raadgevingen onverbreekbaar aan dit werk gebonden. Moge ik ook in de toekomst steeds op Uw zeer gewaardeerden steun blijven rekenen.

Zeergeleerde Pondman, Tasman en Brandwijk, de bereidwilligheid waarmede gij mij over moeilijkheden heenhielpt, Uwe vriendschappelijke omgang stemt mij tot dankbaarheid.

De inspectie van den Militair Geneeskundigen Dienst, voor de bereidwilligheid, waarmede gij mij in de gelegenheid steltet dit proefschrift te voltooien, ben ik U dank verschuldigd.

Het personeel van het Rijks Serologisch Instituut in 't bijzonder U, THEO VAN DE VATHORST en verder allen, die Uwe medewerking hebt betoond, dank ik voor den mij bewezen dienst.

INLEIDING.

HISTORISCH OVERZICHT.

Uit de literatuur der afgeloopen wereldoorlog (F. STRICKER¹ en W. HOFFMAN²) blijkt het aantal tetanusgevallen vooral in het begin veel grooter dan in één der oorlogen voordien. De oorzaak moet gezocht worden in de groote verandering, die het gevechtswapen ondergaan had. Het in den grond dringend en daar detoneerend projectiel maakte als treffer scheurwonden, die in eerste instantie al verontreinigd waren met aarde etc., beide voorwaarden ter begunstiging van de vegetatie van den tetanusbacil.

Daar we op goeden grond mogen aannemen, dat dergelijke verontreinigde wonden ook in een toekomstigen oorlog zullen overheerschen, doet ons dit à priori al besluiten, dat iedere wond op besmetting met tetanus verdacht zal zijn en dus als zoodanig behandeld zal dienen te worden. Het is algemeen bekend, dat wanneer het tetanusgif eenmaal gebonden is aan de daarvoor gevoelige elementen in casu het zenuwweefsel, het slechts met groote moeite en op voor de vitaliteit van dit weefsel ingrijpende wijze weer vrij kan worden gemaakt. Een zeker afdoende genezing van eenmaal manifeste tetanus behoort aldus tot de groote uitzonderingen en open vragen. Het verhinderen van tetanus en alle gevolgen van dien heeft men dus in een prophylactisch optreden te zoeken.

Tot vóór eenige jaren bepaalde men zich overal tot de zoogenaamde prophylactische seruminjectie; door deze inspuiting werden in het lichaam onmiddellijk de immuunstoffen gebracht. Echter kleven aan deze injectie vele bezwaren. De aanwezigheid van dit soortvreemde, zoogenaamde passieve eiwitlichaam (men late in het midden in hoeverre dit zelf het antilichaam of de drager ervan is) is zooals van alle vreemde eiwitten niet duurzaam. Na eenigen tijd, tien tot twintig dagen, afhankelijk van de dosis, en van de diersoort waarvan het afkomstig is, wordt het, met het eraan gebonden antitoxine, weer uitgescheiden. Dit is oorzaak, dat er in weerwil van de, met het oog op de bovengenoemde

frequentie der tetanusgevallen aanbevolen seruminjectie, nog zoovele gevallen van zoogenaamde *tétanos post sérique* voorkwamen. Op aanraden van VAILLARD³ is men toen overgegaan tot een herhaling der inspuiting, desgewenscht inspuitingen om de 6 à 7 dagen (ASCHOFF en ROBERTSON). De werkzaamheid van deze herhaalde injecties wordt echter verminderd, doordat het lichaam door de voorgaande inspuitingen zoogenaamd gesensibiliseerd, in staat is, dit vreemde eiwit met deze antistoffen in steeds sneller tempo te elimineeren.

Bij de herhaalde seruminjectie dreigen daarnaast, hoewel zeer zeldzaam, nog overgevoeligheidsverschijnselen van veel ernstiger aard; zelfs doodelijk: anaphylatische shock, terwijl ook de enkelvoudige inspuiting niet geheel als onschadelijk is aan te zien in verband met het optreden van de *primaire serumziekte*.

Al deze momenten drongen dus in de richting van een andere meer afdoende bestrijding van den tetanus: een actieve onvatbaarmaking. Daarbij maakt het lichaam zijn eigen immuunstoffen; er ontstaat een *humorale* immuniteit (aanwezigheid van antistoffen in de lichaamsvochten) en een *cellulaire* (de *réactivité acquise*: op de specifieke prikkel of misschien ook op de niet specifieke - krijgt men een sterke vorming van antilichamen: zoogenaamde „*bond antitoxique*”). Echter kan deze de seruminjectie niet geheel verdringen, daar voor het tot stand komen van de actieve onvatbaarheid een zekere tijd noodzakelijk is. *Waar onmiddellijk in het zich actief immuniseerende of geïmmuniseerde lichaam de aanwezigheid van het tetanus antilichaam gewenscht is, heeft men naar de seruminjectie te grijpen!*

Als vaccin kan het gif als zoodanig niet gebruikt worden; de ziekmakende resp. doodelijke dosis ligt te dicht bij de immuniseerende,

Reeds EHRLICH heeft bij het diphtherietoxine er op gewezen, dat toxiciteit en antitoxine-binding niet parallel gaan en daarmede den weg aangeduid langs welken een actieve onvatbaarheid zich ontwikkelen kan, zonder dat dit enig gevaar mede brengt voor het individu.

Zooals bekend onderscheidde men volgens EHRLICH in elk bacterieel gif de zoogenaamde toxoïden, d.w.z. stoffen, die wel in staat zijn om antitoxinen te binden (zouden wel een

haptophore groep bezitten) maar hun giftigheid (toxophore groep) ingeboet hebben. Op grond van het feit, dat bij het bewaren van een toxine-oplossing de toxische eigenschappen in veel sterkere mate afnemen dan het antitoxine-bindend-vermogen moet men aannemen, dat bij dit proces de toxoïd-lichamen zich vermeerderen ten koste van de toxine-stoffen. Deze overgang is bij de verschillende bacterieele gifstoffen in wisselende mate aanwezig, zoo weten we dat b.v. het tetanustoxine zeer sterk neigt tot toxoïden vorming.

Is het dan verwonderlijk, dat het tetanusgif een der eerste was, dat gebruikt werd om daarmee de omzetting van gifstof in toxoïde stoffen te bevorderen, daarbij het toxoïd beschouwend als een prachtig middel ter immunisatie?

Na zijn uitgebreide proeven over het diphtherietoxine heeft BEHRING⁴ het tetanusgif bewerkt met goudzouten en joodtrichloride. Daarna heeft hij in samenwerking met KITASHIMA en RANSOM zuren, alkaliën, desinfectiemiddelen, kleurstoffen, edelmetalen, kool, dierlijk weefsel en orgaandeelen er mede in contact gebracht. Hij zag bij zijne „abgeschwächte” giften, dat de ziekmakende dosis meer neiging had constant te blijven, terwijl de doodelijke steeds toenam: z.g. groter worden der „D-Werth”. De omzetting duurde echter lang, de giftigheid (directe gifwaarde) ging sterk achteruit, maar niet geheel verloren, het antitoxine-bindendvermogen (indirecte gifwaarde) ging eveneens sterk achteruit.

In de literatuur is een geval bekend van volkomen ongiftigheid van tetanustoxine door behandeling met zwavelkoolstof door EHRLICH, terwijl het antigeenvermogen is blijven bestaan. Daarna is dit altijd een mislukking gebleken. LÖWENSTEIN kon langs dezen weg bij proefdieren een late en een descendeerende tetanus verkrijgen.

In 1902 heeft LÖWENSTEIN⁵ het werk van VON BEHRING nagedaan en verder voortgezet. Door toevoeging van waterstof- of calciumsuperoxyd was het mogelijk zoowel diphtherie als tetanusbouillon en -filtraat volkomen ongiftig te maken. Het aldus behandelde tetanustoxine kon echter geen antitoxinen meer binden (in het neutrale mengsel kwam het antitoxine vrij) terwijl er mede ingespoten muizen geen spoor van immuniteit vertoonden. Hij kwam dan ook tot het resultaat, dat het toxine in al zijn drie bekende eigenschappen vernietigd werd: toxiciteit, antitoxinebindendvermogen en

antigeenvermogen. In 1899 had BEHRING al opgemerkt, dat het diffuse daglicht een geheel andere werking op het tetanustoxine uitoefent dan het verwarmen op b.v. 65°. De giftigheid van het toxine verminderde, de bindende eigenschap bleef bestaan. In zijn eigen onderzoekingen over den invloed van het diffuse daglicht op het tetanustoxine citeert LÖWENSTEIN⁶ de hierop betrekking hebbende passage, terwijl hij daar tevens neerschrijft: „In den sehr umfangreichen Arbeiten von BEHRING über den Tetanus finden wir eine Beobachtung ganz scharf gefasst, die für den weiteren Gang meiner Untersuchung vom ausschlaggebender Bedeutung hätte sein müssen, wenn ich sie nicht übersehen hätte.”

De grondgedachte van het geheele werk van LÖWENSTEIN is geweest een „Schonende” methode te vinden, waarbij dus de directe gifwaarde vermindert en de indirecte behouden blijft. Aldus kwam hij er toe in Januari 1904 tetanustoxine met verschillende desinfectantia aan het daglicht bloot te stellen. De flesch alleen, die met 2⁰/₀₀ formaline voorzien was, bleek na $\pm$ 8 maanden een volkomen giftvrij „toxine” te bevatten. Bij verder onderzoek bleek er een zekere inductieperiode aanwezig; is deze eenmaal overschreden, dan gaat de ontgifting veel sneller. Daar men met het veel heftiger werken de zonlicht afhankelijk was van meteorologische factoren, werd Nernstlicht aangewend. Echter kon men niet op deze wijze een volkomen verdwijnen van de toxiciteit verkrijgen. Omdat ten duidelijkste gebleken was, dat formaline de werking van het zonlicht ondersteunde, werden 1⁰/₀₀ formaline-gifoplossingen onder de Nernstlamp gehouden. Allereerst krijgt men een verlenging van den incubatietijd, als men de doodelijke dosis bij een proefdier inspuit. Deze is echter voor een groot gedeelte voor rekening van de formaline te stellen. Bij nader onderzoek bleek het witte licht minder uitwerking te hebben dan de daarin aanwezige roode stralen, zoodat de laatste als de effectieve dienden aangemerkt en een remmende werking aan de stralen van kleinere golflengte moest worden toegeschreven. Bij grooter worden van de lichtbron zagen ze althans in het begin de omzetting van het toxine langzamer gaan, wat ze verklaren doordat de remmende invloed van de niet-roode stralen toegenomen is.

Met al deze proeven kwam LÖWENSTEIN tot het inzicht, dat zoowel formaline als licht beide noodig waren voor de

ontgifting; over de chemische processen, die het licht te voorschijn roept kan hij echter niets mededeelen.

Terwijl eigenlijk BEHRING de vraag van een actieve tetanus-vaccinatie nergens aanroert, omdat hij met geen zijner stoffen een volkomen ongiftigheid van het toxine, zonder dat het bindingsvermogen sterk geleden had, had kunnen verkrijgen, kon LÖWENSTEIN integendeel met zijne aan het zonlicht blootgestelde formoltoxinen muizen en nog gemakkelijker caviae immuniseeren. Hier wordt dus de grondslag gelegd voor de latere meer uitgewerkte vaccinaties met formoltoxoiden. LÖWENSTEIN merkte tevens al op, dat de beste entstoffen zich laten bereiden uit de sterkste toxinen.

In 1910 zette LÖWENSTEIN zijn werk met EISLER⁷ voort. Uit de drie kleurenproef was gebleken, dat de warmte (roode) stralen verantwoordelijk waren voor de ontgifting, nu toonden beiden aan, dat bij toxine-oplossingen in 14 dagen bij 37° een volkomen ongiftigheid te verkrijgen was. Als optimum werkende formolconcentratie werd 2 à 3⁰/₁₀₀ aanbevolen. Het eenmaal ongiftige formoltoxine werd nooit meer giftig, het was in staat antitoxinen te verwekken, antitoxinen te binden.

RAMON heeft feitelijk deze formoltoxoiden nader bestudeerd. Hij wees er op, dat er door het in contact brengen van tetanustoxine met formaline niet ontstaat maar één of andere toxoïde, maar een zeer *bijzonder toxoïd*, dat hij daarom *anatoxine* genoemd heeft. Hij stelt dan ook aan deze anatoxine eenige eischen. 1° volkomen ongiftigheid, 2° vermogen om als antigeen op te treden, 3° stabiliteit tegen invloeden, die het oorspronkelijke toxine zouden vernietigen. Tevens heeft RAMON aangetoond, dat evenals het toxine met zijn overeenkomstig antitoxine uitvlokkingen geeft bij het zoogenaamde neutrale punt, het anatoxine dit eveneens deed. Bij bekend toxine kan men aldus het antitoxine in vitro titreeren en omgekeerd. Het anatoxine is daarnaar in de grootte van zijn binding ten opzichte van zijn overeenkomstig antitoxine af te lezen en zodoende in zijn antigeenvermogen te waardeeren. Hoe groter namelijk de mogelijkheid van antitoxine-binding, des te beter antigeen en dus des te beter vaccin.

Op aanraden van RAMON heeft DESCOMBEY⁸ naar analogie van het diphterie-anatoxine het tetanus-anatoxine nader

onder de oogen gezien. Het tetanustoxine, waarvan hij uitging had een d.l.m. cavia 1 : 10.000 in 4 dagen. Dit heeft hij blootgesteld aan warmte en formaline. Het daaruit ontstane anatoxine vlokke in de zelfde verhoudingen als het oorspronkelijke toxine, echter was de uitvlokkingstijd er van verlengd. Tevens vond hij dat het antigeenvermogen in de dierproef van twee anatoxinen met dezelfde A.W. (antigeenwaarde) omgekeerd evenredig was met den duur van de uitvlokking. Resultaat van deze onderzoeken was, dat hij reeds de mogelijkheid voorzag het tetanusanatoxine te gebruiken om huisdieren te vaccineeren.

Scherper gesteld vinden we deze gedachte van de hand van RAMON in de Annales de l'Institut Pasteur 1925 blz. 20.

„Nous sommes donc en possession d'une méthode générale permettant de transformer à volonté les antigènes les plus toxiques en antigènes inoffensifs, ou, comme nous les avons appelés en „anatoxines” dont le pouvoir immunisant peut être facilement évalué en *vitro* par la réaction de flocculation et qui peuvent être utilisés soit dans le domaine expérimental, soit encore et surtout dans la thérapeutique préventive et même curative de certaines maladies de l'homme et des animaux”.

Bij verder onderzoek over de ontwikkeling van het 2‰ formoltoxine tot anatoxine bleek DESCOMBEY⁹, dat de eigenschap van het formoltoxine om late en algemeene tetanus te geven slechts op den duur verdwijnt. Hij stelt dan ook de eisch, die verder steeds in de Fransche literatuur wordt vooropgezet: dat men dan pas van anatoxine mag spreken als 5 tot 10 c.c. er van onderhuids bij een cavia van $\pm$ 300 gr. ingebracht, noch lokale, noch algemeene, noch vroege of late tetanus geeft. Dit was bij het toxine bovenvermeld, dat DESCOMBEY gebruikte na 20 dagen verblijf in de broedstoof bij 37° het geval. Dat ten opzichte van de tijdsduur, noodig om een toxine om te vormen tot anatoxine geen scherpe uitspraak te doen is, springt duidelijk in het oog. Afgezien van de quantiteit formaline en de temperatuur waarbij men het toxine bewerkt, zal de oorspronkelijke giftigheid van het uitgangstoxine in de eerste plaats wel van invloed zijn. Bij mijn eigen overeenkomstige onderzoeken, die echter met veel sterker toxinen plaats vonden, is het mij dan ook nooit gelukt om in 20 dagen bij 2‰ en 37° een

volkomen ongiftigheid te verkrijgen, zoodat ik ten slotte bij 40 graden en 3 à 4 ‰ formaline een vrij snel (20 dagen) zich vormend anatoxine kon verkrijgen dat goed immuniseerde. Exacte waarden kan ik hieromtrent niet mededeelen, daar ik in het algemeen slechts met een anatoxine no. 80 experimenteerde (zie hoofdstuk II).

Ook LEMOS MONTERIO¹⁰ kon met zijn toxinen waarover hij zich verder niet uitlaat, zelfs na vele maanden bij 37° en 1.5‰ formaline geen volkomen ongiftigheid verkrijgen. Met meer formaline, 5‰, kon hij in minder dan 15 dagen goede antigenen krijgen, deze gaven ingespoten bij paarden immuniteit en hyperimmuniteit.

DESCOMBEY vond verder, dat hoe langer het verblijf in de broedstoof was, des te langer werd de uitvlokkingstijd en dus volgens reeds vroeger opgedane ervaringen des te kleiner antigeenvermogen; vandaar niet te weinig formaline of genoeg formaline om de giftigheid in niet te langen tijd te verminderen en toch de antigeeneigenschappen zoo weinig mogelijk te schaden (RAMON). Na één injectie van 1 c.c. van zijn anatoxine zag DESCOMBEY al na twee à drie weken bij caviae weerstand tegen verscheidene d.l.m. Hier ziet men duidelijk de enorme verschillen met de Joodtoxinen, zooals OKUDA¹¹ gebruikte. Deze laatste kon met 3 maal een injectie van 1 à 5 cc. een immuniteit tegen één d.l.m. verkrijgen bij caviae.

Het gelukte DESCOMBEY om paarden in 2 à 3 weken met dit anatoxine door 2 injecties van 15 à 20 c.c. een hyperimmuniteit te verschaffen, zoowel tegen experimenteele vergiftigingen als tegen de natuurlijke infectie. Het bleek hem, dat een paard ingespoten met 20 cc. anatoxine als één injectie, niet in staat was om 2 à 3 weken daarna, het inbrengen van een houtsplinter die in een 3 maanden oude tetanuscultuur gedoopt was, zonder doodelijke tetanus te verdragen. Een ander paard daarentegen, dat slechts één injectie van 10 c.c. anatoxine had gekregen, weerstond deze infectie, zoodat DESCOMBEY zeer terecht wijst op de groote individueele verschillen, die te voorschijn treden als men dieren tegen tetanus immuniseert.

RAMON heeft met DESCOMBEY¹² zijn onderzoekingen uitgebreid. Naar analogie van het feit, dat tapioca met tetanustoxine gemengd meer immuniteit geeft dan het toxine alleen,

vonden ze, dat tapioca ook het antigeen-vermogen van het anatoxine vermeerderd. Ze berichten zelfs, dat de humorale immuniteit 10 à 20 maal zich vergroot, zelfs tot 50 maal, waardoor aldus een weg wordt gewezen om snel en economisch paarden te hyperimmuniseeren.

Het was RAMON¹³ opgevallen, dat wanneer hij een absces zag ontstaan op de plaats, waar het tetanusanatoxine was ingebracht, het gehalte aan antistoffen plotseling zeer toenam in het bloed. Hij heeft toen kunstmatig getracht om huidreacties en abscessen te krijgen met verschillende stoffen, o.a. broodkruimels met het te verwachten resultaat.

Al deze factoren maken het verblijf van het anatoxine op de inentingsplaats langer en hierin moet waarschijnlijk de oorzaak gezocht worden, dat ook de wijze van toedienen van het anatoxine de waarde der humorale immuniteit beïnvloedt. Zoo vonden RAMON en DESCOMBEY¹⁴ dan ook, dat het subcutaan inbrengen van het anatoxine veel meer antistoffen te voorschijn kon roepen dan wanneer dezelfde hoeveelheid intramusculair werd ingespoten. Later zijn deze uitkomsten door GRASSET¹⁵ bevestigd en uitgebreid. Bij subcutaan en intracutaan inbrengen zag deze onderzoeker verder geen verschil in de waarde der immuniteit bij caviae. In verband met de grootere hoeveelheid moet echter de onderhuidsche inspuiting aangeprezen worden. Bij caviae, waarbij hij gedurende vier dagen om de tien uur vernieuwd een compres met tetanusanatoxine op de huid aangebracht had, zag hij geen spoor van antitoxine in het serum, noch een plaatselijke immuniteit bij het inbrengen van de d.l.m. daar.

Over het verloop van de immuniteit kon DESCOMBEY¹⁶ mededeelen, dat bij paarden, die 2 maal 5 cc. van zijn anatoxine hadden gekregen, er een stijging in het antitoxinegehalte optrad en gedurende 6 maanden aanhield. Na een jaar zou de titer van het bloed gedaald zijn tot die van een paar weken na de tweede injectie (neutralisatie mogelijkheid van 2 d.l.m. cavia cc. serumweerstand tegen de dodelijke tetanusinfectie). Met een nieuwe injectie (injection de rappel) zag hij¹⁷ een groote plotselinge stijging. Na eerst samen met ZOELLER het diphtherieanatoxine gemengd te hebben met een ander vaccin hebben RAMON en ZOELLER¹⁸ caviae ingespoten met mengsels van tetanusanatoxine en vaccin T.A.B. (typhus, paratyphus A. en B.) en andere anatoxinen (vaccins associés). Zij zouden

een enorme vermeerdering gezien hebben van het antitoxinegehalte en trachtten dit verschijnsel te verklaren door het toegevoegde vaccin te beschouwen als een aspecifieke prikkel. Van een immuniteit tegen typhus, paratyphus A en B wordt niet gesproken. Daarna heeft RAMON¹⁹ samen met L. NATTAN-LARRIER en GRASSET het vraagstuk van de niet-specifieke prikkel toegevoegd aan de specifieke van het tetanus-anatoxine, nader uitgewerkt met verschillende stoffen, waarvan o.a. van belang zijn om te vermelden het trypoxyl, respect. tryparsamide.

Door een mengsel van tetanusanatoxine en trypoxyl in te spuiten bij met slaapziektekiemen geïnfecteerde ratten, zagen ze dat er niet alleen een sterke vermeerdering was van het antigeenvermogen van het anatoxine, maar tevens de werking van het chemotherapeuticum behouden bleef.

Het beschermen van paarden en andere huisdieren tegen de tetanusinfectie als practisch gevolg van alle boven beschreven onderzoekingen, is uitvoerig uitgewerkt door RAMON en DESCOMBEY²⁰. Ten eerste konden deze onderzoekers vóór de behandeling nooit een spoor antitoxine bij hunne proefdieren vinden en vervolgens bleek hun, dat niet alleen tapioca de eigenschap had het antigeenvermogen van het anatoxine te vergrooten, maar dat de nu gevormde immuniteit veel standvastiger bleek, namelijk zeer langzaam vermindert, zoodat bij deze wijze van vaccineeren pas na 2 à 3 jaar een hernieuwing van een anatoxineinjectie noodig was om het dier met het oog op zijn immuniteit op een bepaald niveau te houden (grond immuniteit).

Na deze belangrijke successen met het tetanusanatoxine bij huisdieren publiceerden de Franschen al spoedig hunne poging tot onvatbaarmaking van menschen. Als bijzonderheid zij hier vermeld, dat tijdens den wereldoorlog in 1917 door VALLÉE en BAZY met mengsels van tetanustoxine en gram-oplossing (2 deelen toxine en 1 deel jodiumoplossing, bestaande uit 1 deel jodium en 2 deelen joodkali en 200 deelen water) getracht is menschen te vaccineeren tegen tetanus, echter zonder resultaten. Later is door OKUDA de samenstelling van deze joodtoxinen gewijzigd (1 deel toxine en 1 deel jodiumoplossing) omdat hij met de voorgenoemde een enttetanus zag ontstaan. Het groote bezwaar van deze gemodificeerde tetanusgiften is echter hun groote labiliteit, zoodat ze eigenlijk

onmiddellijk na hunne bereiding gebruikt moeten worden, en hun gering antigeen-vermogen. Ook ROUX en MARTIN konden na hunne experimenten geen algemeen gebruik aanraden van joodtoxinen. RAMON en ZOELLER²¹ hebben het eerst met formoltoxoiden in casu tetanusanatoxine menschen gevaccineerd. De groote moeielijkheid blijft altijd de beoordeeling der immuniteit, daarer niet zooals bij diphtherie een huidreactie (SCHICK) is, die ons kan inlichten over de aanwezigheid van tetanusantitoxine respect. mogelijkheid van deze snel te kunnen vormen (*réactivité acquise*). Nadat RAMON en ZOELLER de ongiftigheid van hun tetanusanatoxine hadden nagegaan (zie Descombey's eisch hier omtrent blz. 14) hebben ze allereerst verdunningen van het anatoxine ingespoten en zagen hiervan nooit enig bezwaar. Daarna is het hun gelukt, nadat ze steeds vóór de vaccinatie het serum van hun proefpersonen hadden nagegaan op de aanwezigheid van tetanusantitoxinen en daarin nooit een spoor hadden gevonden, jongelingen met drie injecties van 1 à 2 cc. onverdund tetanusanatoxine in vijf à zes weken een humorale immuniteit te bezorgen, dusdanig, dat het serum in staat was per cc. verscheidene d.l.m. cavia te neutraliseeren. Deze feiten zeggen echter in zooverre betrekkelijk weinig, omdat men niets kan zeggen van de hoeveelheid antitoxine die noodig is ter neutralisatie van een d.l.m. cavia van een willekeurig toxine.

Verwonderd staat men echter over de uitgebreidheid van het menschen materiaal, dat gevaccineerd is door het INSTITUUT PASTEUR tegen tetanus hetgeen men moet afleiden uit het feit dat RAMON en ZOELLER geen verschillen bij tetanusenting bij verschillende rassen opmerkten. Is deze conclusie gerechtigd, dan moeten hier niet eenige, maar vele personen volgens eenzelfde schema met het tetanusanatoxine zijn geënt (zie mijne sterk varieerende uitkomsten met eenige menschen). Ook zagen ze²² een sterke vermeerdering van de antitoxische titer van het bloed, als ze het tetanusanatoxine mengden met een microben vaccin (het verhitte T.A.B. of het lipo-vaccin), met een ander anatoxine, met toxinen!!! (b.v. streptococcen).

Maar nog een gewaagde factor blijkt zeer zeker bij hunne vaccinaties wanneer we lezen, dat zelfs bij zieke menschen geen verandering in het verloop en waarde van de immuniteit ontstond. Ten slotte komen ze tot de gevolgtrekking, dat

bij een van tetanusinfectie verdacht persoon vóór de tweede anatoxineinjectie, een seruminjectie als „méthode d'urgence" is aangewezen. Eigenaardig is, dat waar de Fransche onderzoekers groot succes toeschrijven aan het simultaan immuniseeren (zie hoofdstuk III), hier juist geen melding gemaakt wordt van een gelijktijdig inspuiten van anatoxine en antitetanus-serum.

