



Proeven ter verkrijging van een onschadelijke en zuivere entstof tegen diphterie

<https://hdl.handle.net/1874/283306>

Cl. qu. 192, 1926

PROEVEN TER VERKRIJGING VAN
EEN ONSCHADELIJKE EN ZUIVERE
ENTSTOF TEGEN DIPHTHERIE

A. C. BRANDWIJK

**PROEVEN TER VERKRIJGING VAN EEN
ONSCHADELIJKE EN ZUIVERE ENTSTOF
TEGEN DIPHTHERIE**



Diss. Utrecht 1926

**PROEVEN TER VERKRIJGING VAN
EEN ONSCHADELIJKE EN ZUIVERE
ENTSTOF TEGEN DIPHTHERIE**

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE
RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT OP
GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS
MR. J. PH. SUYLING, HOOGLEERAAR IN DE
FACULTEIT DER RECHTSGELEERDHEID,
VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER
UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN
VAN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE
TE VERDEDIGEN OP DINSDAG 4 MEI 1926,
DES NAMIDDAGS TE 4 UUR DOOR

A. C. BRANDWIJK

GEBOREN TE SCHOONHOVEN



ELECTRISCHE DRUKKERIJ L. E. BOSCH & ZOON — UTRECHT

AAN MIJN OUDERS
AAN MIJN VERLOOFDE

VOORWOORD.

Het is mij een aangename taak U, Hoogleeraren en Docenten der Medische en Philosophische Faculteiten, aan de Rijks Universiteit te Utrecht mijn dank te betuigen voor de tot nu toe van U genoten opleiding, die reeds in zooverre vruchten heeft mogen dragen, dat zij mij in staat stelde de in dit proefschrift beschreven onderzoekingen te verrichten. Weest ervan overtuigd, dat ik het een voorrecht acht, nog niet, zooals de meeste promovendi, dit onderzoek als het slot der opleiding te moeten beschouwen.

U, Hooggeleerden Aldershoff, Hooggeachten Promotor, dank ik niet alleen in het bijzonder voor de welwillende wijze waarop Gij mij in de gelegenheid hebt gesteld dit proefschrift te bewerken, maar ook voor het feit, dat Gij mij hebt bekend gemaakt met dezen nieuwen tak van wetenschap, waarvoor ik in mijn verdere leven steeds de volle belangstelling zal blijven behouden.

U, Zeergeleerden Pondman, dank ik voor de tegemoetkomende wijze, waarop Gij mij verschillende moeilijkheden hebt helpen overwinnen.

Gaarne breng ik hier ook een woord van dank aan U, Schuurmans Stekhoven, voor de vele nuttige wenken, die Gij mij bij de bestudeering der literatuur hebt gegeven.

Erkentelijk ben ik voor de welwillende medewerking, die ik van het personeel van het Rijks Serologisch Instituut mocht ondervinden.

HOOFDSTUK I.

Geschiedkundig overzicht.

In het laatst van 1890 publiceerde Behring zijn pogingen om caviae te immuniseeren tegen diphtherie met behulp van diphtheriebacillen. Hij verzwakte daartoe de virulentie dezer bacillen met behulp van chemicaliën, hoofdzakelijk door joodtrichloride. Bij proeven op paarden bleek, dat de onvatbaarheid bij deze dieren beter tot stand was te brengen door diphtherietoxine in te spuiten. Evenwel deden zich groote moeilijkheden voor om doodelijke toxinerwerking te voorkomen. Daarom gebruikte Behring eveneens joodtrichloride om de vergiftigheid van het toxine te verminderen, maar ook dit liet hij tenslotte weg en immuniseerde zijn paarden met behulp van diphtherietoxine, verdund met physiologische keukenzoutoplossing. Tenslotte bleek de beste weg voor het leggen van de grondimmunitet: gelijktijdige toediening van toxine en antitoxisch serum.

Bij onderzoek bleek n.l. dat serum van een met een dergelijk mengsel behandeld paard antitoxische eigenschappen krijgt. Wordt dit serum bij een mensch ingespoten, dan wordt ook deze mensch onvatbaar en blijft dit, zoolang nog antitoxine in zijn bloed aanwezig is. Dit antitoxische serum is dus te gebruiken om den mensch tijdelijk passief onvatbaar te maken tegen diphtherie.

Aan gebruik van diphtherieserum als afdoend voorbehoedmiddel staan echter verschillende nadeelen in den weg. Het grootste nadeel is de te korte duur van de immuniteit. De hoeveelheid antitoxine per c.c. bloed daalt direct na de inspuiting zeer snel, als gevolg van het feit, dat het soortvreemde serum spoedig wordt uitgescheiden.