Uit verdere onderzoekingen bleek RAMON en ZOELLER²³, dat na een jaar nog een onvatbaarheid bestond, dusdanig, dat één cc. serum in staat was 20 à 100 d.l.m. cavia te neutraliseeren. Een hernieuwing der injectie en serum onderzoek na een jaar gaf de neutralisatiemogelijkheid van $\pm$ 1000 d.l.m. cavia per cc. Het serum van de jonge menschen, die vóór 2 jaar de laatste anatoxine injectie gehad hadden, bleek nog per cc. meer dan 10 d.l.m. cavia te neutraliseeren.

Nadat door NATTAN—LARRIER, RAMON en GRASSET²⁴ vastgesteld was, dat na inspuiting met anatoxine, onmiddellijk na de conceptie en tijdens de zwangerschap van konijnen en caviae, het serum van moeder en pasgeborene na het werpen ongeveer gelijke hoeveelheden antitoxine bevatte, zagen ze bij pasgeboren kinderen een veel kleinere immuniteit aanwezig dan bij de oorspronkelijk gevaccineerde moeder. Deze immuniteit is voor de jongen een passieve en verdwijnt dus, echter pas na $\pm$ twee maanden, omdat het hier antitoxine geldt, die gebonden zijn aan homolog eiwit. Van hunne tetanusanatoxineinjecties, die ze in verschillende stadia der graviditeit(!) aanwendden, zagen ze niet de minste plaatselijke of algemeene reactie, noch onregelmatigheden in het verloop bij de zwangere vrouw.

Volgens deze feiten is het dus mogelijk het pasgeboren kind te beschermen tegen tetanus, die uitgaat van de navelstreng wonden en is volgens bovengenoemde onderzoekers de vaccinatie tegen tetanus met het anatoxine bij de toekomstige moeder aangewezen in streken waar de tetanus umbilicalis frequent is, zooals in sommige streken van Azië en Afrika.

Het gedrag van antigenen en antilichamen in het zwangere dier is nader onder de oogen gezien door NATTAN—LARRIER, RAMON en GRASSET²⁵. Nadat ze bij het zwangere dier 48 uur vóór het werpen 30 cc. van hun tetanusanatoxine hadden ingespoten, zagen ze nooit een spoor van immunisatie bij

de daarna geborene. Het tetanustoxine bleek bij injectie bij konijnen in het geheel niet, bij caviae ten deele de placenta te kunnen passeeren. Het inspuiten van antitoxine bij het zwangere dier even vóór de partus gaf bij de jongen de aanwezigheid van antitoxine. Blijkens bovenvermelde ervaringen gaan dus zoowel de homologe als de heterologe passieve antilichamen door de placenta heen (selectie van de placenta). Het was verder van belang de doorgankelijkheid voor antigeen en antistof van andere organen na te gaan, of misschien langs anderen weg dan de onderhuidsche inbrenging ook voldoende onvatbaarheid tegen tetanus was te verkrijgen.

Het bleek RAMON en GRASSET²⁶, dat de onbedekte darmwand van den pasgeborene doorgankelijk was voor toxinen en antitoxinen en dat er in aansluiting aan toediening per os van tetanustoxine en -anatoxine een immuniteit ontstond, hoewel veel minder in waarde dan bij onderhuidsche injectie. Al spoedig na de geboorte worden de slijmvliezen met een slijmlaag bedekt, waardoor de spijsverteringssappen gelegenheid krijgen toxinen en anatoxinen te vernietigen; laatst genoemde onderzoekers zagen deze stoffen, in vitro samengebracht met spijsverteerssappen hare toxiciteiten antigeenvermogen (pouvoir flocculant) verliezen. Laat men jonge dieren echter van te voren rundergal, ricinusolie of aloë slikken, dan krijgt men gelijkwaardige uitkomsten als bij den pasgeborene: de gal zou de slijmlaag oplossen, de aloë zal waarschijnlijk de darmwand beschadigen; in beide gevallen zal dus de opname meer mogelijk zijn door het darmslijmvlies. Merkwaardig zijn hunne uitkomsten in zooverre dat reeds 12 dagen na de inbrenging de weerstand tegen een dodelijke dosis tetanusgif aanwezig is. Deze gaf tot 8 à 9 dagen nog sterfte van het proefdier. Uit mijn eigen onderzoekingen kan ik mededeelen, dat bij onderhuidsche inbrenging van anatoxine bij caviae, welke wijze van enten wel meer werkzaam is dan de toediening per os, eerst na 2,5 à 3 weken een weerstand ontstond tegen een dan ingespoten d.l.m. Deze weerstand komt namelijk eerst langzaam en pas later veel sneller (zie hoofdstuk II). Dat door RAMON en GRASSET langs deze wijze per os een dergelijke immuniteit bereikt is, moet men eendeels toeschrijven aan het meerdere antigeenvermogen (maar het tetanustoxine, dat ze gebruikten voor de anatoxine vorming is veel zwakker dan waarover ik de beschikking had) anderdeels aan

het meerdere vermogen van hunne proefdieren om op anatoxine te reageeren met antitoxinevorming. Zoo is wel bekend, dat konijnen, en hiermede experimenteerden laatstgenoemde onderzoekers, zich beter laten immuniseeren dan caviae.

Op gelijke wijze hebben RAMON en ZOELLER getracht menschen te vaccineeren. Zoowel oplossing in physiologische zoutoplossing, als toevoeging van bicarbonas natricus of gal gaf geen resultaat. Al deze feiten hebben echter slechts wetenschappelijke waarde, voor de praktijk gelden de veel betere uitkomsten, die verkregen zijn met de onderhuidsche toediening, waarbij nog komt dat bij bovengenoemde methoden zoo'n groote moeilijkheid schuilt in het aangeven van een juiste doseering.

Volledigheidshalve zij hier nog een onderzoek van DESCOMBEY²⁷ vermeld, die bij caviae intracerebraal tetanus-anatoxine inbracht. Hem bleek, dat men gebonden is aan zeer kleine hoeveelheden, 0,1 cc., waarbij men toch al sterke, zij het voorbijgaande nerveuse verschijnselen krijgt (stupor, excitatie). De uitkomsten waren ten opzichte van de immuniteit niet verschillend van de onderhuidsche inspuiting. Tevens vond hij geen locale immuniteit, in casu van het encephalon tegen het tetanusgif, zoodat hij aan het eind van zijn publicatie zegt: „Il n'y a pas d'immunité acquise contre le tétanos sans antitoxine humorale aisément décelable.”

HOOFDSTUK I.

HET ONTSTAAN VAN IMMUNITEIT DOOR MIDDEL VAN TETANUSANATOXINEINJECTIE(S).

Ter inleiding dienen eenige algemeene opmerkingen over de werkwijze gemaakt te worden. Alle vaccinaties werden verricht met het anatoxine N^o. 80, afkomstig van het toxine 80 (d.l.m. muis 1 : 300.000), dat bereid was door dit gedurende een maand met 4⁰/₀₀ formaline bij 37⁰ te houden. Dat ik bij mijn entingen slechts één anatoxine gebruikte vergrootte de zekerheid der beoordeeling van met deze entstof verkregen immuniteit; hetgeen temeer van waarde is, daar het verschil in individueele gevoeligheid der proefdieren toch al, ook al gebruikt men een groot aantal, een factor van onzekerheid blijft.

De immuniteit, die verkregen werd, werd nagegaan als *humorale* immuniteit door het serum van het gevaccineerde dier te titreeren op antitoxine aldus: $\frac{1}{2}$ cc. van het te onderzoeken serum werd gemengd met $\frac{1}{2}$ cc. physiologische zoutoplossing, waarin tetanustoxine in verschillende hoeveelheid werd opgelost. Dit mengsel werd na $\frac{3}{4}$ uur gestaan te hebben bij kamertemperatuur bij witte muizen in een der achterpooten ingespoten. In het begin van mijne entingen gebruikte ik voor de titratie van het serum mijner proefdieren een toxineoplossing, die onder toluol bewaard werd en daar alle nadeelen van had: sterke modificatie. Het gevolg hiervan was, dat een groot aantal contrôleproeven bij elke titratie moest genomen worden, omdat de d.l.m. van het toxine zeer inconstant was; aan het gemodificeerde toxine met zijn wisselende hoeveelheid toxoiden kwam de binding derzelfde hoeveelheid antitoxine op zeer verschillende wijze tot uiting in de resterende toxiciteit, zoodat de resultaten wel onderling in dezelfde proef maar niet ten opzichte van andere entingen konden vergeleken worden. Het was zoodoende slechts bij benadering mogelijk de immuniteit van verschillende groepen

te vergelijken. Een belangrijke vooruitgang was dan ook de beschikking over een gedroogd tetanustoxine, dat door Dr. PONDMAN bereid was en een d.l.m. muis had van 0.0005 mgr. Het aantal controleproeven was één, hoogstens 2 per proef. De doodelijke dosis bleek mij n.l. steeds voldoende constant en ik kreeg aldus vergelijkbare waarden en een goed overzicht.

Naast deze serumtitraties werd zooals verderop zal blijken, de immuniteit van het geheele geïmmuniseerde dier nagegaan (combinatie van *cellulaire* en *humorale* immuniteit) door het één of meerdere malen zijn doodelijke dosis tetanusgif te geven. Ook hier kwam het voordeel van dit gedroogde toxine weer sterk naar voren: nauwkeurigheid, mogelijkheid van vergelijken en zuinigheid ten opzichte van proefdieren.

Met het tetanusanatoxine N^o. 80 werd nu als volgt gewerkt:

Immuniteit met één injectie.

Waardeering door middel van het bepalen van het anti-toxinegehalte in het serum.

Bij drie groepen van 12 caviae werd rechts van de mediaanlijn de buikhuid geschoren. Een groep van 12 kreeg op deze plaats onderhuids $\frac{1}{2}$ cc. tetanusanatoxine, een tweede groep kreeg op deze plaats 1 cc., het derde 12tal 2 cc. anatoxine. Den volgenden dag was er geen spoor van irritatie op de inspuitingsplaatsen waar te nemen, de algemeene toestand was goed. Gedurende een week werden deze dieren alle zonder eenige verdere behandeling gelaten, daarna werd hartpunctie verricht bij enkele dieren van elke groep. Het serum werd nu van elke groep afzonderlijk nagegaan op de aanwezigheid van tetanusantitoxine op de volgende wijze: zie tabel 1.

Gemengd werd $\frac{1}{2}$ cc. serum met een $\frac{1}{2}$ cc. phys. zoutopl., waarin resp. 1, 2 en 3 d.l.m. muis gedroogd toxine waren opgelost. Deze mengsels werden bij witte muizen van 15 gr. ingespoten in de rechter achterpoot. Een andere muis kreeg als contrôle 1 d.l.m. opgelost in 1 cc. phys. zoutopl. Alle muizen hadden den volgenden dag tetanus in verhouding tot het aantal d.l.m., dat was toegediend en gingen hieraan min of meer snel te gronde.

Na een week blijkt dus, dat geen der geïmmuniseerde

caviae een met deze werkwijze aantoonbare immuniteit verkregen had.

Na *twee weken* werd wederom hartpunctie verricht. Als bovenwerd het serum in hoeveelheid van $\frac{1}{2}$ cc. gemengd met $\frac{1}{2}$ cc. phys. zoutopl. met resp. 1, 2 en 3 d.l.m. muis (gedroogd toxine). Den volgenden dag had het contrôledier (ingespoten met 1 d.l.m.) sterke tetanus, eveneens de muizen, dien 2 en 3 d.l.m. met $\frac{1}{2}$ cc. serum gemengd (steeds van elk der 3 groepen) ingespoten was. „De mengsels” muizen met 1 d.l.m. waren nog vrij, kregen

TABEL I.
RESULTAAT VAN ÉÉN INJECTIE.

Groepen	Injectie	Reactie	PUNCTIE				
			Na 1 week	Na 2 weken	Na 3 weken	Na 4 weken	Na 6 weken
1	$\frac{1}{2}$ cc. tetanus anatox.	geene	—	>0< 1 dlm.	iets <1 dlm.	<4 d.l.m.	<10 dlm.
2	1 cc. tetanus anat.	geene	—	>0< 1 dlm.	2 à 3 dlm.	≥ 8 dlm. <10 dlm.	>20 dlm.
3	2 cc. tetanus anat.	geene	—	>0< 1 dlm.	2 à 3 dlm.	≥ 8 dlm. <10 dlm.	>20 dlm.

Opmerkingen: Van elke *hartpunctie* werden 2 à 3 dieren genomen, eenmaal gepuncteerde caviae werden niet meer voor een 2e punctie gebruikt.

Gelijk met de punctie: serumtitratie. In de tabel is de neutralisatiemogelijkheid per $\frac{1}{2}$ cc. uitgedrukt in dlm. muis gezet.

evenwel in den loop van eenige dagen tetanus, gingen er echter niet aan dood. Een duidelijk verschil tusschen de sera der met verschillende hoeveelheden anatoxine ingespoten caviae was niet aantoonbaar.

Na *drie weken* werden er van elke groep weer caviae gepuncteerd. Er bleek nu een immuniteit te zijn ontstaan, die door titraties duidelijk aantoonbaar was. Terwijl de dieren, die gevaccineerd waren met $\frac{1}{2}$ cc. anatoxine nauwelijks 1 d.l.m. muis konden neutraliseeren per $\frac{1}{2}$ cc. serum, waren de dieren ingespoten met 1 resp. 2 cc. anatoxine in staat 2 à 3 d.l.m. per $\frac{1}{2}$ cc. serum te neutraliseeren.

Na *vier weken* wederom serumonderzoek. De titratie op muizen gaf een stijging van het antitoxinegehalte ten opzichte van de toestand na 3 weken: de dieren gevaccineerd

met $\frac{1}{2}$ cc. anatoxine konden nu 4 d.l.m. per $\frac{1}{2}$ cc. serum nauwelijks neutraliseeren, de dieren die met 1 cc. en 2 cc. anatoxine ingespoten waren 8 à 10 d.l.m. per $\frac{1}{2}$ cc. serum.

Na zes weken konden de caviae die met een $\frac{1}{2}$ cc. anatoxine geënt waren, nog niet geheel 10 d.l.m. muis neutraliseeren per $\frac{1}{2}$ cc. serum; $\frac{1}{2}$ cc. serum van de dieren, die met één resp. 2 cc. anatoxine ingespoten waren, gemengd met $\frac{1}{2}$ cc. phys. zoutopl., waarin 20 d.l.m. muis, gaf bij muizen ingespoten geen spoor van tetanus.

Men ziet dus, dat langzamerhand, tot zekere hoogte, afhankelijk van de hoeveelheid ingespoten anatoxine, de immuniteit zich ontwikkelt; in den beginne zeer langzaam, na de derde week snel stijgend.

Hier zij tevens opgemerkt, dat men zich bij de titratie-uitkomsten ten zeerste rekenschap dient te geven, dat er groote individuele verschillen bestaan en dat om niet tot verkeerde gevolgtrekkingen te komen voor een serumtitratie het mengen van meerdere sera aangewezen is. Tevens is noodig bij elke titratie steeds weer een contrôledier te nemen.

Hoe groot deze individuele verschillen der dieren kunnen zijn moge blijken uit het volgende. Drie caviae hadden elk vóór $7\frac{1}{2}$ week een injectie van 1 cc. tetanusanatoxine onder de buikhuid gekregen. Het serum van deze dieren bleek afzonderlijk getitreerd in één geval 100 tot 200 d.l.m. muis, in een tweede geval nog geen 20, in het derde geval van 20—50 d.l.m. muis per $\frac{1}{2}$ cc. te kunnen neutraliseeren. Neemt men het gemiddelde van deze uitkomsten, dan ziet men dat hier ten opzichte van de toestand van 6 weken weer een duidelijke stijging van het antitoxinegehalte is waar te nemen.

Men heeft goede gronden, aan te nemen, dat deze stijging gedurende eenige maanden plaats vindt en daarna in een daling overgaat. Het serum van eenige dieren, die voor 8 maanden een injectie van 2 cc. anatoxine gekregen hadden bleek mij bij titratie per $\frac{1}{2}$ cc. 5 à 10 d.l.m. muis te kunnen neutraliseeren, terwijl 6 weken na de enting, zooals boven vermeld, deze waarde 20 d.l.m. was.

De wording en het verloop van de immuniteit tegen tetanus bereikt met het anatoxine is met de methode, die ik toepaste

(het mengen van het te titreeren serum met phys. zoutopl., waarin het gedroogde toxine in bepaalde hoeveelheid wordt opgelost) slechts zeer grof te benaderen, maar met het oog op de bedoeling van mijn onderzoekingen ruim voldoende. Buitengewoon interessant is een titratiemethode, die onlangs uitgewerkt en gepubliceerd is door FEIERABEND²⁸. Hiermede is het zelfs mogelijk om 1/500 A.E. (Internationaal) te meten. Als indicator dient de locale tetanus, die men in zijn verschillende vormen zou kunnen aflezen en daarnaar waardeeren bij caviae, door bij deze dieren mengsels van serum (waarvan de waarde te bepalen is) en grenswaarden van bekend toxine (de zg. L.l.r. dosis) in één der achterpooten in te spuiten. Afgezien van de moeilijkheid van het aflezen van de verschillende vormen van locale tetanus, is de hoeveelheid en de aard (men moet caviae gebruiken) der proefdieren, die men noodig heeft voor een titratie een bezwaar en lijkt mij tenslotte deze waardebepaling voor direct practisch gebruik ongeschikt. Evenwel bericht FEIERABEND²⁹, die deze methode toepaste bij zijne serumtitraties zeer gunstige resultaten.

Resumeerende mag men besluiten:

dat ingebracht bij caviae het tetanusanatoxin instaat is om het specifieke antilichaam te voorschijn te roepen; dat de antitoxische titer in de eerste plaats afhankelijk is van den tijd sedert de inspuiting verlopen, in de tweede plaats van de dosis anatoxine en ten derde vooral van het individueel wisselend vermogen van het proefdier om het specifieke antilichaam te vormen: de zg. réactivité naturelle (ZOELLER³⁰).

Waardeering door middel van tetanustoxine-inspuiting bij het geënte dier.

Om uit te maken, wanneer caviae na een anatoxineinjectie een dusdanige immuniteit hadden gekregen, dat ze in staat waren een onmiddellijk ingebrachte d.l.m. cavia of meer te weerstaan werd een groep van caviae elk onderhuids $\frac{1}{2}$ cc. tetanusanatoxine ingespoten: zie tabel 2.

Na 11 dagen werden enkele dezer dieren een doodelijke dosis tetanustoxine (gedroogd) in 1 cc. phys. zoutopl. opgelost in de rechter achterpoot gespoten. Als doodelijke dosis werd

genomen 1 d.l.m. cavia = 5 d.l.m. muis. De contrôledieren, die dezelfde hoeveelheid gekregen hadden, gingen in 3 à 4 dagen te gronde, de met anatoxine behandelde gingen een dag later dood aan tetanus.

Na 18 dagen werd aan de gevaccineerde caviae als boven bereid resp. 1 en 2 d.l.m. cavia gegeven. Terwijl het contrôledier met 1 d.l.m. cavia al na 24 uur uitgesproken tetanus had (rechter achterpoot was geheel gestrekt en stijf) had het geënte dier, dat 1 d.l.m. cavia had gekregen, een hoewel naar achteren gerichte nog gebogen rechter achterpoot (voetzool werd opgelicht): dus veel minder tetanus. Het gevaccineerde

TABEL 2.
RESULTAAT VAN ÉÉN INJECTIE.

Groep	Na 11 dgn.	Na 18 dgn.
$\frac{1}{2}$ cc. tetanus anat.	1 dlm. cavia tetanus † 4 à 5 dgn.	1 dlm. zware tet. 2 dlm. † 3 dgn.
Contrôle	1 dlm. tetanus † 3 à 4 dgn.	1 dlm. tetanus † 3 dgn.

dier, dat met 2 d.l.m. cavia was ingespoten, had ongeveer gelijke afwijkingen van de rechter achterpoot als het contrôledier, en ging als dit laatste in 3 dagen aan tetanus te gronde. Het geënte dier, dat 1 d.l.m. had gekregen, behield langen tijd uitgesproken tetanus, bleef echter leven. Hiermede bleek dus, dat caviae geënt met $\frac{1}{2}$ cc. anatoxine, die blijkens serumtitraties een hoewel slechts even aantoonbare humorale immuniteit hadden, in staat waren een dosis tetanusgif, die den dood in 3 à 4 dagen bij een niet gevaccineerde cavia veroorzaakte, te weerstaan. Dit was dus na 2 à 3 weken het geval.

Een herhaling van deze proef (tabel 3), waarbij nu met drie hoeveelheden anatoxine $\frac{1}{2}$, 1 en 2 cc. werd gewerkt, leerde, dat caviae, die voor twee weken een injectie van $\frac{1}{2}$ cc. tetanus-anatoxine gekregen hadden, ongeveer in denzelfden tijd aan tetanus stierven bij toediening van 1 d.l.m. cavia als de contrôledieren. Caviae, die met 1 cc. anatoxine onderhuids

waren ingespoten kregen zware tetanus en stierven veel later, na 8 à 9 dagen; dieren die met 2 cc. anatoxine geïmmuniseerd waren kregen geen verschijnselen met 1 d.l.m., met 2 d.l.m. cavia een lichte tetanus die al spoedig verergerde en tenslotte den dood veroorzaakte.

Na $2\frac{1}{2}$ week bleek de met $\frac{1}{2}$ cc. anatoxine behandelde cavia in 8 dagen aan tetanus te sterven, terwijl het contrôle-dier met dezelfde hoeveelheid toxine in 3 dagen stierf (1 d.l.m.). Immunisatie met 1 cc. anatoxine en natuurlijk ook 2 cc.

TABEL 3.
RESULTAAT VAN ÉÉN INJECTIE.

Groepen	Na 2 weken.	Na $2\frac{1}{2}$ week.
$\frac{1}{2}$ cc. tetanus anatoxine	1 dlm. tetanus † 4 dgn.	1 dlm. tetanus † 8 dgn.
1 cc. tetanus anatoxine	1 dlm. tetanus † 8 dgn.	1 dlm. lichte tetanus
2 cc. tetanus anatoxine	1 dlm. tetanus † op den duur	1 dlm. geen ver- schijnselen.
contrôle	1 dlm. tetanus † 3 à 4 dgn.	1 dlm. tetanus † 3 dgn.

gaf bij caviae in denzelfden tijd volkomen weerstand tegen 1 d.l.m. (in 't geheel geen verschijnselen van tetanus bij de met 2 cc. geënten.).

Een maand na één injectie van 1 cc. anatoxine werd bij caviae tevens de weerstand tegen tetanustoxine nagegaan. Deze caviae waren echter voor een groot gedeelte $1\frac{1}{2}$ week tevoren gepuncteerd omdat ze voor een andere proef gediend hadden. Ze waren nog in het geheel niet van deze ingreep hersteld (verlies van $\pm$ 5 cc. bloed). en voelden vermagerd en slap aan. De gevolgen bleken ook ten duidelijkste bij hunne weerstand tegen het tetanustoxine. Terwijl de voor $1\frac{1}{2}$ week gepuncteerde dieren bij inspuiten van 1 cc. tetanus toxine-oplossing in de rechter achterpoot, waarin 100 d.l.m. cavia uitgesproken tetanus kregen, met 200, 400 en 800 d.l.m. cavia hieraan in korten tijd te gronde gingen, bleek één van

de niet gepuncteerde dieren zelfs 1000 d.l.m. cavia te kunnen weerstaan. Het dier kreeg wel uitgesproken tetanus (stijfheid en rechtuitgestoken achterpoot) ging er echter niet aan dood. Contrôle caviae, dien 1 d.l.m. resp. 5 d.l.m. cavia was ingespoten, stierven in 3 resp. 2 dagen aan zeer zware tetanus.

Dit laatste onderzoek werd herhaald, waarbij ik mij tevens de vraag stelde: hoe bij het nog niet geheel geïmmuniseerde

TABEL 4.
RESULTAAT NA ÉÉN INJECTIE.

Groep	Na 15 dgn.	Na 15 dgn.	Na 19 dgn.	Na 28 dagen	Na 30 dagen
$\frac{1}{2}$ cc. tetanus anatoxine	1 dlm. tetanus † 4 dgn.		1 d.l.m. tetanus † 6 dagen	1 dlm. zeer zwaren tetanus.	2 dlm. tetanus † 3 dgn.
1 cc. tetanus anatoxine	1 dlm. tetanus † 6 dgn.	2 dlm. tetanus † 3 dgn.	1 dlm. geen ver- schijnselen	100 dlm. tetanus † ? 3 weken 500 dlm. † 2 dgn.	500 dlm. tetanus † 2 dgn.
2 cc. tetanus anatoxine		2 dlm. tetanus † 6 dgn.			
contrôle	1 dlm. tetanus † 3 dgn.		1 dlm. tetanus † 3 dgn.	1 dlm. tetanus † 3 dgn.	1 dlm. tetanus † 3 dgn.

Opmerkingen: dlm. geldt voor cavia.

dier of bij het dier, dat reeds een bepaalde immuniteit had, ingespoten met 1 d.l.m. (doodelijk voor het niet geheel geïmmuniseerde dier) resp. een hoeveelheid tetanusgif (doodelijke dosis voor het geïmmuniseerde dier) het ziekteproces door het gelijktijdig inspuiten van tetanusanatoxine in negatieven of positieven zin kon beïnvloed worden; of dus in het laatste geval aan het tetanusanatoxine een therapeutische functie kon toegeschreven worden.

Van een groep van caviae werd $\frac{1}{3}$ deel geënt met $\frac{1}{2}$ cc., een tweede $\frac{1}{3}$ deel met 1 cc. en een laatste met 2 cc. anatoxine. (zie tabel 4).

Vijftien dagen na de injectie werd den dieren, die met $\frac{1}{2}$ cc. resp. 1 cc. anatoxine gevaccineerd waren één d.l.m.

cavia toegediend. Terwijl het contrôle dier met 1 d.l.m. in 3 dagen aan uitgesproken tetanus stierf, gingen de met $\frac{1}{2}$ cc. geënten in 4 dagen, met 1 cc. in 6 dagen dood aan tetanus. Dieren, die met 1 resp. 2 cc. anatoxine waren ingespoten, gingen met 2 d.l.m. in 3 resp. 6 dagen te gronde aan tetanus.

Na 19 dagen gingen de caviae, die met $\frac{1}{2}$ cc. gevaccineerd waren, met 1 d.l.m. cavia te gronde in gemiddeld 6 dagen; de met 1 cc. gevaccineerde konden 1 d.l.m. weerstaan, zonder ziekteverschijnselen.

Na 28 dagen bracht 1 d.l.m. die bij contrôledieren den dood veroorzaakte aan tetanus in 3 dagen, bij met $\frac{1}{2}$ cc. anatoxine ingespoten caviae nog zeer zware tetanus, de met 1 cc. gevaccineerde kregen met 100 d.l.m. cavia tetanus, die bij enkele nog na 3 weken den dood veroorzaakte, 500 d.l.m. gaf in dit geval zeer snel optredende doodelijke tetanus na 2 dagen.

Na 30 dagen veroorzaakte 2 d.l.m. cavia bij de dieren, die met $\frac{1}{2}$ cc. anatoxine ingespoten waren den dood aan tetanus na gemiddeld 3 dagen. Caviae die met 1 cc. anatoxine waren ingespoten werden in $\pm$ 2 dagen door snel optredende tetanus gedood met 500 d.l.m. cavia.

Men ziet aldus, dat deze uitkomsten vrijwel overeenkomen met die van de voorgaande onvatbaarmakingen; opvallend is hier evenwel het groote verschil in effect tusschen $\frac{1}{2}$ en 1 cc. anatoxineinjectie.

Hiernaast werd nu in het verloop dezer entingen op verschillende tijdstippen de werking van het gelijktijdig met het toxine (echter op een andere plaats) inspuiten van anatoxine nagegaan.

Het bleek, dat caviae, die met $\frac{1}{2}$ cc. anatoxine geënt waren en met 1 d.l.m. caviae na 4 dagen aan tetanus stierven, met dezelfde gifdosis en gelijktijdig inspuiten als boven beschreven van 1 cc. anatoxine in 5 dagen aan tetanus stierven, terwijl dezelfde dieren met 10 cc. anatoxine zeer zware tetanus kregen en veel later te gronde gingen: na $\pm$ 12 dagen.

Caviae, die met $\frac{1}{2}$ cc. anatoxine geïmmuniseerd waren, stierven met 2 d.l.m. cavia in 3 dagen aan uitgesproken tetanus, met gelijktijdige inspuiting van 2 d.l.m. en daarnaast 1 cc. anatoxine na 6 dagen, terwijl ze na inspuiting van 2 d.l.m. en 10 cc. anatoxine zeer zware tetanus kregen en na 1 maand nog leefden: de beide achterpooten door de tetanus

geheel gestrekt. Caviae, die met 1 cc. geënt waren gingen met 500 d.l.m. cavia in 2 dagen dood aan tetanus; met gelijktijdige toediening van 10 cc. anatoxine onder de buikhuid trad de dood vele uren later op.

Hieruit blijkt dus ten duidelijkste, dat het tetanusanatoxine zoowel bij het nog niet geheel geïmmuniseerde als bij het geïmmuniseerde dier de werking van de dodelijke dosis tetanusgif kan vertragen c.q. tegenhouden.

Voor de volledigheid werd tevens de werking van het tetanusanatoxine nagegaan bij het niet geënte dier. Hiervoor werden eenige even groote caviae in de rechter achterpoot met 1 d.l.m. cavia ingespoten. Het grootste gedeelte kreeg nu tevens nog 10 cc. tetanusanatoxine onder de buikhuid. Den volgenden dag bleken de dieren, die slechts 1 d.l.m. gekregen hadden, meer tetanus te toonen dan de dieren, die gelijktijdig met 10 cc. anatoxine waren ingespoten. Na 3 dagen gingen de eerste dieren aan tetanus dood, terwijl de laatste groep nog sterke tetanus had en 1 à 2 dagen later stierf. Ook hier dus de mogelijkheid van het anatoxine om de werking van de dodelijke hoeveelheid tetanusgif te vertragen. Men heeft hier waarschijnlijk aan te nemen, dat door het groote overschot aan bindende stoffen (aanwezigheid van het anatoxine), het toxine afgehouden wordt van plaatsen waar dit laatste anders zijn giftige werking kan ontvouwen.

Immunitet met twee injecties.

Wanneer men inplaats van één injectie, twee aanwendt, krijgt men veel krachtiger immunitet. (Zie tabel 5).

Met een interval van 10 dagen, dus 2 maal 1 cc. anatoxine: groep a.

14 dagen na de 2e injectie bleek het serum der proefdieren nog geen 100 d.l.m. muis per $\frac{1}{2}$ cc. te kunnen neutraliseeren: † aan tetanus 2e dag.

35 dagen na de 2e injectie was de waarde iets grooter dan de neutralisatie mogelijkheid van 100 d.l.m. per $\frac{1}{2}$ cc. serum.

60 dagen na de 2e injectie kon het serum per $\frac{1}{2}$ cc. nog geen 200 d.l.m. muis neutraliseeren (dood aan tetanus na 3 à 4 dagen).

Met een interval van 14 dagen: groep *b*.

20 dagen na de 2e injectie nog niet 100 d.l.m. muis per $\frac{1}{2}$ cc. serum te neutraliseeren.

32 dagen na de 2e. injectie kon $\frac{1}{2}$ cc. serum nog niet 200 d.l.m. muis neutraliseeren. (+ aan tetanus 2e dag).

70 dagen na de 2e injectie was de neutralisatiemogelijkheid voor $\frac{1}{2}$ cc. serum minder dan 200 d.l.m. muis (+ aan tetanus na 5 dagen).

TABEL 5.

Groepen	1e inj.	2e inj. na 10 dgn.	← HARTPUNCTIE →		
			Na 14 dgn.	Na 35 dgn.	Na 60 dgn.
<i>a</i>	1 cc. tet. anat.	1 cc. tet. anat.	< 100 dlm.	iets > 100 dlm.	< 200 dlm.
		Na 14 dgn.	20 dgn. na 2e.	32 dgn.	70 dgn.
<i>b</i>	1 cc. tet. anat.	1 cc. tet. anat.	< 100 dlm.	< 200 dlm.	< 200 dlm.
		Na 35 dgn.	40 dgn. na 2e		
<i>c</i>	1 cc. tet. anat.	1 cc. tet. anat.	iets > 16000 dlm.		

Opmerkingen: de aangegeven tijden bij de hartpunctie hebben betrekking op de 2e injectie. Verder als bij tabel 1.

Met een veel langer interval nl. 5 weken (groep *c*.) en

40 dagen na de 2e injectie bleek het serum der proefdieren per $\frac{1}{2}$ cc. bijna 16000 d.l.m. muis (muis kreeg iets tetanus) te kunnen neutraliseeren.

Vat men al deze uitkomsten samen, dan blijkt bij een tijds-ter-
mijn van 14 + 70 dagen (zie boven uitkomst van de immu-
nisatie met interval van 14 dagen) en 2 injecties, de immuni-
teit nog de waarde van neutralisatiemogelijkheid per $\frac{1}{2}$ cc.
serum van 200 d.l.m. muis niet te hebben.

In een kortere tijd, 35 + 40 dagen (zie immunisatie met
interval van 5 weken) ontstond zelfs een neutralisatiemoge-
lijkheid per $\frac{1}{2}$ cc. van iets minder dan 16000 d.l.m. muis.

Deze proeven leeren dus:

*Het effect van de vaccinatie tegen tetanus met dezelfde
hoeveelheid anatoxine wordt grooter, naarmate de injecties
verder uit elkaar liggen.*

Hoe sterk een 2e injectie, herhaald zeer lang (8 maanden)

na de 1e, het antitoxinegehalte weer kan doen stijgen, blijkt wel uit het volgende: het serum neutraliseerde per $\frac{1}{2}$ cc. na 8 maanden nog niet 5 d.l.m. muis gedroogd toxine. Een nieuwe injectie van 1 cc. anatoxine en onderzoek van het serum na 1 week leerde, dat dit nu per $\frac{1}{2}$ cc. meer dan 1000 d.l.m. muis kon neutraliseeren. Wel was dus de humorale immuniteit aanvankelijk zeer laag, maar de latente cellulaire immuniteit was aanwezig en kwam plotseling in al zijn kracht te

TABEL 6

Groepen	INJECTIES.				Hartpunctie	Weerst. d.l.m. cavia
	1e injectie	Na 1 week	Na 2 weken	Na 3 weken	Na 4 weken	Na 5 mnd.
I	1 cc. tetan. anat.		1 cc. tetanus anat.	1 cc. tetanus anat.	1000--2000 d.l.m.	
II	$\frac{1}{2}$ cc. tetanus anatoxine		1 cc. tetanus anatoxine	1 cc. tetanus anatoxine	50—250 d.l.m.	met 20.000 d.l.m. cavia † 1 dag
III	1 cc. tetanus anatoxine		$\frac{1}{2}$ cc. tetanus anatoxine	$\frac{1}{2}$ cc. tetanus anatoxine	1000-2000 d.l.m.	met 20.000 d.l.m. cavia † 4 dgn.

Opmerkingen: de aangegeven tijden hebben betrekking op de 1e injectie

voorschijn bij het wederom aanwenden van de specifieke prikkel: *injection de rappel*.

Op grond van de boven verkregen resultaten met het tetanusanatoxine stelde ik mij nu de volgende praktische vraag: op welke wijze moet men enten om in een bepaalde tijd een zoo krachtig mogelijke immuniteit te verkrijgen? Hierbij heeft men onmiddellijk te kiezen in aantal, grootte der injecties en de intervallen tusschen de injecties. Aantal en intervallen zullen in het algemeen wederkeerig elkander beïnvloeden, omdat met het toenemen van het aantal injecties in een gegeven tijd, het interval er tusschen kleiner zal dienen te worden. De grootte van de injectie is echter onafhankelijk van de bovengenoemde twee. Daarom werd de grootte van de injectie allereerst als eenige ongelijke (1 à $\frac{1}{2}$ cc. anatoxine) als volgt onder de oogen gezien. (Zie tabel 6).

Een groep I caviae werd ingespoten met 1 cc. anatoxine

om de 2 weken, één week na de 2e injectie 1 cc. tetanusanatoxine.

Een groep II caviae kreeg als 1e injectie $\frac{1}{2}$ cc. anatoxine, de 2 andere inspuitingen waren ieder 1 cc. op dezelfde tijden.

Een groep III caviae kreeg als 1e injectie 1 cc. anatoxine, de 2e en 3e injectie waren ieder $\frac{1}{2}$ cc.; intervallen als boven.

Een week na de 3e injectie werd bij de 3 groepen hartpunctie verricht en het serum ervan nagegaan op antitoxine-

TABEL 7

Groep	← INJECTIES. →			HARTPUNCTIE.		
	1e inj.	Na 1 week	Na 2 weken	Na 3 weken	Na 4 weken	Na 8 $\frac{1}{2}$ week
A.	1 cc. tetanus anatoxine	1 cc. tetanus anatoxine	1 cc. tetanus anatoxine		< 2000 d.l.m.	> 8000 d.l.m.
B.	1 cc. tetanus anatoxine		1 cc. tetanus anatoxine		± 2000 d.l.m.	< 8000 d.l.m.
C.	1 cc. tetanus anatoxine			1 cc. tetanus anatoxine	> 2000 < 4000 d.l.m.	< 8000 d.l.m.

Opmerkingen: zie tabel 6.

gehalte. Terwijl groep I en III in staat waren per $\frac{1}{2}$ cc. serum 1000 tot 2000 d.l.m. muis te neutraliseeren, kon groep II van 50 tot 250 d.l.m. muis neutraliseeren. Duidelijk bleek dit verschil tevens 5 maanden na deze titratie. Dieren van groep II, ingespoten met 20.000 d.l.m. cavia waren den volgenden dag reeds dood aan zeer sterke tetanus, terwijl caviae van groep III zware tetanus vertoonden en na 4 dagen stierven.

De verschillen tusschen de groepen I en II zijn weinig in het oog springend; duidelijk minder is het antitoxinegehalte van het serum bij groep II zoodat: een kleine aanvangsdosis bij tetanusanatoxine-entingen onjuist is en men beter de volgende injecties kleiner kan kiezen.

Daarna werd met een constante injectie van 1 cc. anatoxine met wisselende intervallen en aantal injecties in een tijd van 4 weken als volgt gevaccineerd: zie tabel 7.

Een groep A caviae kreeg driemaal, met een interval steeds

van één week, een injectie onderhuids van 1cc. anatoxine.

Een groep B kreeg om de twee weken een zelfde injectie.

Een groep C kreeg om de drie weken een zelfde injectie, zoodat: groep A in totaal kreeg 3 cc. anatoxine, groep B en groep C 2 cc. echter met andere intervallen.

4 weken na de 1e injectie voor de drie groepen hartpunctie voor enkele dieren uit elke groep. Het serum van de dieren van groep A bleek nu nog niet geheel 2000 d.l.m. muis (gedroogd toxine) per $\frac{1}{2}$ cc. te kunnen neutraliseeren, groep B had een iets hogere antitoxinewaarde ($\pm$ 2000 d.l.m.), terwijl groep C in staat was per $\frac{1}{2}$ cc. serum bijna 4000 d.l.m. muis te neutraliseeren. (titratiemuis kreeg den 3en dag iets tetanus).

Men ziet aldus, dat hoewel groep A meer anatoxine heeft gekregen dan groep C, de laatste meer immuniteit heeft dan de eerste. De gevoeligmakende injectie heeft langer ingewerkt?

Merkwaardig waren de uitkomsten der drie groepen A, B en C één maand na de eerste punctie. Terwijl het serum van groep A nu in staat was om meer dan 8000 d.l.m. muis per $\frac{1}{2}$ cc. te neutraliseeren, kon dat van groep B niet 8000 d.l.m. muis ($\dagger$ aan tetanus na 1 dag) en dat van groep C eveneens geen 8000 d.l.m. ($\dagger$ aan tetanus na 4 dagen) neutraliseeren.

Hier zijn dus de rollen omgedraaid: de dieren, die 3 maal 1cc. anatoxine gekregen hebben, vertoonen hogere antitoxine-waarden dan de caviae, dien 2 maal 1 cc. anatoxine is ingespoten.

Men kan dus de gevolgtrekking maken, dat het inspuiten om de week kort na de laatste injectie, een lager antitoxine-gehalte van het serum geeft; maar dat daarna het voordeel komt aan de dieren, die het meeste anatoxine gekregen hebben. Het ligt voor de hand dit verschijnsel als een soort depôt-werking te verklaren: het tetanusanatoxine is gebonden aan de hierdoor te voorschijn geroepen (homologe) antitoxinen, is dus bij titratie op muizen niet aantoonbaar, maar ontvouwt ondertusschen toch een antigeenwerking in het dierlijk organisme

Deze laatste proef werd herhaald: als standaardinjectie wederom 1 cc. anatoxine, groepen als boven ingedeeld. Zie tabel 8.

Groep A. krijgt 3 maal 1 cc. anatoxine, interval 1 week.

Groep B krijgt 2 maal 1 cc. anatoxine, interval 2 weken.
 Groep C krijgt 2 maal 1 cc. anatoxine, interval 3 weken.
 Het serumonderzoek vond voor de 3 groepen plaats 5 weken na de 1e injectie.

Groep A kon per $\frac{1}{2}$ cc. serum bijna 2000 d.l.m. muis (droog toxine) neutraliseeren: titratiemuis ging dood aan tetanus na 7 dagen.

Groep B had ongeveer gelijk antitoxinegehalte: $\frac{1}{2}$ cc. serum

Groep	TABEL 8					
	← INJECTIES →	← HARTPUNCTIE →				
	1e inj.	Na 1 week	Na 2 weken	Na 3 weken	Na 5 weken	Na 18½ week
A.	1 cc. tetanus anatoxine	1 cc. tetanus anatoxine	1 cc. tetanus anatoxine		< 2000 d.l.m.	
B.	1 cc. tetanus anatoxine		1 cc. tetanus anatoxine		< 2000 d.l.m.	
C.	1 cc. tetanus anatoxine			1 cc. tetanus anatoxine	bijna 4000 d.l.m.	

+ $\frac{1}{2}$ cc. phys. zoutopl. waarin 2000 d.l.m. muis gaf † aan tetanus 4e dag.

Groep C kon per $\frac{1}{2}$ cc. serum ± 4000 d.l.m. († aan tetanus 6e dag) neutraliseeren.

Van deze dieren werd na 3 maanden wederom het antitoxinegehalte van het serum bepaald, met het resultaat, dat de antitoxische titer van de groep A hoger was dan die van de andere groepen B en C. Tusschen de groepen B en C kwamen geen duidelijke verschillen voor den dag.

Resumeerende de resultaten van deze onderzoeken, waarbij in een gegeven tijd een zoo krachtig mogelijke immuniteit werd getracht te bereiken, kan ik besluiten:

1e. dat een grootere aanvangsdosis (gevoeligmakende injectie) is aangewezen.

2e. dat voor het zoo snel mogelijk bereiken van een bepaalde immuniteit er een behoorlijke afstand tusschen de gevoeligmakende en de 2e injectie moet zijn.

3e. dat, als men snel achter elkaar inspuit, b.v. om de week er een z.g. depôtwerking in het organisme optreedt, die op den duur pas effectief blijkt.

4e. dat, wanneer men den tijd heeft, het aanbeveling verdient om het interval tusschen de 1e en de 2e injectie groot te kiezen.

Tenslotte werd nu nog de invloed van de niet specifieke prikkel op het effect van de tetanusanatoxine-inspuiting nagegaan.

TABEL 9

Groep	INJECTIES				← HARTPUNCTIE →	
	1e injectie	reactie	Na 2 weken 2e injectie	reactie	2 weken na 2e injectie	4 weken na 2e injectie
I.	1 cc. tetanus anatoxine	—	1 cc. tetanus anatoxine	—	< 250 d.l.m. a	< 250 d.l.m.
II.	1 cc. 2% yatreen anatoxine	+ +	1 cc. 2% yatreen anatoxine	+ +	< 250 d.l.m. b a < b	> 250 < 500 d.l.m.

Opmerkingen: zie tabel 1.

Het bleek, dat, als men caviae, die met tetanusanatoxine No. 80 een zekere immuniteit hadden verkregen, een nieuwe injectie gaf met tetanusanatoxine voorzien van 2% yatreen, het effect grooter was dan met tetanusanatoxine in dezelfde hoeveelheid zonder yatreen.

Voor een nauwkeurig onderzoek werd nu de volgende proef genomen (zie tabel 9).

Een groep caviae werd met een tusschenruimte van 2 weken ingespoten met 2 injecties van 1 cc. tetanusanatoxine.

Een groep II kreeg met hetzelfde interval 2 maal 1 cc. van een oplossing, die bereid was met yatreen als boven.

Voor beide groepen werd steeds den dag na de injectie de plaatselijke reactie op de inspuiting nagegaan en er bleek steeds bij de met 2% yatreenanatoxine ingespoten dieren een vrij sterk infiltraat te bestaan, dat echter binnen korten tijd steeds weer verdween.

Twee weken na de 2e injectie werd het serum der beide groepen getitreerd op muizen en bleek de 1e groep per $\frac{1}{2}$ cc.

nog in het geheel niet 250 d.l.m. muis te kunnen neutraliseeren, terwijl het serum der 2e groep iets meer antitoxine bevatte: titratiemuis ging veel later dood.

Vier weken na de 2e injectie bleek het serum der eerste groep minder dan 250 d.l.m. per $\frac{1}{2}$ cc. te kunnen neutraliseeren, terwijl de 2e groep als overeenkomstige waarde 250—500 d.l.m. had.

Samenvattend kan men dus besluiten, dat het toevoegen van yatreen in staat is de antigeenwerking van het tetanus-anatoxine te verhoogen, waarbij echter de infiltratie op de plaats der enting het gebruik van deze combinatie voor entingen van menschen niet zal bevorderen.

HOOFDSTUK II.

HET SIMULTAAN ENTEN.

Hieronder heeft men te verstaan het gelijktijdig inspuiten van zoowel anatoxine (antigeen, vormer van het actieve antilichaam) als van serum (het passieve antilichaam).

Deze wijze van enten is natuurlijk daar aangewezen, waar onmiddellijk in het menschelijk organisme de aanwezigheid van de tetanusantistof gewenscht is. Van Fransche zijde werd, vooral met het oog op het voorkomen van de zoogenaamde *tétanos post sérique*, dit vraagstuk onder de oogen gezien. Door de zoogenaamde prophylactische seruminjectie te combineeren met tetanusanatoxine-inspuiting, beoogde men een duurzame immuniteit te verkrijgen. Men dacht namelijk dat de zoogenaamde actieve antilichamen, dus afkomstig van de werking van het anatoxine, langzamerhand in de plaats zouden treden van de met de seruminjectie ingebrachte zoogenaamde passieve antistoffen, die zooals bekend, na bepaalden tijd (zie inleiding) hunne werking hebben ingeboet. Men spoot in Frankrijk dus bij menschen gelijktijdig op verschillende plaatsen antitetanusserum en tetanusanatoxine in. Men kan theoretisch dan verschillende toestandsbeelden krijgen:

1e. Het antitoxine in het bloed vermindert langzamerhand: de passieve antilichamen worden uitgescheiden, eventueel vernietigd.

2e. Het antitoxinegehalte blijft op dezelfde hoogte: de verdwijnende passieve antilichamen worden in gelijke mate vervangen door de actieve, ontstaan door de anatoxine-werking.

3e. De antitoxische titer van het bloed neemt toe: er is meer nieuw-vorming door het anatoxine, dan verwijdering van het passieve antilichaam. Om een hiaat tusschen de passieve en actieve immunisatie te voorkomen (de actieve immuniteit ontstaat immers slechts langzamerhand) werd na tien dagen weer een serum-injectie gegeven. Weer tien dagen later werd opnieuw tetanus-anatoxine geïnjecteerd, die

de zoogenaamde „bond antitoxique” moest veroorzaken (RAMON en ZOELLER).

Is echter het simultaan immuniseeren mogelijk? Onmiddellijk komt men dan tot de volgende vragen:

Wordt door gelijktijdig inspuiten van antitetanusserum en tetanusanatoxine:

1e. de werking van het passieve antilichaam verminderd?

2e. de werking van het anatoxine gedrukt of zelfs onmogelijk?

Voor de beantwoording van de eerste vraag werd de volgende proef genomen: bij twaalf caviae werd de buik geschoren. Bij zes werd ter weerszijde van de mediaanlijn respectievelijk 2 cc. antitetanusserum en 2 cc. tetanusanatoxine no. 80 ingespoten. De andere zes kregen alleen serum onderhuids.

Den volgenden dag bleek bij de dieren de buikhuid op de plaats, waar het serum ingespoten was min of meer verdikt, terwijl de anatoxineinjectie geen locale reactie van eenige beteekenis had veroorzaakt.

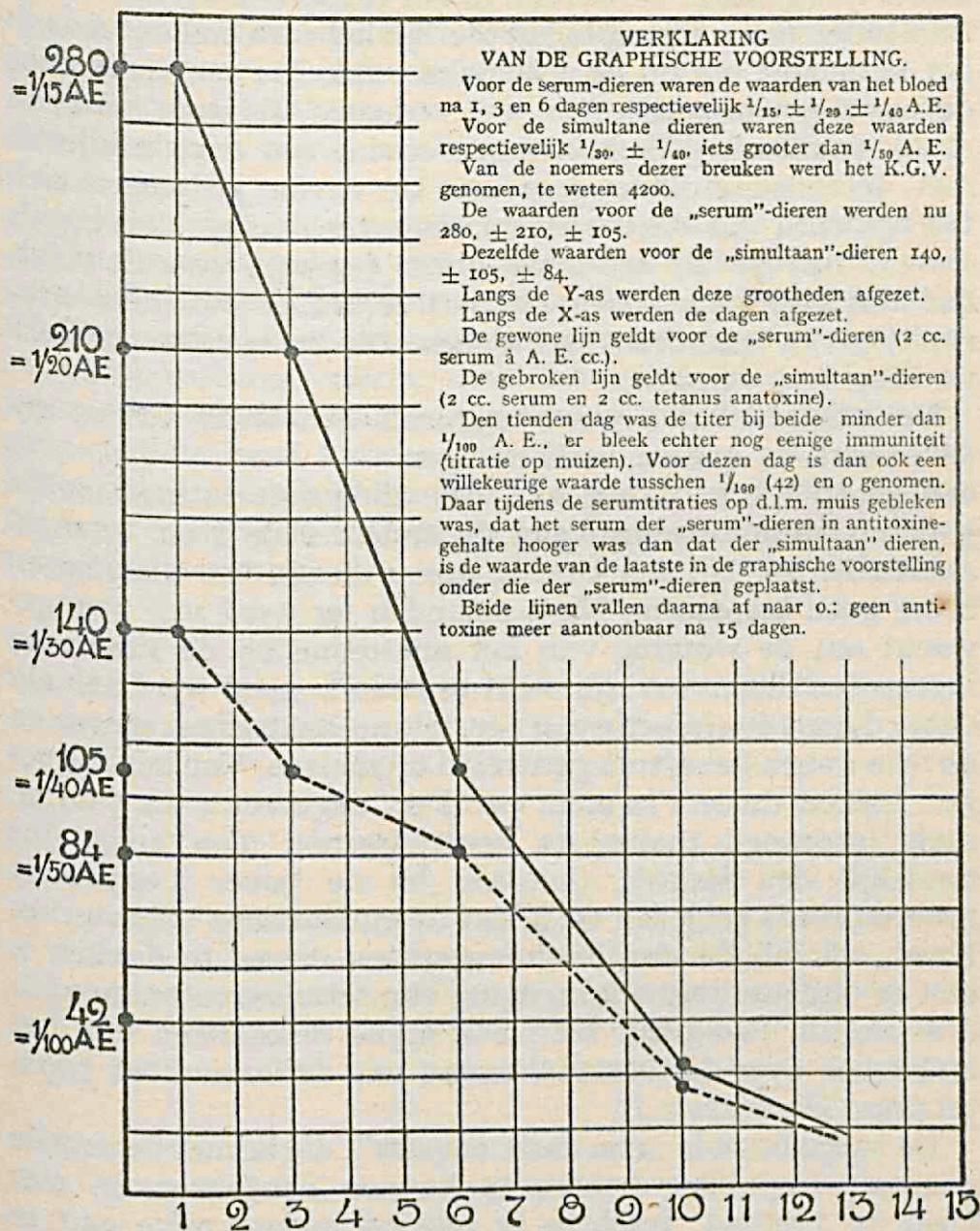
Door bij deze dieren na 1 dag, na 3 dagen, na 6 dagen, na 10 dagen en na 15 dagen hartpunctie te verrichten en het serum te titreeren op het A.E. gehalte ziet men al dadelijk, dat in het bloed van de simultaan ingespoten dieren $1/30$ A.E. na 1 dag aanwezig is, terwijl bij de „serum”dieren dit $1/15$ A.E. bedraagt (zie graphische voorstelling).

De geheele lijn van de „serum”dieren loopt op een veel hoger niveau dan bij de „simultane” dieren: ten slotte is er dan in het geheel geen antitoxine meer aan te toonen, doordat na 15 dagen zelfs een halve cc. serum van beide reeksen gemengd met een halve cc. physiologische zoutoplossing waarin 1 d.l.m. muis is opgelost, dit dier niet meer beschut tegen een doodelijk verloopende tetanus.

Men mag hieruit dus zeer zeker besluiten, wat eigenlijk al *à priori* te verwachten was (binding antitoxine-anatoxine), dat men bij het simultaan inspuiten, door het inbrengen van het tetanusanatoxine, afhankelijk van de dosis van het anatoxine, een groot gedeelte van het „passieve” antitoxine, buiten werking stelt. Hiermede heeft men dus bij simultaan-inspuitingen ten zeerste rekening te houden.

2e. Hiervoor werd een serie dieren ingespoten met antitetanusserum en tetanusanatoxine als bij vorige proef, een

andere groep alleen met anatoxine. Terwijl de dieren, die alleen met tetanusanatoxine ingespoten waren na eenigen tijd



een aantoonbare immuniteit gekregen hadden, was bij de simultaan ingespotenen geen spoor antitoxine aantoonbaar.

Het gelijktijdig inspuiten van antitetanusserum en tetanusanatoxine drukt dus zeer zeker de werking van het anatoxine in het dierlijk organisme.

Maar al was dan ook niet een humorale immuniteit aanwezig (is slechts grof met mijne methode te benaderen) er diende uitgemaakt te worden of het anatoxine bij het simultaan enten een werking in het dierlijk lichaam had ontvouwd: het vermogen om op de specifieke prikkel te reageeren door de vorming van antistoffen, had verhoogd. Daarom werd aan al de simultaan geïmmuniseerde caviae een tweede injectie met tetanusanatoxine gegeven. De caviae gedroegen zich ten opzichte van deze anatoxineinjectie overeenkomstig als dieren, dien slechts één injectie was gegeven, waaruit volgt, dat dus blijkbaar de eerste met serum gecombineerde inspuiting van tetanusanatoxine geen voor het laatste specifieke werking had verricht.

Volledigheidshalve werd nogmaals een reeks caviae gevaccineerd in andere verhoudingen: een groep dieren kreeg aan één zijde van de mediaanlijn 5 cc. antitetanusserum, aan de andere zijde 1 cc. tetanusanatoxine no. 80, een tweede groep diende ter contrôle en kreeg geen inspuiting. Na 2 maanden (er werd vrij lang gewacht om de werking van het anatoxine bij de simultaan ingespoten dieren tot zijn recht te laten komen) werd aan elk dezer dieren één injectie van 1 cc. tetanusanatoxine gegeven en na drie weken het serum getitreerd op muizen. Van beide groepen bleken de sera in staat per $\frac{1}{2}$ cc. ongeveer 2 tot 5 d.l.m. muis (gedroogd toxine) te neutraliseeren. Men krijgt dus duidelijk den indruk, (hetgeen bij de boven beschreven proeven reeds gebleken was), dat de antitoxische titer van het bloed ook bij de simultaan-ingespoten dieren te danken is aan de onderhuidsche inbrenging van tetanusanatoxine vóór drie weken. (Vergelijk hiermede mijne uitkomsten van het onderzoek over de totstandkoming van de immuniteit tegen tetanus: Hoofdstuk I).

De zoogenaamde „réactivité acquise”, die ik met de tweede anatoxineïnspuiting hoopte te kunnen aantoonen en niet bleek te bestaan, trachtte ik nog op andere wijze aan te toonen.

Van een reeks van twaalf caviae werden zes simultaan ingespoten (2 cc. antitetanusserum en 2 cc. tetanusanatoxine) en zes kregen alleen antitetanusserum subcutaan.

Na ruim drie maanden werd aan deze dieren respectievelijk 1, 2, 3, en 4 d.l.m. gegeven, opgelost in 1 cc. physiologische

zoutoplossing, door inspuiting in de rechter achterpoot.

De volgende dagen vertoonden alle dieren zoowel „simultaan” als „serum”, afhankelijk van het tetanustoxine-dosis, tetanus en gingen ongeveer gelijktijdig (ten opzichte van de dosis) te gronde aan klemziekte.

Bij het simultaan injiceeren schijnt het tetanusanatoxine geen of althans zeer weinig werking in het dierlijk organisme te ontvouwen.

Had het anatoxine immers het vermogen om antitoxine te vormen latent doen ontstaan, dan moest toch zeker bij deze proef het verschil in het verloop van de tetanus te voorschijn zijn gekomen. Waar dit niet het geval is kan men slechts de gevolgtrekking maken, dat het gelijktijdig met groote overmaat antitetanusserum ingespoten anatoxine geen anti-geen-werking heeft kunnen verrichten en kan men dus niet alleen zeggen, dat het simultaan inspuiten ongunstig is voor de serumwerking, maar tevens het ontstaan van de actieve immuniteit verhindert.

HOOFDSTUK III.

DE WERKING VAN GEMENGDE ENTSTOFFEN, „VACCINS ASSOCIÉS”.

Onder gemengde enting verstaat men de praeventieve behandeling met een mengsel van twee of meer entstoffen. De bedoeling van deze wijze van immuniseeren is met één injectie tegenover meerdere ziektekiemen tegelijkertijd weerstand te verkrijgen (b.v. Diro, een gemengde entstof tegen diphtherie en roodvonk), waarbij tevens de mogelijkheid bestaat, dat de eene entstof als aspecifieke hulp de antigeenwerking van de andere vermeerderd.

Ik heb uitsluitend proeven genomen met gemengde vaccins bestaande uit twee entstoffen, tetanusanatoxine gemengd met typhusvaccin resp. diphtherie-anatoxine.

Men kan zich nu al dadelijk twee vragen stellen:

- 1e. Blijft van beide entstoffen de werking behouden?
- 2e. Zoo ja, is deze verminderd of vermeerderd?

Het meest gunstige is natuurlijk, wanneer de werking van beide vermeerderd, dus dat het eene vaccin het andere stimuleert. Het kan ook zijn nut hebben als één der vaccins in werking vermeerderd en het andere gelijk blijft. Vermindert echter één van beide, dan kan ons standpunt betrekkelijk zijn; verminderen beide, dan moet men deze geassocieerde vaccinatie als ondeugdelijk verwerpen.

Om de vragen, hierboven gesteld, te beantwoorden werd als gemengd vaccin gekozen een mengsel, dat bereid was door het neerslag, uit doode typhusbacillen bestaande, dat verkregen werd door 10 cc. T.A.B. vaccin (Typhus-paratyphus A-paratyphus B) te centrifugeeren en daarna te suspenderen in 10 cc. tetanusanatoxine No. 80.

Als *eerste proef* (zie tabel 10) werd bij zes caviae 1 cc. van dit gemengde vaccin onder de buikhuid ingespoten, bij een tweede groep van zes werd alleen 1 cc. tetanusanatoxine No. 80 onderhuids ingebracht. Er traden geen noemenswaardige huidreacties op. Na 14 dagen (eerste titratie) werd

serum, van enkele dieren uit elke groep door hartpunctie verkregen, onderling vergeleken. In $\frac{1}{2}$ cc. serum bleek een dusdanige hoeveelheid tetanusantitoxine aanwezig, dat een hoeveelheid toxine overeenkomend met 1 d.l.m. muis bijna

TABEL 10 (Proef 1).

Groep.	1e injectie	reactie	14 dagen na 1e inj. hart-punctie tevens serum-titratie	2e injectie 2 weken na 1e inj.	reactie	18 dgn. na 2e inj. hart-punctie tevens serum-titratie.	Agglutinat.
I	1 cc. typhus-tetanus anatoxine	geene	< 1 dlm.	1 cc. typhus-tetanus anatoxine	geene	iets < 100 dlm.	niet aanwezig.
II	1 cc. tetanus anatoxine	geene	< 1 dlm.	1 cc. tetanus anatoxine	geene	± 50 dlm.	niet aanwezig

Opmerkingen: zie tabel 1.

TABEL 11 (Proef 2).

← INJECTIES →			→		Hart-punctie.	Agglutinat		
Groep.	1e injectie	reactie	5 weken na 1e	2e injectie	reactie	na 2e inj.	St. 1	St. 2 Parat. B.
I	1 cc. typhus-tetanus anatoxine	Geene	—	1 cc. typhus-tetanus anatoxine	Geene	< 8000 dlm.	20	40 à 80 ? 20,40 à 80
II	1 cc. tetanus anatoxine	Geene	—	1 cc. tetanus anatoxine	Geene	< 16000 dlm.	—	— —
III	1 cc. typhus T.A.B. vaccin	Geene	—	1 cc. typhus-tetanus anatoxine	Geene		400	800 600

Opmerkingen: als bij Tabel 1.

werd geneutraliseerd, want de muis, die voor deze titratie diende, kreeg slechts in zeer lichten graad tetanus. Van een duidelijk verschil tusschen de beide groepen was geen sprake.

Onmiddellijk na de hartpunctie werden alle dieren weer geënt resp. met het gemengde vaccin of alleen met tetanus-anatoxine.

Na 18 dagen werd hartpunctie gedaan bij de nog niet gepuncteerde caviae. Bij serumonderzoek op muizen bleek het serum der met gemengd vaccin ingespoten dieren meer antitoxine te bevatten dan dat der dieren, die met tetanus-anatoxine alleen geënt waren; de verhoudingen tusschen de beide immuniteitstoestanden was $\pm 2 : 1$.

Het serum der met gemengde entstof ingespoten dieren bleek geen typhus-agglutinenen te bevatten.

Als *tweede proef* werd hetzelfde onderzoek herhaald (zie tabel 11). De gemengde entstof werd als vroeger bereid. Het tetanusanatoxine was ook hetzelfde. Met een interval van 5 weken werd aan 6 caviae (groep 1) het gemengde vaccin, aan 6 andere (groep 2) alleen het tetanusanatoxine telkens 1 cc. onderhuids ingespoten. Een derde 6 tal (groep 3) kreeg met hetzelfde interval, als eerste injectie 1 cc. T.A.B. vaccin, als tweede injectie 1 cc. gemengde entstof als boven.

Was nu het immuniseeren met gemengd vaccin beter dan met het enkelvoudige tetanusanatoxine, dan moest dit verschil, gezien den langen tijd tusschen de 2 inspuitingen, zeer naar voren komen. Daarbij werd tevens extra lang gewacht, voordat de dieren gepuncteerd werden, nl. 6 weken.

Het serum der met gemengd vaccin ingespoten dieren bleek aldus 6 weken na de 2e injectie nog geen 8000 d.l.m. muis (gedroogd toxine) per $\frac{1}{2}$ cc. te kunnen neutraliseeren († aan tetanus 6e dag), terwijl het serum der dieren, dien het enkelvoudige tetanusanatoxine was ingespoten meer dan 16000 d.l.m. per $\frac{1}{2}$ cc. kon neutraliseeren. Hoeveel meer is helaas niet te zeggen, daar deze uitkomsten zeer onverwacht waren en de 16000 d.l.m. muis als uiterste grens bij deze titraties was beschouwd. In ieder geval kan men zeggen, dat de met gemengd vaccin ingespoten dieren ver ten achter waren gebleven in immuniteit bij de caviae, die slechts tetanus-anatoxine in dezelfde hoeveelheid gekregen hadden.

Daarna werd het serum (van dezelfde hartpunctie afkomstig) der groepen 1 en 3 onderzocht op typhusagglutinatatie. Het resultaat was, dat voor de eerste groep van dieren de agglutinatatie voor twee typhusstammen een titer had van 20 resp. 40 à 80 (twijfelachtig). Paratyphus A agglutineerde spontaan. Paratyphus B agglutineerde met een serumverdunding 20, 40 à 80 twijfelachtig.

Voor de derde groep van dieren had de agglutinatatie voor

TABEL 12 (Proef 3).

Groepen.	1e injectie	Reactie	2e injectie na 11 dgn.	Reactie	Hartpunctie 14 dgn. na 2e injectie tetanus agglu- tinatie St. 1 St. 2 A. B.	2e hartpunctie 20 dgn. na 2e injectie tetanus d.l.m.	3e hartpunctie 56 dgn. na 2e injectie tetanus agglu- tinatie St. 1 St. 2 A. B.
A	1 cc. tetanus anatoxine	geene	1 cc. tetanus anatoxine	geene	> 50 < 100 d.l.m.	50—100 d.l.m.	< 200 —
B	2 cc. typhus- tetanus anatoxine	geene	2 cc. typhus- tetanus anatoxine	geene	> 50 < 100 d.l.m.	< 50 d.l.m.	iets < 200 niet duidelijk
C	1 cc. T.A.B. vaccin	geene	1 cc. T.A.B. vaccin	geene	—	80. 80 — —	— niet duidelijk

de twee bovengenoemde typhusstammen een titer van ongeveer 400 resp. 800. Paratyphus B agglutineerde nog in serumverduunning 600.

Hieruit mag men besluiten, dat voor de eerste groep de agglutinatie in het algemeen veel minder sterk is dan die voor de derde groep en dat dus bij het gebruik van gemengd vaccin T.A.B. het typhusvaccin in zijn werking sterk wordt benadeeld.

Als *derde proef* (zie tabel 12) werd als een tweede typhus-tetanusantitoxine-vaccin een mengsel gekozen, dat bestond uit gelijke deelen typhusvaccin T.A.B. en tetanusantitoxine No. 80.

Een groep A groot 8 caviae, kreeg 2 maal 1 cc. tetanusantitoxine met een interval van 11 dagen.

Een evengroote groep B kreeg 2 maal 2 cc. gemengd vaccin (typhusvaccin-tetanusantitoxine aa) met een interval als boven.

Een groep C evengroot, kreeg 2 maal 1 cc. T.A.B. vaccin, interval als boven.

Na 14 *dagen* hartpunctie. Het serum van de dieren van de groepen A en B werd onderzocht op zijn gehalte aan tetanusantitoxine, van groep B en C op typhusagglutinatie.

Het resultaat van het serum onderzoek van groep A en B was, dat (1e titratie) de muizen, die met serum van groep A waren ingespoten ongeveer in gelijke mate tetanus kregen en hieraan stierven, als de muizen, die met serum van groep B waren ingespoten: $\frac{1}{2}$ cc. serum der beide groepen kon nog geen 100 d.l.m. muis neutraliseeren.

Het agglutinatieonderzoek van de groepen B en C gaf voor B de mogelijkheid tot agglutinatie van twee typhusstammen tot een titer van nauwelijks 40: voor paratyphus A en B viel deze negatief uit.

Voor groep C was de agglutinatie voor de beide typhusstammen duidelijk 80. Paratyphus A en B eveneens negatief.

Na *twee weken* werden de groepen A en B wederom vergeleken, dus 4 weken na de 2e injectie. Een typhusagglutinatie werd niet verricht.

Het serumonderzoek (2e titratie) op tetanusantitoxine gaf voor groep A een neutralisatiewaarde van 50—100 d.l.m. muis (gedroogd toxine); dat van groep B kon nog geen 50 d.l.m. muis neutraliseeren († aan tetanus 2e dag), telkens

per $\frac{1}{2}$ cc. serum. Hier ziet men dus, dat de caviae, die 2 maal 1 cc. van het enkelvoudige tetanusanatoxine gekregen hadden, ruim 2 maal grootere immuniteit hadden dan de met gemengd vaccin ingespoten dieren.

Weer na *vier weken*, dus 8 weken na de tweede injectie, werd hartpunctie bij de overgebleven dieren verricht (3e titratie).

Het serum van groepen A en B werd onderling vergeleken.

Het serum van groepen B en C eveneens.

Bij de titratie op muizen, om de antitoxische titer van het serum tegen tetanus te leeren kennen bleek, dat terwijl het serum van de dieren, die met tetanusanatoxine waren ingespoten nog geen 200 d.l.m. per $\frac{1}{2}$ cc. kon neutraliseeren ($\dagger$ aan tetanus na 3 dagen) van de met gemengd vaccin ingespoten dieren $\frac{1}{2}$ cc. serum 200 d.l.m. muis (gedroogd toxine) zoover kon neutraliseeren, dat pas op den 8sten dag tetanus optrad. De typhusagglutinatie voor 2 stammen voor groep B zoowel als voor groep C was zeer onduidelijk; een verschil tusschen de groepen B en C werd niet gevonden.

Uit de titraties van deze derde proef, waarbij het gemengde vaccin op een andere wijze bereid was, valt weer zeer weinig te leeren, wat betreft de werking van het tetanusanatoxine; van het vaccin T.A.B. kan gezegd worden, dat het in het gemengde vaccin minder antigeenvermogen heeft dan het typhusvaccin alleen.

Vat men al deze uitkomsten met bovengenoemde twee verschillend bereide typhus-tetanusanatoxine vaccins samen, dan blijkt, wat betreft het optreden van tetanusantitoxine in het serum bij de genomen proeven, dat:

Proef 1.

Bij de eerste titratie (14 dagen na de 1e injectie) geen verschillen te bestaan tusschen de dieren, die met het enkelvoudig tetanusanatoxine en die met het gemengde vaccin zijn ingespoten.

Bij de tweede titratie (18 dagen na de 2e injectie) het voordeel sterk te liggen aan de zijde van de dieren, die met het gemengde typhus-tetanusanatoxine waren ingespoten 2:1.

Proef 2.

Bij de titratie der dieren, die het enkelvoudig vaccin

gekregen hadden, meer dan 2 maal zooveel antitoxine in het serum bezaten dan de dieren, die met de gemengde entstof waren ingespoten.

Proef 3.

Bij de eerste titratie er geen verschil in antitoxinegehalte van het serum tusschen de met het enkelvoudig tetanusantitoxine en de met gemengde entstoffen ingespotene was.

Bij de tweede titratie het voordeel aan de zijde van de dieren, die met het enkelvoudige tetusanantitoxine waren ingespoten.

Bij de derde titratie bevatte het serum der met de gemengde entstof ingespoten dieren meer antitoxine.

Overziet men nu al deze titraties dan blijkt ten opzichte van het optreden van tetusanantitoxine het voordeel evenzoovele malen aan de zijde te liggen van de dieren, die met de gemengde als van de dieren die met de enkelvoudige entstof zijn ingespoten, zoodat noch aan het met gemengde entstoffen, noch aan het met enkelvoudig antitoxine inspuiten den voorrang verleend kan worden.

Alles te zamen genomen mag men dan ook niet meer besluiten dan *dat bij het mengen van tetusanantitoxine met typhusvaccin, de werking van het eerste niet steeds verhoogd wordt*, zooals in de Fransche literatuur wordt beweerd (zie inleiding).

Evenwel behoeft hiermede de verdienste van het mengen van tetusanantitoxine met T.A.B. wat de werking betreft van het antitoxine, *nu* nog niet ontkend te worden; (zie begin van dit hoofdstuk).

Een overzicht van typhusimmunitet c.q. agglutinatie bij deze 3 dierproeven geeft betere resultaten met het enkelvoudige typhusvaccin, zoodat *het effect van het T.A.B. vaccin verminderd wordt door het gelijktijdig inspuiten met antitoxine*.

Zoodat tenslotte van het gecombineerde vaccin kan worden gezegd, dat het ter verkrijging van antitoxische tetanusimmunitet niet duidelijk bij het enkelvoudige antitoxine achterstaat, maar dat de immunitetswaarde voor typhus aanmerkelijk geringer is dan voor het typhusvaccin afzonderlijk.

* *

Naast de combinatie van tetanusanatoxine met typhus-vaccin werd het tetanusanatoxine gemengd met gelijke hoeveelheden diphtherie-anatoxine.

TABEL 13

Groepen	1e injectie	reactie	2e injectie 2 weken na 1e injectie	reactie	2 weken na 2e injectie hartpunctie tetanus diphtherie	8 weken na 2e injectie 2e hartpunctie tetanus diphtherie
I.	1 cc. tetanus anatoxine	—	1 cc. tetanus anatoxine	—	< 100 d.l.m. a	< 200 d.l.m.
II.	2 cc. tetanus- diphtherie- anatoxine	+	2 cc. tetanus diphtherie- anatoxine	+	< 100 d.l.m. b a > b	< 200 d.l.m. 1— 2+ 3+ 4+ 5+
III.	1 cc. diphtherie- anatoxine	+	1 cc. diphtherie- anatoxine	+	1— 2— 3— 4+ 5+	1— 2— 3— 4— 5+

Opmerkingen: Voor tetanusantitoxinetitratie als bij Tabel 1. Voor *diphtherieanatoxine*. zijn de opklimmende serumverduunningen gemerkt als 1, 2, 3, 4, 5. Waar dus de meeste + teekens staan is de minst krachtige immuniteit.

Een reeks caviae werd nu als volgt onderhuids ingespoten:

I. Een eerste groep kreeg onder de buikhuid tweemaal met een interval van twee weken telkens 1 cc. tetanusanatoxine.

II. Een tweede groep met hetzelfde interval tweemaal een injectie van 2 cc. tetanus-diphtherie-anatoxine aa.

III. Een derde groep kreeg tweemaal met twee weken tusschenruimte telkens 1 cc. diphtherie-anatoxine.

Na elke injectie werd den volgenden dag de inentingsplaats nagegaan en bleek bij de met enkelvoudig tetanus-anatoxine ingespoten dieren practisch geen huidreactie aanwezig, terwijl de dieren, die met het gemengde vaccin behandeld waren vrij sterke infiltraties hadden, evenals de caviae, die met diphtherie-anatoxine waren ingespoten. De infiltraten gingen echter steeds vrij snel terug (zie tabel 13).

Serumonderzoek na 20 dagen.

In de eerste plaats werd vergeleken de eerste met de tweede groep met het oog op de aanwezigheid van tetanusantitoxine.

Het serum van de dieren, die alleen met tetusanatoxine waren ingespoten, was in een hoeveelheid van $\frac{1}{2}$ cc. niet in staat om 100 d.l.m. muis te neutraliseeren: † aan tetanus na drie dagen, zonder zware tetanusverschijnselen den eersten dag.

Het serum van de dieren, die met gemengd tetanus-diphtherie-anatoxine waren ingespoten, kon eveneens geen 100 d.l.m. muis per $\frac{1}{2}$ cc. neutraliseeren; echter den eersten dag al sterk tetanus, den tweeden dag †.

Daar te hoog getitreerd was, kan men geen juiste gevolgtrekking maken; echter mag men toch met eenige zekerheid aannemen, lettend op het verloop bij de titraties op muizen, dat het serum der caviae, die met het enkelvoudig tetanus-anatoxine waren ingespoten meer tetanusantitoxine bevatte dan dat der dieren, die het gemengde vaccin tetanus-diphtherie-anatoxine gekregen hadden.

Om de groepen II en III te vergelijken op diphtherie-immuniteit werd de intracutane methode op caviae gevolgd zooals die door RÖMER is aangegeven. Aangezien ik evenwel zooveel intracutane injecties op hetzelfde dier moest geven, bleek het beschikbare huidoppervlak te klein en ging ik tot het konijn over. Eerst diende bepaald te worden in welke verdunning het gebruikelijke „Schick” toxine nog reactie gaf in de konijnenhuid. Aldus werden van het toxine, zooals bij den mensch voor de reactie van „Schick” wordt aangewend de volgende zes verdunningen gemaakt: 1 : 25; 1 : 20; 1 : 15; 1 : 10; 1 : 5; 1 : 1 en onverdund.

Hiervan werd nu 0.2 cc. intracutaan ingespoten in de geschoren konijnenrug. Na 24 uur kwam er al een duidelijke reactie bij verdunningen, die het meeste toxine bevatten.

In den loop van eenige dagen werden deze reacties veel sterker; in de verdunningen 1 : 5, 1 : 1 en onverdund trad zelfs uitgesproken necrose op. De verdunning 1 : 25 gaf nog een duidelijke plaatselijke reactie (roodheid).

Nu werd het serum der groepen II en III verdund: 1 : 10
1 : 25; 1 : 75; 1 : 250; 1 : 1000.

Het „Schick”toxine werd verdund dusdanig, dat er nog een zeer duidelijke reactie te verwachten was op het konijn n.l. 1 : 20. Daar het mengsel (serum en verdunde „Schick”toxine), dat ingespoten wordt 0.2 cc. moet zijn, waarvan 0.1 cc. „Schick”toxine-verdunning, moet dus nu het „Schick”, toxine verdund worden 1 : 10.

Vervolgens werd nu 1 cc. van elke serum-verdunning van iedere groep gemengd met 1 cc. 1 : 10 „Schick”toxine oplossing.

Als contrôle werd genomen 0.2 cc. „Schick” oplossing verdund 1 : 20.

In de geschoren huid van den konijnenrug werden nu rechts de vijf titratiemengsels der „diphtherie”-caviae, links die der „tetus-diphtherie-anatoxine”-caviae, telkens in een hoeveelheid van 0.2 cc. intracutaan ingespoten.

Na een dag was er al een lichte roodkleuring bij de sterkste serumverdunning links (de z.g. „geassocieerde” plaats), terwijl tevens de contrôle positief was. In den loop van de volgende drie dagen breidden aan de zijde, waar de mengsels met het serum van groep II waren ingespoten, de positieve reacties zich uit tot en met het mengsel, dat het meeste serum bevatte. Aan de „diphtherie” kant (serum der dieren van groep III) werden alleen reacties gezien bij de serumverdunningen 1 : 1000 en 1 : 250; de contrôle was sterk rood.

In het verdere verloop hielden in eenige dagen de roode verkleuringen weer op, de reactie der contrôle bleef nog langer bestaan.

Men ziet dus, dat de verdunde „Schick”toxine oplossing 1 : 10 in de hoeveelheid van 0.1 cc., die bekend is als duidelijk reactie te geven in de konijnhuid, voor het grootste gedeelte door het serum der „diphtherie”-dieren n.l. tot 1 : 75 geneutraliseerd was, terwijl bij de „gemengd ingespoten”-kant zelfs de verdunning 1 : 10 niet in staat was de reactie er van tegen te houden.

Daar natuurlijk een toevallige samenloop van omstandigheden bij deze uitslag niet was uit te sluiten, werd na 8 weken wederom hartpunctie gedaan bij de nog niet gepuncteerde dieren en het serum van de groepen als hierboven aan een herhaald onderzoek onderworpen.

De groep I, die met tweemaal 1 cc. tetanusanatoxine ingespoten was, neutraliseerde nog geen 200 d.l.m. per $\frac{1}{2}$ cc. serum, evenmin de groep, die met tweemaal 2 cc. tetanusdiphtherie-anatoxine ingespoten was: Groep II.

Voor beide groepen bleek tetanus $\dagger$ 2e dag, zoodat hier geen verschillen in tetanusimmunitet konden worden aangetoond. Het onderzoek op diphtherie-immunitet werd wederom als boven beschreven verricht.

Den volgenden dag was de contrôlereactie zeer duidelijk rood. In den loop van de volgende drie dagen werden de vier sterkste serumverduunningen aan de „geassocieerde” kant (de verduunning 1 : 10 bleef nog vrij) min of meer rood, echter niet zoo sterk als de contrôles.

Aan de „diphtherie”kant was alleen de meest sterke serumverduunning: 1 : 1000 iets rood. In den loop van twee volgende dagen verbleekten de reacties, de contrôles bleven nog iets rood en warm. Deze laatste verdwenen na enkele dagen eveneens.

Er bleek dus:

1e: dat de diphtherie-immunitet zoowel voor de enkelvoudig als gemengd ingespoten dieren gestegen was ten opzichte van den toestand van 20 dagen na de tweede injectie.

2e: dat nu een serumverduunning van 1 op 250 van de „diphtherie”-dieren; daarentegen slechts in verduunning 1 : 10 van de met gemengd vaccin ingespoten caviae in staat was de reactie op te heffen, die een bepaalde hoeveelheid diphtherie-toxine moest geven, of: De gemengd ingespoten dieren hadden een minder sterke diphtherieimmunitet dan de dieren, die met enkelvoudig diphtherie-anatoxine waren ingespoten.

Overziet men de uitkomsten van dit gemengd tetanusdiphtherievaccin allereerst ten opzichte van de tetanusimmunitet, dan blijkt dat bij het eerste onderzoek het voordeel was aan de zijde van diè dieren, die met het enkelvoudige tetusanatoxine waren ingespoten; bij het tweede onderzoek daarentegen was geen verschil merkbaar.

Aangaande de diphtherie-immuniteit (antitoxische titer) blijkt in de beide onderzoekingen het voordeel geheel te liggen aan de zijde van het inspuiten van het enkelvoudige diphtherie-anatoxine. Waarom bij het mengen van tetanusanatoxine met diphtherie-anatoxine proefondervindelijk de werking van het tetanusanatoxine min of meer gelijk blijft, terwijl die van het diphtherie-anatoxine vermindert, kan ik niet verklaren.

Resumeerende de resultaten van de immunisatie met deze beide gemengde vaccins (T.A.B.-tetanusanatoxine en diphtherie-anatoxine-tetanusanatoxine) kan men besluiten:

1e. dat in gemengde vaccins de werking van tetanusanatoxine min of meer onveranderd blijft, maar wel eenige neiging vertoont in zijn werking te verminderen.

2e. dat de specifieke werking van het bijgevoegde tweede vaccin, het T.A.B. respectievelijk diphtherie-anatoxine, geringer is dan de toepassing van het afzonderlijke vaccin T.A.B. respectievelijk diphtherie-anatoxine.

3e. dat het mengen van vaccins als regel *niet* is aangewezen.

HOOFDSTUK IV.

ENTING VAN MENSCHEN MET TETANUSANATOXINE.

Nadat bij een groot aantal caviae 10 cc. van het anatoxine No. 80 onderhuids was ingespoten en nooit een plaatselijke reactie, noch tetanus, hetzij lokaal of algemeen, vroeg of laat was opgetreden, werd na voorafgaand onderzoek op steriliteit, overgegaan tot het inspuiten bij menschen.

Alvorens tetanusanatoxine in te spuiten werd bij elk der proefpersonen een venepunctie gedaan. Het verkregen serum bleek bij muizen ingespoten nooit eenige toxiciteit te bezitten, tevens viel een onderzoek op tetanus-antitoxine negatief uit, daar muizen ingespoten met een mengsel van $\frac{1}{2}$ cc. phys. zoutopl., waarin 1 d.l.m. muis en $\frac{1}{2}$ cc. van het te onderzoeken serum, in denzelfden tijd aan tetanus te gronde gingen als een contrôledier, hetwelk in 1 cc. physiologische zoutoplossing 1 d.l.m. muis was ingespoten.

Aangezien het niet mogelijk is door een eenvoudige huid-reactie de antitoxische immuniteit bij tetanus te bepalen, moest naar een andere methode van vergelijking worden omgezien. Het kwam mij het meest praktisch voor de verkregen immuniteit der geënte personen te vergelijken met de passieve immuniteit, die verkregen wordt door inspuiting van de gebruikelijke prophylactische dosis tetanusserum.

Om deze grootte te kennen werd bij een persoon, die 24 uur te voren met 20 A.E. (tetanusantitoxine) was ingespoten, venepunctie gedaan en het serum op antitoxinegehalte onderzocht. Deze 20 A.E. neutraliseeren de hoeveelheid toxine, die $20 \times 40.000.000$ gram muis dooden, zoodat, wanneer we de hoeveelheid bloed op 5 L. stellen en aannemen dat alle antitoxine vrij in het bloed aanwezig is, 1 cc. bloed een hoeveelheid antitoxine bevat, die $800.000.000 : 5000$ gram d.l.m. muis neutraliseert, dit is 160.000 gram d.l.m. muis of 16.000 d.l.m. muis van 10 gram. Mijne uitkomsten op muizen leerden echter, dat na een tetanusseruminjectie van 20 A.E.,

één cc. serum nog geen 500 d.l.m. muis (gedroogd toxine) kon neutraliseeren.

Wanneer het mij nu mogelijk was met het anatoxine een dusdanige immuniteit te verkrijgen, dat $\frac{1}{2}$ cc. serum van den gevaccineerde 250 d.l.m. muis (gedroogd toxine) neutraliseerde, meende ik te mogen aannemen, dat er dan een voldoende weerstand tegen de tetanusinfectie bestond.

Immers deze te meten antitoxische titer is slechts een onderdeel, zelfs een klein onderdeel van den weerstand van het actief geïmmuniseerde lichaam, omdat hier de cellulaire immuniteit nog naast de humorale staat en gene als oorzaak van de laatste een belangrijke functie in afweer van infecties in casu tetanus moet toegezegd worden. Deze „réactivité acquise” is helaas niet te meten, maar in zijn sluimerende kracht zeer zeker te waardeeren, daar we uit serumtitraties na een z.g. „injection de rappel” kunnen nagaan, hoe er uit een zeer lage antitoxische titer in het bloed in zeer korten tijd een zeer hoge humorale immuniteit kan ontstaan. Uit dierproeven kon ik bevestigen, dat deze reactie op een hernieuwde inspuiting des te krachtiger is, naarmate het tijdsverloop tusschen de 1ste injectie (gevoelig makende) en de 2de inspuiting grooter is. (zie hoofdstuk I). Met het oog op den incubatietijd van tetanus is het dan ook niet gewaagd te zeggen, dat de humorale immuniteit door de vaccinatie opgewekt zeer veel lager kan zijn dan die na de prophylactische serum injectie en des te lager, naarmate de vaccinatie langer in het verleden ligt, omdat men immers de tetanus infectie als specifieke prikkel een werking toe mag schrijven als een „injection de rappel”. Hoe hoog deze humorale immuniteit minstens moet zijn is natuurlijk niet te zeggen, eendeels onmiddellijk al hierom niet, omdat we dan zouden moeten experimenteren op menschen met de zoo verraderlijke tetanusziektekiemen, anderdeels omdat er zulke persoonlijke verschillen zijn in gevoeligheid, die de mogelijkheid tot antitoxinevorming beheerschen.

Resultaten van de vaccinaties:

Proefpersoon T. kreeg als eerste injectie 1 cc. anatoxine; 5 weken later wordt venepunctie gedaan. Het serum wordt getitreerd op de aanwezigheid van antitoxine. Er bleek in

zooverre antitoxine in het bloed aanwezig, dat $\frac{1}{2}$ cc. serum gemengd met 1 d.l.m. ingespoten bij een muis deze langer dan 6 dagen in leven liet. Daarna kreeg T. als 2e injectie 1 cc. anatoxine. Twee weken hierna werd alvorens de 3e injectie te geven, nogmaals venepunctie gedaan. Terwijl het contrôledier in 4 dagen aan tetanus stierf, kon een $\frac{1}{2}$ cc. serum een muis tegen 2 à 4 d.l.m. beschermen. Twee weken na de 3e injectie bleek het serum $\pm$ 1000 d.l.m. muis per $\frac{1}{2}$ cc., te kunnen neutraliseeren, d.w.z. de actieve humorale immuniteit was dus ruim $4 \times$ grooter dan die na de seruminjectie van 20 A.E. Dit was dus 9 weken na de 1e injectie het geval.

Proefpersoon B. werden met een interval van 1 maand 2 injecties van 1 cc. anatoxine gegeven. Het serum bevatte na de 1e injectie geen aantoonbare hoeveelheid antitoxine. Twee weken na de 2e injectie kon door $\frac{1}{2}$ cc. serum 3 à 5 d.l.m. muis geneutraliseerd worden. Eén week na de 3e inspuiting ($7\frac{1}{2}$ week na de 1e injectie) neutraliseerde het serum meer dan 250 d.l.m. per cc. Er werd helaas niet hoger getitreerd, zoodat niet te zeggen is hoeveel grooter het antitoxinegehalte in werkelijkheid was.

Proefpersonen P. en L. kregen ieder met 1 maand interval 1 cc. anatoxine. Eén maand na de 1e injectie bleek $\frac{1}{2}$ cc. serum van L. nog niet één d.l.m. muis te neutraliseeren: Het dier kreeg zware tetanus, ging echter niet dood. Van P. is de waarde na de 1e inspuiting niet bekend. Eén week na de 2e injectie werd een vene-punctie verricht en hierna de 3e injectie van 1 cc. anatoxine gegeven. Terwijl na de 2e injectie het serum van P. niet in staat was per $\frac{1}{2}$ cc. 1 à 2 d.l.m. te neutraliseeren, neutraliseerde dat van L. 2—5 d.l.m.

Eén week na de 3e injectie (dus $6\frac{1}{2}$ week na de 1e injectie) waren de resultaten van P. zoodanig, dat het serum per $\frac{1}{2}$ cc. nog geen 250 d.l.m. neutraliseerde (muis tetanus † tweede dag), terwijl L. in staat was nagenoeg 1000 d.l.m. muis per $\frac{1}{2}$ cc. serum te neutraliseeren (titratie muis kreeg matige tetanus).

Merkwaardig was, dat terwijl de gevaccineerden T., B. en P. geen reactie hadden vertoond, bij L. daarentegen na de anatoxine-injectie een lichte roodheid was waar te nemen. In het geheele verloop van de immunisatie blijkt L. beter onvatbaar te worden; vooral na de 3e injectie blijkt er tus-schen P. en L. een duidelijk verschil te bestaan.

Proefpersonen W., Th. en S werden eveneens gelijktijdig gevaccineerd. De eerste 2 injecties met een interval van 3 weken, de derde één week na de tweede.

De venepunctie had plaats bij *W.* en *Th.* 12 dagen na de 3e injectie (dus $5\frac{1}{2}$ à 6 weken na de 1e injectie). Er kwamen groote verschillen voor den dag.

W. kon per $\frac{1}{2}$ serum meer dan 2000 d.l.m. muis neutraliseeren. Hooger was door mij niet getitreerd.

Th. kon per $\frac{1}{2}$ cc. serum nog geen 250 d.l.m. neutraliseeren, lager was niet getitreerd.

S., die drie weken later, dus 33 dagen na de 3e injectie gepuncteerd werd, was in staat nog geen 250 d.l.m. per $\frac{1}{2}$ cc. serum te neutraliseeren († muis na 6e dag).

Vat men de uitkomsten bij deze weinige personen verkregen samen, dan blijkt:

1e. dat het met anatoxine No. 80 mogelijk is bij menschen in het serum tetanusantitoxine te voorschijn te roepen.

2e. dat met de gebruikte injecties van 1 cc. dit eerst na de 3e in ruime mate optreedt.

3e. dat er groote persoonlijke verschillen bestaan, die de uitkomsten beheerschen.

4e. dat met deze hoeveelheden anatoxine in het algemeen niet eerder dan na 6 weken een voldoende antitoxinegehalte van het bloed aanwezig is.

HOOFDSTUK V.

BETEEKENIS VAN DE UITVLOKKING VAN RAMON ALS WAARDEBEPALING VOOR HET TOXINE RESP. ANATOXINE EN ANTITOXINE.

Dit hoofdstuk heeft geenszins de pretentie het verschijnsel van de uitvlokking in wezen te verklaren. Zooals bekend is, wijst RAMON en met hem vele andere Fransche onderzoekers nog steeds op het feit, dat men in de uitvlokking-reactie, zoowel bij titratie van tetanus- als bij de titratie van diphtherietoxine, -anatoxine en -antitoxine een buitengewoon eenvoudig middel bezit om in vitro eenerzijds de antigeenwaarde (antitoxineverwekkende en -bindende) van toxine of anatoxine en anderzijds de neutraliseerende (toxinebindende) waarde van het serum te bepalen.

Het feit, dat vele sera neerslagen geven als men ze mengt met hun overeenkomstige toxinen, is reeds lang bekend. In 1909 deden CALMETTE en MASSOL, hierover al mededeelingen ten opzichte van het titreeren van het cobra-antitoxine. In 1919 en 1920 publiceerden NICOLLE, CÉSARI en JOUAN^{31. 32} hun titraties van diphtherie- en tetanustoxine, waarbij ze het toxine of het serum, dat ze wilden titreeren, mengden met 10% gelatine en hierop het homologe serum of toxine in opklimmende hoeveelheid goten. Ze zouden goede overeenkomst gekregen hebben tusschen de waarden in vitro en vivo, en schrijven hun succes toe aan het met ammoniumsulfaat geconcentreerde toxine, dat ze gebruikten.

RAMON bracht dus eigenlijk in principe niets nieuws, toen hij er op wees, dat wanneer men bij elkaar voegt toxine en specifiek antitoxine er na bewaren bij kamertemperatuur een z.g. uitvlokking kan optreden. De groote verdienste van RAMON ligt echter in zijn uitspraak, dat deze uitvlokking het allereerst optreedt dáár (floculation initiale), waar toxine en specifiek antitoxine in elkaar neutraliseerende hoeveelheden bij elkaar zijn gebracht. Voor versche toxinen geldt, dat wanneer men ze titreert met hetzelfde serum en bij dezelfde

temperatuur, de uitvlokkingsstijd recht evenredig toeneemt met de grootte van de d.l.m. Van het anatoxine kon RAMON³³ mededeelen: „Le pouvoir antigène est d'autant plus considérable que le temps de flocculation est plus réduit”. Zoo zag dan ook DESCOMBEY het formoltoxine bij langer verblijf in de broedstoof zijn antigeenvermogen inboeten, terwijl de uitvlokkingsstijd langer werd. Samen met RAMON³⁴ zegt DESCOMBEY, dat vooral bij tetanustoxinetitratie deze uitvlokkings van zoo groote waarde moet zijn, omdat bij dit toxine het giftigheidsvermogen zoo labiel is en dus daarom niet goed is te titreeren in vivo. Noodig is in de eerste plaats een „sérum convenablement choisi”, z.g. goed uitvlokkend serum. Verder zagen zij de initiale uitvlokkings ook steeds in het neutrale mengsel optreden.

Al spoedig echter gaf SCHOLZ³⁵ een zeer scherpe critiek hierop. Hij meent, dat er voor de titratie in vitro voor één gifteenheid tweemaal zooveel antitoxine (RAMON) noodig is als in vivo, omdat die ééne gebonden antitoxine-eenheid identiek is met de antitoxische energie van 100 caviae. Of evenwel een dergelijke voorstelling van den gang van zaken bij de neutralisatie van toxine en antitoxine recht van bestaan heeft, mag, in aanmerking genomen de moderne beschouwingen van het wezen dezer reactie, ten zeerste betwijfeld worden (BORDET c.s.). Met de methode in vitro, zegt SCHOLZ, zijn de verschillen 3 à 400 maal grooter dan bij titratie in vivo, zoodat hij dan ook meent, dat deze methode voor practisch gebruik niet in aanmerking kan komen. Dit alles geldt voor het tetanustoxine resp. antitoxine.

Maar ook ABT en ERBER³⁵ kwamen bij hunne onderzoekingen over het titreeren van tetanustoxine—antitoxine tot de uitspraak, dat tetanustoxine resp. antitoxine bij hunne uitvlokkingen lang niet die regelmatige uitkomsten gaven als bij diphtherieuitvlokkings. De tetanustoxinen, die ze gebruikten, waren ongeveer van dezelfde sterkte en vlokten met hun serum vrijwel op dezelfde hoogte in de serie uit na 2 à 3 uur in een waterbad bij 45 graden C. gestaan te hebben. Bij hogere temperatuur zouden de uitkomsten onregelmatiger worden. Met hun sera kregen deze onderzoekers veel minder juiste waarden. De snelheid van uitvlokkings was zeer verschillend en daarom zou volgens hen in de tetanus-meer dan in de diphtheriesera een colloïdebeschermer voorkomen.

Zij komen tenslotte tot het resultaat, dat $\pm 60\%$ van de sera overeenkomst geeft tusschen vivo en vitrotitraties en schrijven bij de verschillen der rest nog een grooten invloed toe aan de individueele gevoeligheid der proefdieren, zoodat bij toename van dit aantal de overeenkomst tusschen vivo- en vitroproeven nog meer aan den dag zal treden. Deze laatste opmerking maakt echter den indruk van het verlangen de uitkomsten in vitro sluitend te maken met die in vivo. ABT en ERBER willen tenslotte de uitvlokking stellen boven de methode in vivo uit het oogpunt van tijd en geld.

Naar aanleiding van zijn proeven over de uitvlokking kon SCHMIDT³⁷ mededeelen, dat de titraties van een groot aantal tetanussera met bijna zekerheid kan plaats hebben in vitro (overeenkomst met ABT en ERBER). Daar hij echter met Fransch serum, alleen met Fransch toxine meer regelmatige uitvlokkingen kreeg in de buurt van het neutrale punt, schijnt volkomen homologe herkomst een rol te spelen en kan dus de uitvlokking *alleen* niet gebruikt worden als waardebepaling en dient dus iedere uitvlokking telkens gecontrôleerd te worden door titratie op dieren. Bij zijn experimenten zag hij soms een in meerdere buizen tegelijkertijd optredende gelijkwaardige uitvlokking; soms niet een uitvlokking op het neutrale punt, zoodat hij contrôle aanraadt door het uitvlokkende mengsel bij dieren in te spuiten.

Al deze onregelmatigheden bij de uitvlokking van tetanus-(ana)toxine-antitoxine werden door KALIC³⁸ samengebracht onder den naam „floculations non spécifiques”. Hij drukt zich buitengewoon voorzichtig uit door te zeggen, dat als men de z.g. „floculation fausse” zou kunnen onderscheiden van de ware uitvlokking, deze methode mogelijk in aanmerking zou kunnen komen om de proeven in vivo in vitro te contrôleren. De eigenschappen van de valsche uitvlokking zijn volgens hem: het snel optreden, troebel zijn en blijven en hoog liggen in de serie der uit te vlokken buizen. De ware uitvlokking ligt lager in de serie, verschijnt later en vertoont behalve de volgende kenmerken, namelijk 1. troebel worden, vlokken en ophelderen of 2. helder blijven gedurende het geheele uitvlokkingsproces onafhankelijk van den tijd van verblijf in het waterbad, ook soms nog de kenmerken van de valsche uitvlokking. KALIC zag verder in de serie soms drie zônes van uitvlokking, soms geen uitvlokking

in de buis, die overeenkomen moest met de titratie in vivo. Hij komt dan ook tot het lage cijfer van 39 % overeenkomst.

In een zeer uitgebreid artikel over toxoïden zegt BÄCHER ³⁹, dat de uitvlokking een speciale eigenschap moet zijn van vele toxinen, hetzij ten gevolge van de eigenaardigheid van de gebruikte stam, hetzij als gevolg van bepaalde inwerkingen bij de toxinevorming.

Hiervoor zou ook het zoo buitengewoon goed vlokken der min of meer avirulente toxinen, die RAMON, BERTHELOT, GRASSET en AMOUREUX ⁴⁰ in bouillon met galtoevoeging konden verkrijgen, pleiten. Laatste onderzoekers beweren wel, dat ze immuniseeren, maar een juiste antigeenwaarde is niet bewezen. BÄCHER zegt dan ook terecht en scherp verder, dat een behouden vlokkingvermogen er op wijst: „dasz jene Schädlichkeiten nicht oder nur wenig eingewirkt haben, die im Stande sind in gleicher Weise das antigene Vermögen und die Flockungsfähigkeit zu beeinträchtigen”.

Ook LÖWENSTEIN die bij zijn eerste onderzoeken met versche sera in beginsel de bevindingen van RAMON kon bevestigen, laat zich naderhand minder optimistisch uit. Zoowel bij de uitvlokking van de sera als van de anatoxinen kreeg hij eclatante verschillen met hare waarden in vivo, zoodat hij meent dat de eigenschappen van het antigeen juister te bepalen zijn met de „Bindungswert” zooals deze bij diphtherie werd vastgesteld volgens BÄCHER, KRAUS en LÖWENSTEIN ⁴¹. Hetzelfde konden ISABOLINSKI en GITOWITSCH ⁴² mededeelen. Ze konden goed vlokkende anatoxinen krijgen met slecht antigeenvermogen.

Deze bindingswaarde wordt berekend door bij 2 A.E. (EHRlich) een bepaalde hoeveelheid (ana)toxine (waarvan de bindingswaarde te bepalen is) te voegen, dusdanig, dat men na dit mengsel $3/4$ uur bij kamertemperatuur te hebben laten staan hieraan een L + dosis voor een cavia (bekend toxine) toevoegt en wederom na een verblijf van $3/4$ uur bij kamertemperatuur dit geheele mengsel bij een cavia inspuit. Sterft het dier in 3 à 4 dagen aan tetanus, dan is juist die hoeveelheid (ana)toxine toegevoegd, die in staat is 1 A.E. te neutraliseeren. Hoe meer (ana)toxine men in den beginne moet toevoegen om deze A.E. te binden, d.w.z. hoe grooter de „Bindungswert” van dit (ana)toxine is, des te geringer bindend- c.q. antigeenvermogen.

Terwijl RAMON, ABT en ERBER en met hen vele anderen in de uitvlokking zien een zichtbaar worden van de specifieke binding tusschen toxine en antitoxine, zijn anderen van meening, dat beide processen naast elkaar verlopen. BRONFENBRENNER en REICHERT ⁴³ konden bij hun proeven over botulismus aantonen, dat door zuurtoevoeging uit een toxisch filtraat het praecipitinogeen was neer te slaan. De bovenstaande vloeistof had iets aan toxiciteit verloren. Het neerslag was na neutralisatie en oplossing in staat met het specifieke serum uitvlokkingen te geven. De groote overeenkomst tusschen de titraties in vivo en vitro die zij bij diphtherie erkennen, berust volgens hen op de gelijkheid van de voedingsbodem en de eenheid van de bacil. (PARK en WILLIAMS No. 8).

Ook DARZINE ⁴⁴ meent, dat, wanneer het tetanustoxine zich steeds aan één of meer goed bepaalde fracties bond, de uitvlokking evengoede resultaten zou geven als bij diphtherie. Hij deelt verder de sera in naar de uitvlokkingstijd. Hoe sneller een serum uitvlokt, des te minder overeenkomst tusschen de waarden in vivo en vitro.

Hij vlokte verschillend oude ongefiltreerde tetanuscultures uit en zag dat het flocculaat, dat hij met de jonge cultures verkreeg, hoofdzakelijk uit bacterielichamen bestond en langzamerhand met de ouderdom van de cultuur toenam in homogeniteit. Bij het centrifugeeren van ongefiltreerde cultures zag hij de uitvlokkingstijdtoene men met den duur van het verblijf in de centrifuge. Hij meent uit dit alles te mogen besluiten, dat de bacteriën en sporen een rol spelen bij de uitvlokking, tevens „précipitation”, „agglutination” en „floculation” onder te mogen brengen onder één naam, „floculation”.

Echter is de uitvlokking die DARZINE verkreeg beter te rangschikken onder de „niet-specifieke” uitvlokkingen, zooals er toch door vele stoffen tot stand gebracht kan worden.

DARZINE krijgt bij zijn titratieproeven 47% overeenkomst. De uitvlokking zelf is volgens hem een „processus ininterrompu”. Het eind ervan is niet scherp aan te geven; centrifugeert men en zet men de bovenstaande vloeistof weer met versch serum in het waterbad, dan krijgt men opnieuw een uitvlokking.

Als men tenslotte de Fransche literatuur als één geheel

beschouwt tegenover de Duitsche, dan komt men tot de gevolgtrekking, dat vooral ten opzichte van het tetanustoxine respectievelijk-anatoxine, de laatste de nadruk legt op de „Bindungswert” (zie vroeger) als waardebepaling, terwijl de eerste slechts aan de uitvlokking vasthoudt en van de B.W. zelfs geen melding maakt.

Met het oog op deze sterke verdeeldheid in waardeering van het phenomeen van de uitvlokking bij tetanus in de eerste plaats, verder in aanmerking nemende de aan bijna zekerheid grenzende regelmaat, die steeds door anderen en mij ook bij diphtherietitraties in vitro gezien werd, werd door mij een poging gewaagd te trachten aanknoopingspunten te vinden, om deze uitvlokking als waardebepaling bij mijn toxinen en naderhand anatoxinen aan te nemen en aan te bevelen.

Uitvlokkingsproeven:

Allereerst werd getracht met een gegeven toxine en een gegeven serum een uitvlokking te verkrijgen. Als toxine werd gebruikt een gedurende bijna twee jaar onder toluol bewaard tetanusgif, dat oorspronkelijk een d.l.m. muis 1 : 100.000 had. Het serum stamde van een aderlating bij een hoog geïmmuniseerd paard, die voor eenige dagen had plaats gevonden, was zonder conserveermiddel en had een waarde van ± 5 A.E. (EHRlich) = 330 Amerikaansch.

De methode, die gevolgd werd, was die, zooals indertijd aangegeven door ABT en ERBER (zie begin van dit hoofdstuk). Daar de laatsten werkten met een gedroogd serum, dat ze zoodanig oplosten dat 1 cc. 200 Amerikaanse eenheden bevatte, werd het mij ter beschikking staande serum op deze waarde verdund; aldus in een verhouding dat 2 cc. serum werden aangevuld met 1.3 cc. physiologische zoutoplossing. In elk buisje van een serie van twaalf werd nu 4 cc. van het toxine afgepipetteerd, waarna er in de eerste 0.10 cc. verdund serum als boven, in de tweede 0.02 cc. serumverdunding meer, etc. In elke buis opvolgend in de serie kwam dus steeds een hoeveelheid verdund serum meer ter waarde van $\frac{2}{100} \times 200$ A.E. = 4 A.E. (Amerikaansche eenheden). De inhoud werd gemengd en het geheel gezet in een waterbad van 45°—50°. Gedurende de twee uur, die volgden, werd

er een zeer lichte opalescentie waargenomen, daarna trad er in de buis, die 0.24 cc. serum bevatte, een zeer fijne vlokkenregen op, die steeds grover werd. De antitoxine bindende waarde (antigeenwaarde) kon hieruit berekend worden als volgt $\frac{0.24}{4} \times \frac{2}{3.3} \times 330 = 12$ A.E. (Amerikaansch). In hoeverre er in de optimum buis een neutraal mengsel aanwezig was, werd niet nagegaan.

Door deze proef werd men dus ongeveer ingelicht welke verhouding men moest kiezen bij de titreering van andere toxinen tegenover ditzelfde serum.

De waarde van bovengenoemd toxine gevonden, werd omgerekend in Internationale eenheden. $\frac{12.5}{6.6} \times 12 = 22.7$. Gezorgd werd nu, dat deze waarde ongeveer in het midden van de reeks buizen kwam te liggen. Er werd nu uitgegaan van 3 cc. toxine in elke buis. Het serum werd verdund 1 : 6.25, bevatte dus nu 100 A.E. (Internationaal) per 1 cc. In de minimum buis kwam zooveel verdund serum dat dit per cc. toxine 20 A.E. vertegenwoordigde. Elke volgende buis bevatte per cc. toxine 1 A.E. meer.

Het toxine 102 B. werd aldus ingezet en vlokte na twee uur ongeveer als toxine 102A.: fijne vlokkenregen. De A.W. hieruit berekend bedroeg 25. Toxine 103 als boven ingezet gaf een uitvlokkingsstijd: K.f. $> 3 < 3\frac{1}{4}$ uur en een A.W. 24.

Toxine 104 gaf in alle buizen troebeling. In buis 3 trad na 5 uur een zeer fijne uitvlokking op (geen fijne vlokkenregen). In de naburige buizen eveneens. Tenslotte kan men deze uitvlokking(?) door de geheele serie waarnemen. Nergens ziet men een volledig worden, in alle buizen blijft het flocculaat zweven.

Ook met hogere en lagere serumdosen was geen duidelijk resultaat te bereiken, ook niet met het eerst te laten staan bij 0° en daarna in het waterbad bij $\pm 50^{\circ}$ C. te plaatsen.

Met toxine 105 zijn eveneens geen duidelijke resultaten te verkrijgen.

Toxine 107 gedroeg zich het meest eigenaardig. In de eerste plaats was de uitvlokkingsstijd (K.f.) ongeveer 12 uur, dus zeer lang, de buizen werden al spoedig zeer onregelmatig troebel; er ontstonden op een gegeven oogenblik vlokken, die groot en donzig werden, geen fijne vlokkenregen. Bij herhaling bleek de uitvlokking met hetzelfde serum in dezelfde concentraties en zelfde hoeveelheden een langere tijd nodig

te hebben. De buizen waren weer zeer onregelmatig troebel. De buis, die het eerst uitvlokte*), bleef ook bij herhaalde proeven vrijwel dezelfde plaats behouden in de serie. Daar de troebelheid toegeschreven werd aan bacterieele verontreinigingen, werd, waarop steeds door SCHOLZ in 1924 is gewezen, aan de toxinen 0.5 carbol toegevoegd en bij de uitvlokking, die nu verkregen werd, waren de buizen veel minder troebel.

Om uit te maken of de eerste uitvlokking optrad in de buis waarin toxine en antitoxine in neutrale verbinding aanwezig waren, werd deze buis, benevens een buis waar minder en een buis waar meer serum in aanwezig was, gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof werd nu bij elk van deze mengsels afgegoten. Bij witte muizen werden nu mengsels ingespoten van 1 cc., telkens bestaande uit $\frac{1}{2}$ cc. van de inhoud van één der drie bovengenoemde buizen en $\frac{1}{2}$ cc. physiologische zoutoplossing, waarin 20 d.l.m. muis (toxine-oplossing) was opgelost. Deze muizen bleven volkomen gezond, terwijl het contrôledier met 20 d.l.m. den volgenden dag aan uitgesproken tetanus stierf, zoodat zelfs een buis met minder serum dan de eerst vlokkende, nog een groote hoeveelheid vrij antitoxine bleek te bevatten. Dit is des te merkwaardiger, omdat SCHMIDT kon aantonen, dat het neutrale mengsel in het waterbad aan giftigheid toeneemt; wel is waar weinig, maar volgens hem aantoonbaar, m.a.w. had één der bovengenoemde en onderzochte buizen het neutrale mengsel bevat, dan moest zeker met 20 d.l.m. muis een dusdanige toxiciteit van het ingespoten mengsel zijn ontstaan, dat de hiermede ingespoten muis aan tetanus moest gestorven zijn.

Bij deze inleidende proeven was dus bewezen, dat het mogelijk was een uitvlokking te verkrijgen; dat enkele toxinen in korten tijd regelmatig vlokten; dat andere onregelmatige uitvlokkingen gaven (No. 107), zoowel wat betreft het verloop der uitvlokking: geen fijne vlokkenregen, troebelheid der buizen in het begin; als aan het eind: geen neerslag.

*) Ik spreek hier en in het vervolg steeds van eerste uitvlokking en niet van „initiale” omdat dit laatste een goed omschreven begrip dient te zijn, in der tijd door RAMON bij zijne titraties in vitro bij diphtherie ingevoerd: eerst vlokkende buis met *neutraal* mengsel.

Al deze onregelmatigheden in mijne uitvlokkingsproeven wezen er op, dat er nog onbekende factoren zijn, die de regelmaat hierin verstoren. Door de welwillendheid van Dr. TASMAN werd mijne aandacht gevestigd op de niet volkomen reinheid, waarin het glaswerk verkeerde, dat ik gebruikte. Daar zoo goed als niets bekend was van het colloïd-chemisch gebeuren bij het uitvlokkingsproces, kon men aan elke verontreiniging een rol toeschrijven en diende deze dus te worden uitgeschakeld.

De beteekenis van het chemisch zuiver glaswerk werd nu aan uitvoerige uitvlokkingsproeven getoetst (Proef I, II, en III). Eendeels werden buizen gereinigd met borstels en daarna in gewoon leidingwater uitgespoeld: z.g. „*vuile*” buizen; anderdeels werden buizen gedurende een nacht in een chroomzuuroplossing gezet, die bereid was door samenvoeging van gelijke deelen 10% Kalium bichromaat en geconcentreerd zwavelzuur. Hierna werden ze gedurende 2 uur uitgestoomd en gedroogd: z.g. „*schoone*” buizen.

Proef I.

Het serum, een oud serum ($\pm$ 4 A.E. volgens EHRLICH), werd verdund 1 : 5. Het toxine was No. 118. Nu werd 5 maal een gelijke serie ingezet van 11 buizen met „*vuile*” en 5 maal een gelijke serie met „*schoone*” buizen. In iedere buis werd 3 cc. toxine met $\frac{1}{2}$ % carbol afgepipetteerd. Het verdunde serum werd in een dusdanige hoeveelheid toegevoegd, dat de eerst vlokkende buis in het midden kwam te liggen (uit een vóórproef bekend). Het geheel kwam in een groot waterbad bij 49 à 50°.

Gaat men de 5 series van „*vuile*” buizen na, dan ziet men in de:

1e serie: na $\pm$ 12 uur een troebelheid optreden, die zich onregelmatig over de serie uitbreidt en sterker wordt. Langzamerhand ontstaan de vlokken. Na $\pm$ 19 uur is er in buis 4 de sterkste troebeling met de grootste vlokken; van een fijne vlokkenregen is geen sprake. Men kan niet zeggen dat in één der buizen eerder een uitvlokking optreedt dan in de andere.

2e serie. Ongeveer als boven, troebelheid sterk. In geen enkele buis treedt er vlokking op.

3e serie. De troebelheid is hierin minder uitgesproken. Na $\pm$ 19 uur zijn regelmatige fijne uitvlokkings in de buizen 3, 4, 5, en 6. Geen der genoemde vlokt eerder dan de ander.

4e serie. Ook hier treedt door de geheele serie langzamerhand een troebeling op; ten slotte zijn alle buizen, de eerste uitgezonderd, zeer sterk troebel. Na 19 uur vlokt zeer sterk buis 1: de inhoud is helder. Verder is er een minder sterke uitvlokking in buis 6. Geen eerste uitvlokking.

5e serie. Langzamerhand wordt de reeks in zijn geheel sterk troebel. Na 19 uur uitvlokking in buis 3.

Met „schoone” buizen krijgt men de volgende resultaten:

1e serie. Na $\pm$ 13 uur wordt het maximale gedeelte van de serie iets troebel en breidt zich naar minimum uit. Na 14 uur 50 min. vlokt heel duidelijk buis 6 met fijne vlokkenregen, waarin de vlokken steeds grooter worden. Tenslotte is na 19 uur de geheele serie buizen helder van inhoud, alleen buis 6 is krachtig uitgevlokt met groote vlokken.

2e serie. Na $\pm$ 13 uur is hier troebelheid, vooral sterk aan het einde van de reeks. Na $\pm$ 14 uur 30 min. begint er een uitvlokking in buis 6. Toestand na 19 uur is dan: in buis 1 en 2 zijn groote vlokken, krachtige uitvlokking, inhoud van de buis is helder. Buis 6 vlokt eveneens: inhoud iets troebeler.

3e. serie. In den loop van 13 uur wordt ook hier de inhoud der buizen aan het einde van de serie meer troebel. Na $\pm$ 15 uur vlokt in vrij troebel milieu buis 6. Deze uitvlokking breidt zich naar rechts zoowel als naar links uit, zoodat tenslotte de toestand na 19 uur is: eerste drie buizen helder, de rest troebel, sterkste uitvlokking in buis 6.

4e serie. Na 13 uur is er een dubieuze uitvlokking in buis 5 in licht troebele omgeving. Een uur later is de uitvlokking duidelijk en breidt zich over de naaste omgeving uit. Eerste uitvlokking aldus in 5.

5e serie. Na zeer dubieuze uitvlokkings in min of meer troebele omgeving komt er na 15 uur een uitgesproken uitvlokking in buis 6, terwijl de inhoud in het verloop tot 19 uur na de inzet der proef opheldert. De uitvlokking breidt zich in de naburige buizen alleen naar links uit („minimale” buizen).

Overziet men deze feiten, dan dient allereerst opgemerkt te worden, dat het serum zeer oud was, zonder conserveermiddel was bewaard geworden en dat carbol is toegevoegd aan het toxine hetgeen zooals later zal blijken van groote invloed is op de gang der uitvlokking. Daar deze omstandigheden voor „schoone” zoowel als voor „vuile” buizen gelijk bleven, mogen de resultaten van dit onderzoek vergeleken en de afwijkingen tusschen de „schoone” en de „vuile” series toegeschreven worden aan de meerdere of mindere zuiverheid van het glaswerk.

Overzicht der „schoone” series.

Hierin werden van de vijf series in drie zeer krachtige uitvlokkingen waargenomen n.l. in de 1e, de 2e, en de 5e serie. De eerste uitvlokkingen waren in de respectievelijke series te zien in buis 6; buis 6 (1 en 2); buis 6; buis 6.

Overzicht der „vuile” series.

Hierin werd slechts in serie 4 een krachtige uitvlokking waargenomen. Eerste uitvlokkingen voor de vijf series in de buizen 4?; geen eerste uitvlokking; 3.4.5.; 1; 3. De eerste uitvlokking is daarom zoo moeilijk af te lezen omdat de inhoud der buizen zoo sterk troebel wordt.

Voor de „schoone” buizen krijgt men dus meer regelmaat in de uitvlokkingen, de uitvlokkingstijd is vrij constant en kleiner, de inhoud blijft helderder, de waarden liggen hoger.

Voor de „vuile” zijn de resultaten veel onregelmatiger.

Proef II.

Deze werd gedaan met een ander toxine No. 119, dat met 0.5 % carbol voorzien was. Overigens was de proef gelijk aan I. De uitvlokking trad in het algemeen sneller op. De resultaten waren hier voor de „schoone” buizen veel regelmatiger dan voor de „vuile”. In de eerste traden krachtige uitvlokkingen op, terwijl de buizen daarbij helder bleven. De eerste uitvlokking ligt bij de „schoone” serie regelmatig in buis 1 en 2 van de serie en komt na ± 16 uur. Bij de „vuile” is er soms na 30 uur nog geen uitvlokking te constateeren. Eerste

uitvlokkingen bij de „vuile” series soms hier en daar in heldere of troebele omgeving, min of meer sterk vlokkend.

Proef III.

Hier werd geëxperimenteerd met een ander serum. Dit was vrij versch, van een ander paard afkomstig. Toxine met 0.5% carbol als boven.

Terwijl bij de „schoone” buizen al snel, na 3 à 4 uur een eerste uitvlokking in de opvolgende series optreedt aldus: in serie 1. buis 4 en 5; in serie 2 buis 4 en 5; in serie 3 buis 4; in serie 4 buis 5 en 6; in serie 6 buis 4 en 5, blijft de inhoud helder.

In de „vuile” series treden deze uitvlokkingen veel onregelmatiger en later op n.l. in serie 1 geen eerste uitvlokking; in serie 2 geen duidelijke eerste uitvlokking; in serie 3 buis 6; serie 4 buis 1, 3 en 5; in serie 5 buis 2.

Resumeerende kan men concludeeren:

1e. In goed gereinigde buizen is het proces van de uitvlokking meer te overzien en vindt men meer regelmaat in deze uitvlokking.

2e. De uitvlokkingstijd, de K.f., is van groot belang met het oog op de factoren die de regelmaat in de uitvlokkingen verstoren.

(Vergelijk de uitkomsten van Proef I met die van Proef III).

3e. De uitvlokkingstijd wordt grooter in minder goed gereinigde glaswerk, terwijl de troebelheid der mengsels toeneemt.

4e. De duur van den uitvlokkingstijd is afhankelijk van de aard van het serum (zie de uitkomsten van de proeven II en III met verschillende sera) en van deszelfs ouderdom.

5e. Hoe kleiner de K.f., des te minder kans op onregelmatigheden bij het minder goed gereinigde glaswerk. Bij uitvlokkingsproeven van diphtherietoxine-antitoxine ziet men dan ook geen verschil tusschen de uitvlokkingen in „schoone” en „vuile” buizen, in overeenstemming met het sneller uitvlokken dezer mengsels.

6e. Tenslotte is met het oog op de langere uitvlokkings-tijden het gebruik van niet goed gereinigd glaswerk te ont-raden bij titraties van tetanustoxine-antitoxine.

Eindelijk werd nog nagegaan in hoeverre er een reproduceerbare regelmaat was in een serie ten opzichte van het eerst vlokkende mengsel in goed gereinigd glaswerk. Als toxine werd genomen toxine No. 120, met een 0.5 % carbol; het serum (± 5 A.E.) bevatte 1⁰/₁₀₀ superol. Nadat door een voorproef uitgemaakt was, waar in de serie het eerst uitvlokkend mengsel lag, werden 10 series elk van 11 buizen in een waterbad gezet van ± 49 à 50^0 . Ongeveer verscheen er gelijktijdig in dezelfde buis van iedere serie een zeer fijne uitvlokking, die in de loop van meerdere minuten toenam en zich over de naburige buizen uitbreidde.

Uitgaande van deze feiten werd nu een aantal toxinen, in volgorde als hieronder aangegeven, aan uitvlokking onderworpen, steeds met hetzelfde serum (± 4 A.E. EHRLICH) dat niet te oud was en 1⁰/₁₀₀ superol bevatte. Van dit serum was uit oriënteerende uitvlokkingsproeven bekend, dat het goede uitvlokkingen gaf in niet te langen tijd. Het voordeel van dit oude serum was de min of meer constante anti-toxische waarde, hetgeen ook daaruit bleek, dat het serum ook na eenige maanden met een gegeven toxine in dezelfde verhoudingen uitvlokte als tijdens deze experimenten; het eenige verschil betrof den uitvlokkingstijd, deze was iets langer geworden.

De buizen, die voor deze uitvlokkingen gebruikt werden, waren als boven aangegeven gereinigd. Het aantal buizen bedroeg nu steeds 22 per serie. In iedere buis werd 3 cc. van het te onderzoeken toxine gebracht, dat 0.5 % carbol bevatte, nadat het door een E.K. (Entkeimungsfilter) gezogen was. Het toxine was steeds helder. Het serum werd verdund 1 : 5, en toegevoegd in opklimmende hoeveelheid van 0.03 cc., te beginnen met 0.48 cc. Dan werd elke buis bedekt met stanniol, inhoud gemengd en geplaatst in waterbad van 49 à 50^0 . De buizen werden zooveel mogelijk geobserveerd en het oogenblik, dat één der buizen begon te vlokken opgeteekend als einde van den uitvlokkingstijd. Deze buis werd als de „eerst” vlokkende genomen, de optimum buis.

Het resultaat van deze uitvlokkingen was als volgt:

Toxine 102. Terwijl alle buizen min of meer helder blijven, wordt na $3\frac{1}{2}$ uur in buis 12 een uitvlokking zichtbaar; $\frac{1}{4}$ uur

later eveneens in buis 9. Dus eerste uitvlokking, die als fijne vlokkenregen begint, in buis 12.

Toxine 107. Uit voorgaande proeven was bekend, dat dit toxine een zeer lange uitvlokkingsstijd had. De buizen werden alle in het verloop van 6 uur min of meer troebel. Na $16\frac{1}{2}$ uur ontstond er in buis 7 een uitvlokking, die zich zoowel rechts als links uitbreidde, zoodat na 17 uur buis 6, 7, en 8 vlokten met een min of meer fijne vlokkenregen. De inhoud is opalesceerend; er komt geen neerslag. Gedurende de volgende 8 uur breidt zich de uitvlokking naar rechts en naar links ongeveer even snel uit.

Toxine 110A. In de opvolgende buizen van de serie ziet men langzamerhand minder troebel, troebel, helder en minder troebel elkaar afwisselen. Na ± 3 uur ontstaat in een heldere omgeving in buis 12 een uitvlokking. In buis 21 ontstaat een $\frac{1}{4}$ uur later eveneens een uitvlokking; deze buis was helder en werd troebel in het verloop van deze uitvlokking en bleef verder troebel. Al de uitvlokkingen begonnen als een fijne vlokkenregen.

Toxine 112A. Terwijl in het verloop van de proef de buizen alle min of meer opalesceerend worden, ontstaat er na 10 uur 40 minuten in buis 10 fijne vlokkenregen, die steeds toeneemt en zich zoowel rechts als links over de serie uitbreidt: eerste uitvlokking.

Toxine 112B. Alle buizen blijven gedurende het geheele proces helder. Na ± 7 uur ontstaan er enkele fijne vlokken in buis 1 en 2. Ze vergrooten zich plotseling, er is dus geen fijne vlokkenregen. Na ± 18 uur is de uitvlokking voortgeschreden naar rechts. In de buizen 14, 15, 16 en 17 is een krachtige uitvlokking (nieuwe uitvlokkingszône). Opvallend is nu de groote hoeveelheid neerslag in de buizen 6, 7, 8, 9, 10 en 11.

Nadat het toxine weer opnieuw is ingezet, waarbij buis 1 als midden in de nieuwe serie is genomen, verschijnt na ± 7 uur een uitvlokking als boven in de buizen die 0.48 en 0.51 van het verdunde serum bevatten (vroegere buis 1 en 2), zoodat men als eerste uitvlokking buis 1 en 2 van de voorgaande proef mag aannemen.

Toxine 113A. In buis 15 en 16 wordt na $2\frac{1}{2}$ uur in licht troebele omgeving een uitvlokking zichtbaar, die zich uitbreidt naar rechts en links. Na ± 30 min. begint in buis 12

een nieuwe uitvlokking, ofschoon de eerste uitvlokkingszône reeds genaderd is tot en met buis 14. Men zou zich nu kunnen voorstellen, dat er een fout gemaakt was in de doseering van het verdunde serum, zoodat er in buis 12 meer verdund serum is dan in buis 13. Opvallend echter is, dat bij een herhaling van deze uitvlokking hetzelfde feit opnieuw waargenomen werd, zoodat men in bovengenoemde buis 12, een nieuwe uitvlokkingszône heeft te zien.

Toxine 113B. In het verloop tot uitvlokking worden alle buizen min of meer troebel, waaronder enkele zelfs zeer troebel. Na $\pm$ 2 uur en 45 min. ontstaat er in buis 16, die minder troebel is, een eerste uitvlokking, die niet mooi is om als vlokkenregen bestempeld te worden. In het verloop van het uitvlokken wordt de buis troebeler, de uitvlokking breidt zich over de aanliggende buizen uit in vrij troebele omgeving. In buis 19, die helder is en blijft, begint ondertusschen een zeer fijne vlokkenregen, die de indruk maakt een tweede zône van uitvlokking te zijn.

Toxine 114. Tijdens het verblijf in het waterbad worden alle buizen min of meer troebel. Na $\pm$ 4 uur en 50 min. ontstaat er een eerste uitvlokking in buis 11 met vrij heldere inhoud, die zich vrij regelmatig alleen naar rechts (hoogere serumdosis) uitbreidt.

Toxine 115. Na $3\frac{1}{2}$ uur zijn met enkele uitzonderingen alle buizen min of meer opalesceerend. Na 5 uur ontstaat er een duidelijke eerste uitvlokking (fijne vlokkenregen) in buis 14, die zich naar rechts en links, maar vooral in de laatste richting uitbreidt. Een uur na het zichtbaar worden der eerste uitvlokking, komt er een tweede uitvlokkingszône in buis 2 en 3, die zich gelijk naar rechts en links uitbreidt. Het aanzien van deze zône van uitvlokking is niet verschillend van de eerste.

Toxine 116. Alle buizen worden min of meer troebel, vooral rechts in de serie. Na 4 uur, nadat hier en daar alleen aan het eind van de serie een enkele vlok is gezien, komt er een uitvlokking in buis 10 en 13. Het is geen fijne vlokkenregen, maar terwijl de vlokken in grootte toenemen, komen er kleinere bij en wordt de uitvlokking als zoodanig gemakkelijker waarneembaar; buis 11 volgt al gauw volgens hetzelfde schema als 10 en 13. Als de uitvlokkingen in deze buizen al zeer duidelijk zijn, worden er in de buizen aan het begin van

de serie enkele vlokken in de inhoud waargenomen. Van een eerste uitvlokking is hier geen sprake, de uitvlokking zelf volgt hier een zeer eigenaardig beeld.

Toxine 117. Alle buizen worden min of meer troebel. In heldere omgeving komt na 4 uur een duidelijk waarneembare eerste uivlokking als fijne regen in buis 9. Deze neemt in krachtigheid toe, terwijl er uitbreiding plaats vindt over de omgeving, vooral naar rechts. Merkwaardig is het ontstaan van een tweede uitvlokkingszône in buis 19 in zeer troebel milieu, heeft de eigenschap, dat hier en daar een vlok, die steeds groter wordt, te zien is en tenslotte als uitvlokking moet aangemerkt worden.

Toxine 118. Alle buizen blijven helder tot na $2\frac{1}{2}$ uur in buis 16 een fijne uitvlokking begint. Buis 17 volgt al gauw dusdanig, dat men den indruk krijgt, dat tusschen buis 16 en 17 de eerste uitvlokking zal gelegen hebben. De uitvlokking breidt zich in de richting der minimum buizen uit; 1 uur later begint in buis 5 en 6 een uitvlokking. Merkwaardig is een plotseling in buis 9 en 10 optredende zeer fijne uitvlokking (min of meer fijne vlokkenregen). Bij herhaling van deze uitvlokking in zijn geheel verloopt de fijne uitvlokking weer in dezelfde buis als boven beschreven. Hier heeft men waarschijnlijk te maken met drie uitvlokkingszônes.

Toxine 120. Terwijl alle buizen langzamerhand min of meer opalesceerend worden, ontstaat na 4 uur in buis 5 een uitvlokking, die er als een fijne vlokkenregen uitziet. Deze uitvlokking breidt zich over de aangrenzende buizen uit.

Toxine 121. Een mooie fijne vlokkenregen treedt in geen enkele buis op. In het begin ziet men sporadisch vlokken zweven. Deze worden groter, waardoor de uitvlokking als zoodanig duidelijk wordt in het begin van de serie in buis 3, 4, 5 en 6. Een eerste uitvlokking is aldus niet te herkennen; de buizen, die langzamerhand troebel worden helderen niet meer op; 8 uur later vlokt de serie in de eerste 12 buizen, terwijl in 13 slechts een zeer fijne uitvlokking te zien is, m.a.w. de uitvlokking breidt zich gelijkmatig over de serie uit, zoowel naar rechts als naar links.

Toxine 122. Alle buizen worden troebel. In buis 4 wordt in vrij heldere omgeving na $\pm 10\frac{1}{4}$ uur een uitvlokking zichtbaar. In buis 9 begint al gauw een nieuwe uitvlokkings-

zône, eveneens in buis II. Na eenige uren is er een sterk neerslag in buis 4.

Toxine 123. Alle buizen min of meer troebel; na $\pm 3\frac{3}{4}$ uur wordt er in buis 14 een uitvlokking zichtbaar, die niet als een zeer fijne vlokkenregen begint, maar hier en daar als een sporadische vlok, die grooter wordt en daarom als uitvlokking dient aangemerkt te worden.

Overziet men alle beschreven uitvlokkingen, dan blijkt, dat er met twee uitzonderingen (toxine 116 en 121) van de 17 onderzochte toxinen, dus in het algemeen een eerste uitvlokking was waar te nemen. De toxinen, die in de volgorde waarin ze hierboven beschreven zijn, in ouderdom toenemen, maakten den indruk van beter uit te vlokken en daarom juist af te lezen te zijn in hunne uitvlokkingen, naarmate ze ouder waren. De fijnste vlokkenregens werden door mij waargenomen bij de oudere toxinen. De eerste uitvlokking verliep volgens de schema's zooals door KALIC beschreven zijn (zie in het begin van dit hoofdstuk); echter zag ik dikwijls een andere vorm, waarbij in het mengsel slechts enkele vlokken te zien waren, die grooter werden, samenklonterden en een neerslag vormden. Naast de toxinen, die één uitvlokkingszône hadden, waren er andere met twee en meer dergelijke zônes. Merkwaardig was het altijd vroeg of laat troebel worden der mengsels in het waterbad, in tegenstelling met de diphtherieuitvlokkingen. Het maakte den indruk van bacteriële verontreiniging te zijn. Kleuren en uitstrijken op voedingsbodems gaf negatieve resultaten, zoodat hier nogmaals blijkt, dat het bij de titraties van tetanus-(ana)toxine en antitoxine in vitro minder aankomt op steriel, maar meer en vooral op goed gereinigd glaswerk.

Van groot belang was de vraag of de eerst vlokkende buis het neutrale mengsel bevatte.

Er bleek, dat 1 cc. bij een muis ingespoten geen verschijnselen c.q. tetanus gaf, zoodat het neutraal of overneutraal moest zijn.

Daarop werd na de uitvlokking, de inhoud van deze buis gecentrifugeerd en van de bovenstaande vloeistof $\frac{1}{2}$ cc. gemengd met $\frac{1}{2}$ cc. phys. zoutopl., waarin eenige malen de d.l.m. muis was opgelost. Het bleek mij bij herhaling, dat het mengsel sterk overneutraal was en meer dan 100 d.l.m.

muis (gedroogd toxine) per $\frac{1}{2}$ cc. buisinhoud kon neutraliseren. Men zou zich kunnen voorstellen, dat door het staan gedurende vele uren in het waterbad bij 50° het „eerst uitvlokkende” mengsel dusdanig was beïnvloed, dat het over-neutraal was geworden, b.v. er zouden toxoïden zijn ontstaan, die wanneer men aan het mengsel weer opnieuw toxine toevoegde, dit zouden verdringen. Daarom werd een mengsel, zooals in de eerst uitvlokkende buis aanwezig was, gedurende $\frac{3}{4}$ uur bij kamertemperatuur gehouden en dan als bovenbeschreven nagegaan op neutraliteit. Ook hierbij was de uit-slag: sterk overneutraal.

Tenslotte werd van meerdere toxinen een reeks van 33 buizen ingezet, waarin in de 1e buis nu inplaats van 0.48 cc. verdund serum (dosis bij de 1e buis van de serie van 22 buizen) 0.18 cc. bevatte, met de bedoeling na te gaan of ook nog eerder een uitvlokking zou optreden, die bij een serie van 22 buizen aldus over het hoofd zou zijn gezien. Er bleek, dat de eerste vlokking ook nu weer in dezelfde buis verscheen, waarvan de inhoud dus overneutraal bleek te zijn.

En eindelijk werden om zoowel een verandering van het toxine als serum in zijn vlokkende eigenschappen uit te sluiten, deze proeven later nogmaals meerdere malen herhaald met dezelfde resultaten. De uitvlokkingstijd was echter toegenomen. Hiermede is dus uitvoerig bewezen, dat *bij deze uitvlokkingen van absolute waarden moest worden afgezien.*

Maar al was de uitvlokkende buis dan niet neutraal, had deze dan niet een relatieve waarde? M.a.w. kon men uitgaande van de plaats van de eerst uitvlokkende buis in de serie vergelijkenderwijze conclusie strekken over de eigenschappen van het toxine?

Daartoe werden vergeleken de plaats van de eerst uitvlokkende buis ten opzichte van de oorspronkelijke toxiciteit van het toxine. Dat de op het oogenblik aanwezige toxiciteit van geen groote waarde was, is te begrijpen, daar alle toxinen gemodificeerd waren door de bewaring onder toluol, en zeer zeker des te meer, naarmate ze langer er onder verbleven hadden. Dat hierbij hunne bindingswaarde en dus hunne uitvlokkingswaarde er onder geleden had, was begrijpelijk en daarom zijn zeer zeker in onderstaand schema niet alle waarden, die met de uitvlokking verkregen werden, volkomen vergelijkbaar. Het meest vergelijkbaar zijn die toxinen, die

in het schema bij elkaar zijn geplaatst; het allermeeft is dit het geval met die toxinen, die hetzelfde nummer en tevens de letter A of B dragen, daar ze van culturen stammen, die op denzelfden tijd zijn bereid en daarna onder toluol zijn geplaatst. Maar als ook de afstand tusschen twee toxinen die men vergelijkt, grooter is in het schema, dan kan men toch deze min of meer vergelijken, daar aan het eind van deze serie van uitvlokkingen bleek, dat serum en toxine in hunne bindingsneiging, berekend met de uitvlokking, ook door langer staan niet veel geleden hadden.

SCHEMA

ter vergelijking van de EERST VLOKKENDE BUIS met de OORSPRONKELIJKE TOXICITEIT, die onmiddellijk na de bereiding van het toxine werd vastgesteld op muizen.

TOXINEN.	No. der EERSTVLOKKENDE BUIS in de serie.	OORSPONKELIJKE TOXICITEIT d.l.m. muis in verdunning van 1 cc.
1. toxine 102	buis 12	> 100.000 < 300.000
2. toxine 107	buis 7	100.000
3. toxine 110A	buis 12	100.000
4. toxine 110B	buis 13	> 600.000
5. toxine 112A.	buis 10	iets > 100.000.
6. toxine 112B.	buis 1 en 2	iets > 100.000.
7. toxine 113A.	buis 15 en 16	> 600.000.
8. toxine 113B.	buis 16	> 100.000. < 300.000
9. toxine 114	buis 11	iets > 100.000.
10. toxine 115	buis 14	> 100.000.
11. toxine 116	buis 10 en 13?	iets > 100.000.
12. toxine 117	buis 9	bijna 300.000.
13. toxine 118	buis 16, 17?	bijna 300.000.
14. toxine 120	buis 5	> 100.000.
15. toxine 121	buis 3, 4, 5, 6	100.000.
16. toxine 122	buis 4	iets > 500.000.
17. toxine 123	buis 14	onbekend.

Onmiddellijk valt in dit schema de volstrekte onregelmatigheid op, opmerkelijk is b.v. de verhouding van de toxinen 110A en 110B. Beide toxinen vlokken uit in buis 12 resp. 13, de toxiciteit verhoudt zich echter als 1 : 6. De beide toxinen

zijn van even oude culturen en daarna even lang onder toluol bewaard en daar ze ongeveer op dezelfde hoogte vlokken, komt dit overeen met een uitspraak van BÄCHER (zie vroeger): dat de uitvlokking een eigenschap is van een bepaalde stam en voedingsbodem.

Zonder twijfel is uit al deze uitkomsten de conclusie te trekken, dat met mijne uitvlokking, waarvan ik immers mag aannemen, dat deze te vergelijken is met de uitvlokkingen, die anderen verkregen, *noch absoluut, noch betrekkelijk een indruk is te krijgen van de eigenschappen van het tetanus-toxine*. Volledigheidshalve werden door mij naast elkaar eenige toxinen en de daaruit bereide anatoxinen uitgevlokt. Zoowel toxine als anatoxine vlokten in dezelfde verhoudingen, het schema volgens hetwelk ze vlokten bleef gelijk. De buizen werden b.v. min of meer troebel. Een toxine, dat niet als fijne vlokkenregen vlokte geeft een analoog verschijnsel bij zijn anatoxine, b.v. toxine 120.

Daar de toxinen niet in hun uitvlokkend vermogen te waardeeren zijn, volgt dus onmiddellijk dat:

zoowel toxinen als anatoxinen in hunne bindende neiging nog niet te beoordeelen zijn naar de uitvlokking, die men verkrijgt, als men ze mengt met antitetanusserum in bepaalde verhoudingen.

Onderzoekingen met een ander serum op meerdere toxinen gaven resultaten die de bovenstaande uitspraak niet wijzigden, maar integendeel bevestigden.

Het serum, dat waarschijnlijk een waarde had van ± 7 A.E. (EHRlich), werd wederom als bovenvermeld verdund. Naast elkander werden vergeleken toxine 114, 115, 116, het toxine 114 werd ter vergelijking uitgevlokt met het vroegere serum. Terwijl het toxine 114 met dit laatste serum in ± 4 à 5 uur uitvlokte, was de uitvlokkingstijd met het nieuwe serum < 2 uur, voor toxine 115 < 2 uur, voor toxine 116 < 3 uur. De eerste uitvlokking lag in de minimum buis, terwijl de uitvlokking zich vrij snel naar rechts uitbreidde; de buizen bleven vrij helder. Bij toxine 115 ontstond alleen een duidelijk op den bodem liggend neerslag. Bij geen der toxinen zag men een vlokkenregen. Deze uitkomsten sluiten in principe met de waarde van dit serum n.l. groter dan het vorige.

Steeds bleek opnieuw bij herhaling van de proef de mini-

mum buis het allereerst uit te vlokken, de uitvlokkingstijden werden zeer kort tot zelfs ± 50 min. voor toxine 115 en 116; voor toxine 114 veel langer. Op een gegeven oogenblik bevatte de minimum buis slechts 0.9 cc. verdund serum 1 : 5.

Tot plotseling zonder mij bekende oorzaak bij een serie, die weer iets lager was ingezet, de uitvlokking begon in de maximum buis. De uitvlokkingstijd was eveneens zeer onberekenbaar, nu eens zeer kort, dan weer veel langer, b.v. het toxine 116, dat bij een serie, waarbij de buis, die 0.45 cc. serum had gekregen in 1 uur 30 min. uitvlokte, den volgenden dag in een zelfde serie in ± 40 min. Ook de uitbreiding van de uitvlokking in de naburige buizen verschilde in tijd. Andere toxinen gedroegen zich wel is waar regelmatig, maar in het algemeen kan men besluiten dat dit serum niet geschikt is voor uitvlokkingsproeven, „non convenablement choisi.”

Door een toevallige samenloop van omstandigheden bemerkte ik, dat het toxine 118 met 0.5 % carbol gemengd in ± 1 uur 30 min. een uitvlokking gaf, die niet te onderscheiden was van de uitvlokking van RAMON. Het neerslag was iets minder sterk uitgesproken.

Dit feit werd het begin van een nieuwe reeks van onderzoeken.

De volgende vragen werden gesteld:

- 1e. Heeft het carbol een optimum bij zijn uitvlokkingen.
- 2e. Welke is de invloed van de carbol op de uitvlokkingen van tetanustoxine en -antitoxine.
 - a. uitvlokkingstijd.
 - b. het aanzien van de eerste uitvlokking.
 - c. de plaats van de eerste uitvlokking.
- 3e. is in het neerslag het toxine aanwezig?

1e. Mijn onderzoek leerde dat deze vraag ontkennend beantwoord kan worden: met de concentratie van de carbol werd de uitvlokkingstijd kleiner. Bij een serie buizen waarin steeds dezelfde hoeveelheid toxine was gedaan, werd in opklimmende hoeveelheden carbol toegevoegd tot 2 % en bleek er in het waterbad bij 50° in het toxine 118 met 2 % carbol het allereerst een uitvlokking op te treden. Deze was

zeer krachtig, breidde zich naar de lagere waarden uit en nam daarbij af in sterkte. De uitvlokkingsstijd wordt tenslotte oneindig groot o.a. bij 0.3% ontstond na langen tijd nog een neerslag in de buis, dat sterk deed denken aan het neerslag dat verkregen werd met de uitvlokkings van Ramon in de buis, die min of meer van het optimum, in het algemeen van het middelpunt van een uitvlokkingszone aflag. De minimum carbolconcentratie waarbij nog een neerslag werd gevormd was verschillend voor de diverse toxinen.

2e. a. Deze invloed bleek bij meerdere malen uitgevoerde uitvlokkingen een remmende te zijn. In het algemeen werden met het toenemen der carbolconcentraties de buizen veel troebeler; bij 1% sterke troebeling, zelfs bij 2% niet meer af te lezen. Met 0.5% kreeg men practisch alleen verschil in de uitvlokkingsstijd. Tevens bleek, dat wanneer van een toxine A. de uitvlokkingsstijd grooter was dan van een toxine B., dit verschil nog grooter werd wanneer men aan deze beide toxinen een gelijke hoeveelheid carbol toevoegde.

b. De uitvlokkings veranderde niet van aanzien: b.v. een toxine, dat zonder carbol niet als fijne vlokkenregen uitvlokke met zijn corresponderend serum, vertoonde hetzelfde vlokkebeeld als een toxine met 0.5% à 1% carbol.

c. Ten opzichte van de plaats van de eerste uitvlokkings krijgt men den indruk, dat het optimum van uitvlokkings een geringe neiging heeft naar links in de serie te verschuiven.

Het toxine 113B, zonder carbol, b.v. vlokke met een serie uit in buis 16 na 4 uur.

met $\frac{1}{2}$ % in buis 15 à 16. 10 min. later.

met 1% in buis 15. 30 min. later dan toxine zonder carbol.

Het toxine 123 zonder carbol vlokke uit in ± 5 uur in buis 13.

met $\frac{1}{2}$ % carbol vlokke uit in ± 5 uur in buis 12.

met 1% carbol alleen troebele buizen.

Het toxine 117 gaf daarentegen, iets na elkaar ongeveer op dezelfde plaats liggende uitvlokkings resp.: geen, met $\frac{1}{2}$ % en 1% carbol.

Het toxine 118 gedroeg zich als toxine 117.

Bij toxine 115 waren weer verschillen van één buis, etc.

3e. In een waterbad van 50° werd van het toxine 118, dat door een E.K. (Seitz Entkeimungs Filter) was gefiltreerd,

ingezet een hoeveelheid zonder carbol, met 1% carbol en nog eens met 1% carbol; daarnaast bij kamertemperatuur zonder carbol. Nadat het toxine door de carboltoevoeging was uitgevlokt werd de inhoud van één der buizen, die 1% carbol bevatte, gecentrifugeerd, de andere werd geschud, dusdanig, dat neerslag en vlokken weer in een fijn verdeelde toestand kwamen.

Op witte muizen werd nu de d.l.m. van deze behandelde toxinen nagegaan n.l.: 1. het toxine dat 1 uur bij 50° had gestaan, 2. het 1% carboltoxine na centrifugeeren, 3. het 1% carboltoxine met neerslag, 4. het toxine dat 1 uur bij kamertemperatuur had gestaan.

1. 1 cc. ingespoten bij muizen in verdunning 1 : 10.000 † aan tetanus 4e dag.

2. 1 cc. ingespoten bij muizen in verdunning 1 : 10 matige tetanus.

3. 1 cc. ingespoten bij muizen in verdunning 1 : 50 iets tetanus. 1 : 10 † aan tetanus 4e dag.

4. 1 cc. ingespoten bij muizen in verdunning 1 : 10.000 † aan tetanus 4e dag.

Waaruit dus ten duidelijkste blijkt, dat het toevoegen van carbol het toxine sterk modificeert en tevens, omdat het 1% carboltoxine met neerslag giftiger is dan het 1% carboltoxine zonder dit, een gedeelte van het toxine gebonden is aan het neerslag.

Daarnaast blijkt tevens dat de temperatuur van 50° dezelfde modificeerende invloed heeft op de toxiciteit van het toxine als de temp. van 18°.

Interessant is, dat een toxine No. 70, ongeveer 3 jaar oud, dat geen uitvlokkingen meer gaf, zelfs niet na dagen, met carbol tot hooge concentratie geen uitvlokking meer kon geven, m.a.w. de praecipitabele stoffen zijn er uit verdwenen. Opmerkelijk is, dat tetanustoxinen, die onder toluol bewaard worden regelmatig troebel worden en dat wellicht het langere verblijf onder de toluol een verklaring kan geven voor bovenstaande gebeurtenis.

Resumeerende kan ik besluiten:

re. dat het in het algemeen mogelijk is een uitvlokking, die verschillende verloopvormen heeft, te verkrijgen als

men tetanustoxine en tetanusantitoxine bijeen voegt.

2e. dat vele onbekende factoren de uitvlokking beheerschen, waarvan o.a. zeer zeker een groote invloed moet toegezegd worden aan de e.v. onreinheid van het gebruikte glaswerk.

3e. dat de buis, die het allereerst uitvlokt, sterk overneutraal is, dus geen initiale uitvlokking.

4e. dat met het oog op de plaats van deze buis in de serie geen aanknoopingspunten zijn te vinden om de toxinen in hunne antigeeneigenschap onderling te waardeeren.

5e. dat niet elk serum goede uitvlokkingen geeft.

6e. dat er met andere stoffen, o.a. carbol, ook uitvlokkingen zijn te verkrijgen, waarbij de concentratie dezer stoffen de uitvlokkingstijd beheerscht. Deze uitvlokking is niet te onderscheiden van die, welke men verkrijgt als men tetanustoxine en specifiek antitoxine bijeenvoegt. Het neerslag is iets toxisch. Het carbol werkt sterk modificeerend op het toxine.

7e. dat, waar er meerdere niet specifieke uitvlokkingen schijnen te bestaan en men deze niet kan onderkennen van de ware, waardebepaling in vitro door middel van uitvlokking alsnog uitgesloten is.

HOOFDSTUK VI.

OVER DE TITRATIE VAN TETANUS(ANA)TOXINE EN ANTITOXINE DOOR MIDDEL VAN „RINGPRÄCIPITATION”.

Het streven om door het doen optreden van de uitvlokking in één bepaald gebied deze duidelijker te doen zijn, zooals oorspronkelijk (zie blz. 60) ook door NICOLLE, CÉSARI en JOUAN door middel van een vaste bodem (10% gelatine) werd verricht, is weder opgevat door HOEN, TSCHERTKOW en ZIPP⁴⁵. Deze kiezen daarvoor echter geen vast milieu, maar een gelatineoplossing van 2%, waarin deze uitvlokking optreedt *op en in de omgeving* van het aanrakingsvlak van toxine en antitoxine in den vorm van een ring: „Ringpräcipitationsreaktion”. De laatste onderzoekers hebben oorspronkelijk deze reactie bij diphtherietoxine en -antitoxine toegepast en kwamen tot de slotsom, dat de praecipitinogene eigenschappen niet te scheiden zijn van de antigene. Onder de antigene eigenschappen verstaan ze dan de bindende eigenschappen van het toxine in den zin van BÄCHER, KRAUS en LÖWENSTEIN⁴⁶ (de „Bindungswert”. Zie blz. 63). Bij het anatoxine vindt RAMON de *Lf.* (antigeenwaarde) even groot als bij het oorspronkelijke toxine, hetgeen in het algemeen is bevestigd en ook mijn meening is in die richting. De uitvlokkingstijd is echter grooter geworden. Nu vinden BÄCHER, KRAUS en LÖWENSTEIN met hunne bindingswaarde een grootere waarde bij het anatoxine, zoodat ze meenen, dat de antigene eigenschappen zijn verminderd. HOEN, TSCHERTKOW en ZIPP konden bij hunne titratieproeven met toxinen en anatoxinen bij diphtherie een analoge verhouding verkrijgen als bovengenoemde onderzoekers met hunne „Bindungswert”. Tevens vonden zij bij verwarming van het anatoxine op 65 en 70 graden met hunne ringmethode vermindering der antigeenwaarden, die niet met de uitvlokking was aan te toonen. Om deze verminderde waarden die toevallig(?) sluiten met de bindingsmethode, te

interpreteeren als een vermindering der antigeenwaarde is een min of meer apodictische uitspraak zonder eenigen grond. Aangetoond moet worden, dat, als met een anatoxine een vermindering gevonden wordt bij de ringmethode, terwijl de uitvlokking dezelfde waarde heeft behouden, dit antigeenvermogen geleden heeft bij zeer vele dierproeven. Daarbij meen ik, dat ook BÄCHER, KRAUS en LÖWENSTEIN niet het recht hebben het grooter worden van de „Bindungwert” te verklaren als een vermindering van het antigeenvermogen van het anatoxine: m.i. verontachtzamen ze hier de vraag in hoeverre of toxine en anatoxine in staat zijn elkaar in hun binding met antitoxine te verdringen.

De ringmethode is daarna als waardebepaling door HOEN en TSCHERTKOW toegepast bij titraties van tetanus(ana)-toxinen en antitoxinen en wordt door hen geprezen boven iedere andere methode.

De door hen gepubliceerde optimistische uitkomsten waren aanleiding voor mij deze ringreactie onder de oogen te zien.

Een gelatineoplossing werd bereid als door hen aangegeven: 2% gelatine + 10% NaCl. De eerste vraag, die ik mij stelde, was, of het inderdaad mogelijk was een ring te verkrijgen, als men tetanustoxine en tetanusantiserum in een bepaalde verhouding bijeen brengt en of deze specifiek was. Het schema dat gevolgd werd, was hetzelfde als door de onderzoekers aangegeven voor het titreeren van antitetanussera.

Het serum waarmee ik mijn onderzoekingen verrichtte, werd dus verdund 1 : 25 met phys. zoutopl. voorzien van 0.3% carbol. In een serie van 10 buisjes werd nu afgepipeteerd in ieder 1 cc. van deze uitgangsverdunning en hierbij werd nu phys. zoutopl. met 0.3% carbol gedaan aldus, dat de eerste buis bevatte: 1 : 25 verdund serum, de tweede 1 : 50, de derde 1 : 75, enz., de tiende 1 : 250. Uit elk dezer buizen werd nu 1 cc. genomen en gebracht in de serie van 10 buizen, waarin de ringreactie moest plaats vinden. Hierbij werd vervolgens 1 cc. van de boven bereide gelatineoplossing: 2% gelatine + 10% NaCl. gedaan, zoodat de serumverdunningen nu waren 1 : 50, 1 : 100, 1 : 500, voorzien van 1% gelatine en 5% NaCl. Met een voor 1 cc. geijkte Pasteursche pipet werd zeer voorzichtig 1 cc. van een door een E.K. gefiltreerde tetanustoxineoplossing op de serumverdunningen gebracht, dusdanig, dat er een scherp scheidingsvlak ontstond. Elk

buisje werd aan de bovenzijde bedekt met een blaadje staniol en daarna in een broedstof van 37° gezet. Een waterbad bleek onbruikbaar, daar er dan te veel stroomingen ontstaan, die het aanrakingsoppervlak tusschen serum en toxine verstoren. De bedoeling hiervan is om te bepalen met welke verdunning van een bekend serum er nog een ring optreedt met 1 cc. van een bekend toxine. Deelt men deze verdunning nu op de antitoxische waarde, bekend uit de dierproef, dan bepaalt men de Lp. grootte van het toxine. Dit is dus eigenlijk *die* hoeveelheid antitoxine, die juist in staat is 1 cc. van het gebruikte toxine te neutraliseeren (RAMON). Door nu met een onbekend serum te experimenteeren en de verdunning, waarbij men nog juist een ring waarneemt, te vermenigvuldigen met deze Lp. grootte, heeft men aldus onmiddellijk de antitoxische waarde (HOEN en TSCHERTKOW). Na zes uur (later bleek mij dat het juister is om de drie uur waar te nemen, omdat een ring die op deze wijze ontstaat soms weer snel verdwijnt) bleken de scheidingsvlakken vervaagd, van een ring was niets te zien, en werd ook in de volgende dagen niets gezien, wel werd de buisinhoud troebel.

Ook bij herhaling is het mij niet gelukt met dit toxine en dit serum een ring te verkrijgen. Met een ander toxine ontstond een ring bij een serumverdunning 1 : 50, deze was zeer kortstondig. Werden de serumverdunningen minder sterk genomen 1 : 20, dan was het wel mogelijk ringen te krijgen. De ringen die bij de minder sterke verdunning vrij sterk zijn, zijn verderop zeer moeilijk zoo niet onmogelijk te herkennen. Daarom werd zoowel het gelatinegehalte als de temperatuur verhoogd om een scherper grensvlak en aldus een scherpere ring te houden. Inderdaad waren de ringen nu veel duidelijker te zien, maar de moeilijkheden om ten slotte de buis te herkennen, waar nog juist een ring aanwezig was, werden niet minder. Zoo was er een duidelijk verschil in ringen tusschen 2, 3 en 4 % gelatine-oplossingen, die gebruikt werden voor de eindverdunningen van het serum. Tot slot bleven er altijd nog de refractaire sera, die noch met het eene, noch met het andere toxine en in verdunningen waarbij dit zeer zeker moest, een ring gaven.

Na deze negatieve resultaten werd nog de wijze toegepast zooals aangegeven voor de titratie van de toxinen⁴⁷.

Hierbij werd een constante serumverdunning genomen van

1 : 15 dusdanig, dat ten slotte er een serumoplossing was die 1% gelatine en 5% NaCl. bevatte. Het toxine werd verdund aldus: 1 cc. toxine, 1 cc. toxine en 1 cc. phys. zoutopl., 1 cc. toxine en 2 cc. phys. zoutopl., etc.

In iedere buis werd nu 2 cc. van de serumverdunding als bovengenoemd afgepipetteerd en daarop werd nu zeer voorzichtig 1 cc. van het verdunde toxine gebracht. Na 2 uur was er al in het begin van de serie (minst sterke verdunningen) een vrij scherpe ring te zien. Deze ring werd langzamerhand zichtbaar tot in het einde van de serie.

Het toxine werd nu in een volgende proef in grootere verdunding, te beginnen met 1 : 5, op de serum verdunding gevloeid en nu ontstonden al spoedig zeer fijne ringen, waarvan de laatste zeer moeilijk zoo niet onmogelijk is af te lezen. Het best ziet men deze door de buizen te houden tegen een donkere achtergrond en het licht van boven-voor te laten opvallen. Het was dan zelfs mogelijk zeer fijne ringen waar te nemen, maar des te fijner men de ringen kon zien, des te moeilijker was het een einde in de ringvormen vast te stellen.

Deze uitkomsten waren de inleiding voor een reeks van onderzoekingen van zeer algemeenen aard.

Er werd uitgebreid onder de oogen gezien de invloed op deze ringreactie van

1e. het percentage gelatine.

2e. de temperatuur.

Er werden naast elkaar gebruikt gelatineoplossingen van 2% gelatine en 10% NaCl. en van 4% gelatine en 10% NaCl. De temperaturen waren 37 en 50 graden. Getitreerd werden twee maal twee toxinen.

De eerste twee toxinen No. 117 en No. 118 werden verdund als boven vermeld, te beginnen met verdunding 1 : 5. Het serum werd verdund 1 : 15 dusdanig, dat ontstond een 1% en 2% gelatineoplossing + 5% NaCl. De serie bestond uit 10 buisjes 1, 2, tot en met 10.

De resultaten waren:

Na 2 uur.

Voor toxine 117 met serum 1% gelatine, 5% NaCl.
bij 37° ring niet aanwezig.
bij 50° " " "

met serum 2% gelatine, 5% NaCl.

bij 37° „ „ „
bij 50° „ „ „
voor toxine 118 met serum 1% gelatine, 5% NaCl.
bij 37° Ring in 1 en 2.
bij 50° „ „ 1, 2 en 3.
2% gelatine, 5% NaCl. bij 37° „ „ 1, 2, 3, 4.
bij 50° „ „ 1, 2, 3, 4, 5, 6.

Na 6 uur.

voor toxine 117 met serum 1% gelatine, 5% NaCl.
bij 37° ring in 10?
bij 50° ring in 1, 2, 3.
2% gelatine, 5% NaCl. bij 37° geen ring.
bij 50° ring 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,
8, 9, 10.
voor toxine 118 met serum 1% gelatine, 5% NaCl.
bij 37° ring 1, 2?
bij 50° ring 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9.
2% gelatine, 5% Na. Cl. bij 37° ring 1, 2, 3, 4, 5, 6.
bij 50° ring 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,
8, 9, 10.
hier (bij 50°) waren de ringen buitengewoon sterk.

Men kan hieruit onmiddellijk zien, dat zoowel de temperatuur als het gelatinegehalte quantitatief en kwalitatief de ringreactie beïnvloeden. Om hier één van deze de voorrang te geven is moeilijk.

Den volgenden dag waren de ringen veel minder scherp en daardoor het aflezen ondoenlijk.

De resultaten met het tweede paar toxinen 115 en 116 onder gelijke omstandigheden waren.

Na 3 uur:

voor toxine 115 met serum 1% gelatine, 5% NaCl.
bij 37° ring in 1, 2, 3, 4.
bij 50° ring in 1, 3, 2, 4, 5,
2% gelatine, 5% NaCl. bij 37° ring in 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7.
bij 50° ring in 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.

voor toxine II6 met serum 1% gelatine, 5% NaCl.

bij 37° ring in 1, 2.

bij 50° ring in 1, 2, 3, 4,

2% gelatine, 5% NaCl. bij 37° ring in 1, 2, 3, 4.

bij 50° ring in 1, 2, 3, 4, 5.

Na 6 uur waren de ringen in het algemeen iets duidelijker, terwijl tevens:

voor toxine II5 met 1% gelatine bij 37° ook ring in 5.

voor toxine II6 met 1% gelatine bij 37° ook ring in 3.

Na 24 uur.

de ringen zijn veel breeder, veel minder scherp te onderscheiden van de troebele omgeving, zoodat nu in het geheel geen duidelijke gevolgtrekkingen te maken zijn.

Uit deze proef kan men concludeeren, dat hier de invloed van de gelatineconcentratie grooter is, dan die van de temperatuur.

Overziet men de resultaten van al deze algemeene proeven, dan kan de ringreactie als waardebepaling niet in aanmerking komen. Wel zijn er geen bijzondere titraties verricht, maar met het oog op den grooten invloed van concentratie van de gelatine en van de temperatuur is er alle reden om deze een succes te ontzeggen.

Men heeft zelfs alle recht aan te nemen, dat er nog vele andere factoren zijn, die deze ringreactie zullen beïnvloeden en zullen o.a. veranderingen in den aard en concentratie der electrolyten, herkomst en bereiding der gelatineoplossing, etc. een invloed toegeschreven moeten worden, immers men heeft hier in tegenstelling met de uitvlokkingsreactie, niet met een homogeen mengsel te maken. De resultaten, die men verkrijgt zijn afhankelijk van de diffusie der werkzame stoffen naar het aanrakingsoppervlak en dus zullen vorm en grootte van dit laatste (wijdte der reageerbuizen) benevens de concentratie van de reagerende bestanddeelen (verdunningen), de uitkomsten sterk beïnvloeden.

Daarbij heeft men (zie boven) bij de ringreactie, zooals deze door HOEN en TSCHERTKOW wordt aanbevolen, slechts vergelijkenderwijze conclusies te trekken. Namelijk moet men beschikken over een standaard-toxine en standaard-serum en kan daarnaast pas titreeren op een willekeurig toxine c.q. serum.

Ten slotte rest nog de buitengewone moeilijkheid in het constateeren der ringen, zoodat, alles te zamen genomen, *we aan deze reactie slechts een teleurstelling in het practische gebruik kunnen toezeggen.*

HOOFDSTUK VII.

SLOTBESCHOUWINGEN, PRACTISCHE AANWENDING VAN HET TETANUSANATOXINE.

Het is mogelijk bij caviae met het tetanusanatoxine een specifieke immuniteit te bereiken. Deze immuniteit kan men vergrooten door meer van het vaccin in te spuiten, maar tevens meerdere malen, en de injecties ten opzichte van elkaar een bepaalde plaats in tijdorde te geven. De antigeenwerking is te vergrooten door bijvoeging van een niet specifieke prikkel. De immuniteit ontstaat langzamerhand, is te bepalen door het aantoonen van een humorale-(muistitraties) en een cellulairè immuniteit (*réactivité acquise*), het vermogen om op een hernieuwde inspuiting te reageeren met de vorming van specifieke antitoxinen. Zoowel cellulairè- als humorale immuniteit zijn afhankelijk van een bepaalde gevoeligheid van het organisme (de *réactivité naturelle*), die de individueele verschillen bij de gevolgen der entingen veroorzaakt. Deze *réactivité* is een blijvende eigenschap, geen tijdelijke toestand, blijft dus steeds aanwezig en maakt het zoo gevaarlijk uit slechts enkele vaccinaties gevolgtrekkingen te maken. Naar analogie van dierimmunisatie is het ook mogelijk menschen te wapenen tegen tetanustoxine c.q. tetanuskiemen.

Evenwel zal het gebruik van het tetanusanatoxine altijd op groote moeilijkheden blijven stuiten. Men bedenke, dat men te maken heeft met een stof, die, voor zij door een bewerking tot z.g. anatoxine werd, in toch zoo minimale dosis reeds ziekmakend respect. doodelijk was.

Ik herinner hier aan toxinen, die ik op het Rijks Serologisch Instituut zag bereiden. Een d.l.m. muis 1 : 500.000 en kleiner was geen uitzondering.

Men kan nu als volgt de d.l.m. voor een mensch theoretisch berekenen. Het is namelijk bekend, dat de mensch waarschijnlijk gevoeliger is dan het paard, terwijl dit laatste 12 maal gevoeliger is dan de muis m.a.w., de toxinehoeveelheid om één muis van 15 gram te dooden is vernietigend voor 12 maal

15 gram = 180 gram mensch. Stelt men een mensch op een gewicht van 72 K.G. dan kan dus de giftdosis voor 400 muizen voor dezen mensch doodelijk worden, waarbij men nu eenigszins een idée van de kleinheid der doodelijke hoeveelheid krijgt. Daarnaast weten we, dat de eenmaal uitgebroken tetanus zulke slechte kansen voor genezing biedt. Wil men absoluut overtuigd zijn van de volkomen onschadelijkheid, dan heeft men eenige malen bij caviae 10 cc. onderhuids in te spuiten en deze dieren nauwkeurig te observeeren, omdat anderen en ook mij bleek, dat na twee weken het uitbreken van een late algemeene tetanus nog mogelijk is.

En dan blijft er nog een verraderlijk moment bij de tetanus-anatoxinebereiding over, de mogelijkheid van de tetanusbacil om zijn resistente sporen te vormen. Zoo bleek bij één van de nieuw bereide anatoxinen, dat van een toxine met een d.l.m. muis 1 : 100.000 stamde, door dit gedurende 3 weken met 0,4% formaline bij 40   C. te zetten, dat na enting van 50 gram in de Tarozzi-bouillon er gasvorming optrad en na nauwkeurig onderzoek de tetanusbacil in reinkultuur was te kweken. Dit anatoxine had verder bij caviae onderhuids ingebracht in hoeveelheid van 10 cc. geen verschijnselen, van welke vorm van tetanus dan ook, gegeven.

Voor een volkomen gewettigd inspuiten van menschen moet men dus eischen:

Dat bij een onderzoek op een voor tetanus zeer gunstige voedingsbodem van een voldoende hoeveelheid ($\pm$ 50 c.c.) anatoxine blijkt, dat de mogelijkheid tot vorming van tetanusbacillen uitgesloten is, opdat men niet onaangenaam verrast worde, doordat op een gegeven oogenblik, door omstandigheden, die dit mogelijk maken, bij één zijner vaccinaties entetanus optreedt.

Om verder overtuigd te zijn van zijn immuniseerende kracht, heeft men een juiste en afdoende waardebepaling nodig. Wel weten we, dat anatoxinen afgeleid van toxinen met een zeer kleine d.l.m. zeer sterk als antigeen werken, maar absoluut is hier niets te bepalen. Waardebepalingen in vitro zijn de juiste, waardebepalingen in vivo hebben het bezwaar, dat ze duur zijn en bovendien binnen vrij ruime grenzen afhankelijk van de gevoeligheid der proefdieren.

Heeft men eenmaal een anatoxine en weet men, dat het goed immuniseert, dan rijst de vraag: waar is het aangewezen?

Reeds RAMON heeft opgemerkt, dat het gebruikt moet worden voor soldaten, die naar een veldslag gaan. Ik zou dit eerst nog wat algemeener willen zeggen. Daar we zelfs niet kunnen benaderen hoe groot de waarde van de humorale immuniteit moet zijn om een mensch te beschermen tegen de doodelijke tetanusinfectie, te meer daar bij de actieve immunisatie de cellulaire immuniteit de hoofdrol speelt, en we niet, zooals bij de diphtherie, een eenvoudige huidreactie hebben om de immuniteit vast te stellen, is er bij elke tetanusvaccinatie een zeker risico aanwezig, tenzij men als eisch stelt, dat na de vaccinatie de antitoxische titer van het bloed gelijk moet zijn aan die na de prophylactische seruminjectie van 20 A.E. Hiervoor zijn echter venepuncties en vergelijkende serumtitraties op dieren noodzakelijk, zoodat deze wijze van controleren van het resultaat der entingen slechts voor den enkeling kan plaats vinden.

Het bovengenoemde risico moet nu opwegen tegen de tetanusgevallen die optreden als er niet gevaccineerd wordt en men kan bovengenoemde gedachte aldus formuleeren:

Dat de tetanus vaccinatie meestal een massa-enting zal zijn.

1e. Voordat hij naar het front vertrekt dient iedere militair, met inachtneming van de bovengenoemde voorzorgsmaatregelen, gevaccineerd te worden tegen tetanus. Omdat er voor het tot stand komen van een afdoende immuniteit een zekere tijd noodig is, moet het zwaartepunt van deze enting gelegd worden in de depôts, waar de jonge menschen afgericht worden tot soldaat etc. Het bereiden van groote hoeveelheden tetanusantitoxine in vreedstijd is hiervan de logische consequentie. Wij behoeven immers niet bevreesd te zijn, dat er door den tijd tetanusantitoxine verloren zal gaan, daar het juist zoo stabiel is in zijn eigenschappen. Het combineeren van verschillende vaccins kan eventueel overwogen worden, (zie „geassocieerde” vaccinaties) indien men er echter bij bedenkt, dat de waarde der typhusenting er onder lijdt.

2e. In omgevingen, waar door weinig hygiënische omstandigheden en slechte wondverzorging percentsgewijze veel klemziekte (tetanus umbilicalis) voorkomt is vaccinatie der toekomstige moeder op ruime schaal aangewezen, indien men niet de voorkeur geeft aan een seruminspuiting bij den pasgeborene.

3e. Wat meer voor den enkeling geldt: Wanneer bij oorlogsgemutileerden naderhand een plastiek gedaan en dus gemanipuleerd wordt in een omgeving waar nog tetanus ziektekiemen, sporen van de vroegere verontreinigde wond afkomstig, een *vita minima* kunnen leiden, dienen deze gewapend te worden tegen de postoperatieve tetanus door een afdoende vaccinatie en moet men hier het bloed nauwkeurig nagaan op de aanwezigheid van de tetanusantilichamen (zie vaccinatie van menschen).

Zoo ziet men dus, dat het tetanusanatoxine in vreedstijd weinig in aanmerking zal komen, omdat de tetanus zoo zelden voorkomt en we in onze seruminjectie een onmiddellijk goed werkend prophylactisch middel hebben, in tegenstelling met den langen duur der behandeling met anatoxine.

Zeër effectief zou het geweest zijn, als men tijdens de werking der passieve immuunlichamen een actieve immunisatie tot stand had kunnen brengen. Ik kan hierin de Fransche onderzoekers niet volgen, omdat ik uit hoofde van een groote reeks van onderzoekingen niet alleen meen, dat de passieve immunisatie benadeeld wordt (het simultaan immuniseeren is dus niet onschuldig!) maar tevens het anatoxine in zijn werking wordt opgeheven: *De „tétanos post sérique” is niet te beheerschen met vaccinaties.*

Naar analogie van dierproeven meen ik bij den actief geimmuniseerden mensch, bij op tetanusinfectie verdachte wond op een nieuwe injectie van tetanusanatoxine aan te moeten dringen, die hier dan de rol speelt van injectie de rappel. Ook al is bij de geimmuniseerde persoon het antitoxinegehalte aanmerkelijk gedaald, dan overweegt de antitoxineverwekkende prikkel van het anatoxine verre het verlies, dat ontstaat door binding van eventueel nog aanwezig antitoxine.

LITERATUUR.

1. STRICKER, F., Deutsche med. Wochenschrift 1909. pag. 1069.
Erfahrungen über Tetanus während des Weltkrieges.
2. HOFFMANN, W., Die deutschen Ärzte im Welt-Kriege, pag. 10.
3. MIGNON, A., Le service de santé, tome 1. pag. 501.
4. BEHRING, E. v., Allgemeine therapie der Infektionskrankheiten, 1899.
5. LÖWENSTEIN, E., Wiener klin. Wochenschrift, 1903. Über Katalasen in Bakterienfiltraten.
6. LÖWENSTEIN, E., Zeitschr. f. Hyg. und Inf. Krankheiten, 1909. pag. 491. Über aktive Schutzimpfung bei Tetanus durch Toxoïde.
7. LÖWENSTEIN, E., Handbuch der biol. Arbeitsmethoden, 1928. pag. 1046. Toxinen und Toxoïden.
8. DESCOMBEY P., Comptes rendus des séances de la Soc. de Biologie 1924. T 91, pag. 239. L'anatoxine tétanique.
9. DESCOMBEY, P., Annales de l'Inst. Pasteur 1925, pag. 485. Vaccination du cheval par l'anatoxine tétanique.
10. LEMOS MONTEIRO, J., Compt. rend. des Séances de la Soc. de Biol. 1925. T 92, pag. 309. L'immunisation antitétanique par la méthode des toxoïdes.
11. OKUDA, K., J. Jap. Soc. of Vet. Science 1923, 2, pag. 91. On the prophylactic value of iodized tetanus toxin. Centralblatt für Bact. etc. Referate, Bd. 76, pag. 507.
12. DESCOMBEY, P. en RAMON, G., C. r. des Séanc. de la Soc. de Biol. 1925, T 93, pag. 508. Sur l'immunisation antitétanique et sur la production de l'antitoxine tétanique.
13. RAMON, G., Ann. de l'Inst. Past. 1926, pag 1. Procédés pour accroître la production des antitoxines.
14. RAMON, G., DESCOMBEY, P., C. r. des Séanc. de la Soc. de Biol., 1925, T. 93, pag. 898. Sur l'immunisation antitétanique et sur la production d'antitoxine tétanique.
15. GRASSET, E., C. r. des Séanc. de la Soc. de Biol. 1927, T. 96, pag. 783. Essais de vaccination intracutanée et cutonée chez le cobaye par l'anatoxine tétanique.
16. DESCOMBEY, P., C. r. des Seanc. de la Soc. de Biol. 1926, T. 94, pag. 253. Sur la vaccination antitétanique du cheval. Durée de l'immunité.

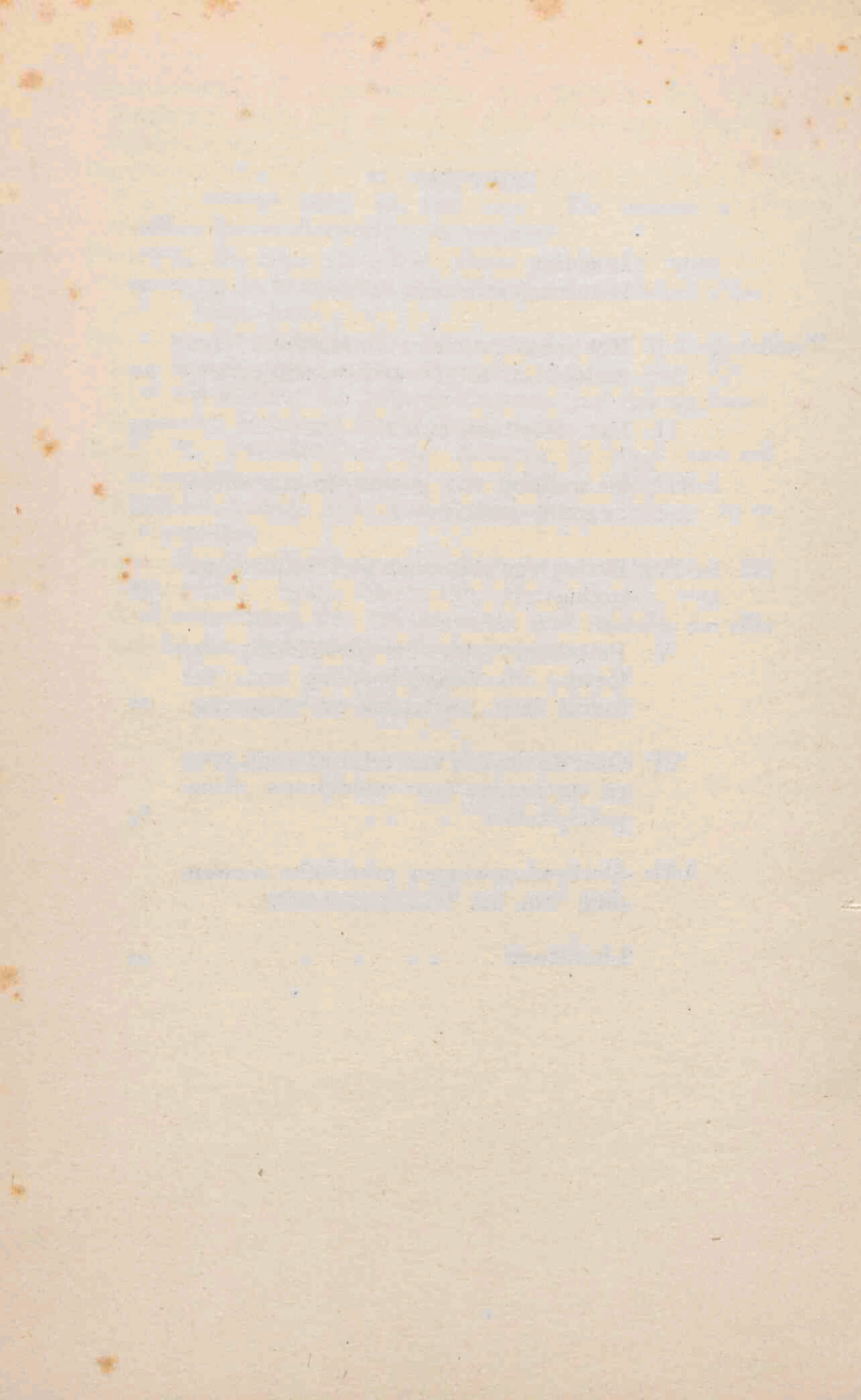
17. DESCOMBEY, P., C. r. des Séanc. de la Soc. de Biol. 1926, T. 94, pag. 315. L'immunisation antitétanique du cheval. Effets des injections d'anatoxine sur des sujets antérieurement vaccinés.
18. RAMON, G., ZOELLER, CHR., C. r. des Séanc. de la Soc. de Biol. 1926, T. 94, pag. 106. Les „vaccins associés” par union d'une anatoxine et d'un vaccin microbien (T.A.B.) ou par mélange d'anatoxines.
19. RAMON, G., NATTAN—LARRIER, L., GRASSET, E., C. r. des Séanc. de la Soc. de Biol. 1927, T. 97, pag. 501. Essais d'immunisation de l'animal par l'anatoxine tétanique associés à des agents chimiothérapiques.
20. RAMON, G., DESCOMBEY, P., Ann. de l'Inst. Past. 1927, II, pag. 834. L'anatoxine tétanique et la prophylaxie du tétanos chez le cheval et les animaux domestiques.
21. RAMON, G., ZOELLER, CHR., Ann. de l'Inst. Past. 1927, II, pag. 803. L'anatoxine tétanique et l'immunisation active de l'homme vis-à-vis du tétanos.
22. RAMON, G., ZOELLER, CHR., C. r. de l'Académie des Sciences 1926, No. 182, pag. 182. De la valeur antigène de l'anatoxine tétanique chez l'homme.
23. RAMON, G., ZOELLER, CHR., C. r. des Séanc. de la Soc. de Biol. 1929, T. 100, pag. 92. Nouveaux résultats concernant la vaccination de l'homme contre le tétanos.
24. NATTAN—LARRIER, L., RAMON, G., GRASSET, E., Ann. de l'Inst. Past. 1927, II, pag. 848. L'Anatoxine tétanique et l'immunité antitétanique chez la mère et le nouveau-né.
25. NATTAN—LARRIER, L., RAMON, G., GRASSET, E., Ann. de l'Inst. Past., 1927, II, pag. 862. Contribution à l'étude du passage des antigènes et des anticorps à travers le placenta.
26. RAMON, G., GRASSET, E., Ann. de l'Inst. Past. 1927, II, pag. 868. Recherches sur le passage des toxines, des anatoxines et des antitoxines à travers les parois du tube digestif.
27. DESCOMBEY, P., Ann. de l'Inst. Past. 1929, pag. 634. Sur la vaccination du cobaye contre le tétanos par injection intracrânienne d'anatoxine tétanique.
28. FEIERABEND, B., Zeitschr. für Imm. forschung, 1930, Band 68, Heft $\frac{3}{4}$, pag. 286. Titration kleiner Mengen von Tetanus-antitoxin.

29. FEIERABEND, B., Les travaux de l'Inst. d' Hygiène publique de l'Etat Tchécoslovaque. Oct. 1930, pag. 136.
L'immunisation active chez le cobaye, le cheval et l'homme au moyen de l'anatoxine tétanique.
30. ZOELLER, CHR., Presse Médicale 1925, pag. 994.
La réactivité spécifique, naturelle ou acquise.
31. NICOLLE, N., CÉSARI, E., JOUAN, C., C. r. de l'Acad. des Sciences 1919, pag. 1433. Précipitation mutuelle des toxines et de leur antitoxines. Application au titrage des sérums antidiphtériques et antitétaniques.
32. NICOLLE, N., CÉSARI, E., JOUAN, C., Ann. de l'Inst. Past. 1920, pag. 596. Etudes sur la précipitation mutuelle des anticorps et des antigènes.
33. RAMON, G., C. r. de l'Acad. des Sciences 1923, No. 177, pag. 1338.
34. RAMON, G., DESCOMBEY, P., C. r. des Séanc. de la Soc. de Biol. 1926, T. 95, pag. 434. Sur l'appréciation de la valeur antigène de la toxine et de l'anatoxine tétanique par la méthode de floculation.
35. SCHOLZ, W., Centralbl. f. Bact. etc. 1. Abt. Originale Bd. 92. Heft 5-6, pag. 434. Nachweis und Austitrierung antitoxischer Sera (insbesondere des Tetanus-antitoxins) im Reagenzglas.
36. ABT, G., ERBER, B., Ann. de l'Inst. Past. 1926, pag. 659. Sur le titrage des antitoxines et des toxines tétanique par la floculation.
37. SCHMIDT, S., Ann. de l'Inst. Past. 1928, pag. 63.
Le phénomène de floculation des toxines diphtérique et tétanique vis-à-vis de leur antitoxines.
38. KALIC, Z., C. r. des Séanc. de la Soc. de Biol. 1928, T. 98 pag. 649. Floculation non spécifique du sérum antitétanique.
39. BÄCHER ST., Zeitschr. für. Imm. forschung, 1927-1928, No. 54, pag. 261. Die experimentellen Grundlagen der Schutzimpfung mittels Toxoïden.
40. RAMON, G., BERTHELOT, A., GRASSET, E., Mlle. AMOUREUX, G., C. r. des séanc. de la Soc. de Biol. 1927 T. 96, pag. 30. Production d'anatoxine tétanique par culture du Bacille tétanique en bouillon bilié.
41. BÄCHER, ST., KRAUS, R., LÖWENSTEIN, E., Zeitschr. für Imm. forschung 1925, No. 42, pag. 350. Zur Frage der aktiven Schutzimpfung gegen Diphterie.

42. ISABOLINSKY, U., GITOWITSCH, W., Zeitsch. für Imm. forschung 1927, No. 52. pag. 334. Über die antigenen Eigenschaften der Anatoxine.
43. BRONFENBRENNER, J., en REICHERT, P., The Journal of Exp. Medicine 1925, 44, pag. 533. The nature of the toxin-antitoxin flocculationphenomenen.
44. DARZINE, E., Ann. de l'Inst. Past. 1929, pag. 1599. Etudes sur la flocculation des mélanges de toxine et d'antitoxine tétaniques.
45. HOEN, E., TSCHERTKOW, L., ZIPP, W., Zeitschr. f. Hyg. und Inf. Krankheiten, 1928, Bd. 108, Heft. 1. pag. 61. Über die Einheit der präcipitinogenen und der antitoxinbindenden Substanz im Diphterietoxin.
46. HOEN, E., TSCHERTKOW, L., Zeitschr. f. Hyg. und Inf. Krankheiten 1929. Band 110, Heft 2, pag. 272. Wertbestimmung des Tetanusheilserums mittels Ringpräcipitation.
47. HOEN, E., TSCHERTKOW, L., Zeitschr. f. Hyg. und Inf. Krankheiten, 1929, Band 110, Heft 4. pag. 732. Wertbestimmung des Tetanustoxin und -toxoids in vitro mittels der Ringpräcipitationsmethode.

INHOUD.

	Blz.
Inleiding	
Historisch overzicht	9
Hoofdstuk I: Het ontstaan van immuniteit door middel van tetanusanatoxineinjectie(s)	22
„ II: Het simultaan enten.	39
„ III: De werking van gemengde entstoffen, „vaccins associés”	44
„ IV: Enting van menschen met tetanusana- toxine	56
„ V: Beteekenis van de uitvlokking van RAMON als waardebeplating voor het toxine resp. anatoxine en antitoxine.	60
„ VI: Over de titratie van tetanus(ana)toxine en -antitoxine door middel van „Ring- präcipitation”	84
„ VII: Slotbeschouwingen, practische aanwen- ding van het tetanusanatoxine . . .	91
Literatuur	95



STELLINGEN.

I.

Het grooter worden van de „Bindungswert” te interpreteren als een vermindering van het antigeenvermogen van het anatoxine ten opzichte van het oorspronkelijke toxine berust op onvoldoenden grond.

II.

In omgevingen, waar de tetanus neonatorum frequent is, behandelde men den pasgeborene met seruminjectie eventueel make men de a.s. moeder vroegtijdig onvatbaar tegen tetanus met anatoxine.

III.

In geval van mobilisatie dienen de officieren met de leiding te velde belast aan een streng geneeskundig onderzoek onderworpen te worden, zoowel wat hun lichamelijken als hun psychischen toestand betreft.

IV.

Voor al in militairen dienst is slechts in het uiterste geval het voorschrijven van steunzolen, en dan voor elke persoon passend gemaakt, aangewezen.

V.

De waarde van den officier van gezondheid in voorste linie wordt niet beheerscht door z'n medische kennis.

VI.

Bij septische angina is tonsillectomie en blootleggen van het spatium parapharyngeum met al of niet onderbinding van de halsvenen ernstig te overwegen.

VII.

Bij trichophytie van de baard is Röntgenepilatie te ont-raden.

VIII.

Bij een advies betreffende zwangerschap aan een patiente met mitraalstenose houde men zich aan de uitspraak van Mackenzie. zie: Heart disease and pregnancy.

IX.

Indien anisokorie gepaard gaat met verminderde gevoeligheid van het hoornvlies, is de diagnose tabes waarschijnlijk.