Wanneer men kon beschikken over homoloog antiserum, d.w.z. anti-serum afkomstig van een mensch, zou na inspu-

ting hiervan de immuniteit veel langer blijven bestaan, omdat dit homologe serum in het lichaam niet aan proteolyse onderworpen is. Dit wordt bevestigd door het feit, dat pasgeborenen gedurende het eerste halve jaar een negatieve reactie van Schick vertoonen tengevolge van het van de moeder meegeregen antitoxine-gehalte van hun bloed. Bovendien zijn borstkinderen blijkbaar onvatbaar, zoolang zij gezoogd worden.

Dat homoloog antitoxine veel langer in het bloed blijft dan heteroloog, toonde Behring (1)¹⁾ aan door proeven op twee kinderen. Het eerste kind werd ingespoten met heteroloog antitoxisch serum, het tweede met homoloog. In het bloed van het tweede kind was het antitoxine na langen tijd nog aan te toonen, terwijl het uit het bloed van het eerste kind reeds verdwenen was.

Voor passieve onvatbaarmaking komt het gebruik van homoloog antiserum echter om praktische redenen niet in aanmerking. Men kan alleen beschikken over serum van dieren afkomstig, dus heteroloog serum. Wilde men dus langeren tijd passieve onvatbaarheid tot stand brengen met soortvreemd serum, dan zou men telkens weer opnieuw moeten inspuiten. Bovendien verdwijnt het bij de tweede injectie ingespoten antitoxine nog veel sneller uit het bloed dan het antitoxine van een eerste injectie. Bij een eerste inspuiting is het na twintig dagen verdwenen, bij een tweede na acht dagen. Behalve dit bezwaar, staat ook het gevaar voor anaphylaxie bij eventueel later noodige inspuiting van een therapeutische dosis antiserum aan de prophylactische toediening in den weg. Nog een nadeel is, dat het serum al vergiftig kan zijn voor vele patienten bij eerste inspuiting, zoowel bij prophylactische als therapeutische injectie (serumziekte).

De voorbehoedende serumtoediening tegen diphtherie zal beperkt moeten blijven tot omgevingen, waar onmiddellijk gevaar voor infectie bestaat, b.v. kinderziekenhuizen, inter-

¹⁾ Cijfers verwijzen naar de literatuurlijst.

naten, en families waar een geval van diphtherie voorkomt, enz.; waar dus voor actieve onvatbaarmaking geen voldoende tijd is.

Op grond van deze bezwaren, klevend aan de passieve onvatbaarmaking, maar niet minder wegens het feit, dat, niet-tegenstaande de therapeutische toepassing van diphtherieserum, nog jaarlijks in ons land $\pm$ 250 kinderen aan diphtherie sterven, voelen we de behoefte aan een actieve onvatbaarmaking ten zeerste. Ook hiervoor heeft Behring den weg gewezen in zijn toxine-antitoxine mengsel.

Bij actieve immunisatie wordt in het lichaam zelf, dus „autoloog”, antitoxine gevormd. Weliswaar beschikt de actief onvatbaar gemaakte persoon niet in lengte van dagen over vrij antitoxine in zijn bloed, maar het groote voordeel van de actieve immuniseering is, dat het lichaam in een allergischen toestand gaat verkeerren, zoodat het in staat is op een hernieuwden specifiek prikkel door bij besmetting met diphtheriebacillen gevormd toxine, te reageeren met een nieuwe zeer snelle en ruime productie van antitoxine.

Het toxine-antitoxine mengsel (T.A.) door Behring voor actieve onvatbaarmaking aangegeven, bevat een overschot aan toxine, is dus zoogenaamd *onderneutraal*. De zich na de enting vormende homologe antitoxinen waarborgen een langdurige giftimmunitet.

Behring bereidde verschillende toxine-antitoxinemengsels, waarvan T.A. VI en T.A. VII het meest gebruikt worden. Het T.A. VII is bestemd voor alle personen ouder dan $1\frac{1}{2}$ jaar. Het wordt, evenals T.A. VI, in bepaalde verdunningen met physiologische zoutoplossing intracutaan ingespoten. Het T.A. VII is niet bruikbaar om kinderen beneden $1\frac{1}{2}$ jaar onvatbaar te maken. Deze kinderen zijn slechte antitoxinevormers, hun gevoeligheid voor T.A. is gering, zoodat Behring kinderen beneden $1\frac{1}{2}$ jaar voor enting met het zwakkere T.A. VII ongeschikt acht. Hij gebruikte daarom voor kinderen tusschen $\frac{1}{2}$ en $1\frac{1}{2}$ jaar een meer toxisch T.A., n.l. het genoemde T.A. VI. De goede werkzaamheid der T.A. praepa-

raten is niet alleen aan een bepaalden tijdsduur gebonden, maar ook de samenstelling van het mengsel moet aan zeer bepaalde eischen, in verband met het antitoxinebindend vermogen van het gebruikte toxine, voldoen.

Behring meende, dat de immuniteit steeds gebonden zou zijn aan de aanwezigheid van vrij antitoxine in het bloed. Zoodra het antitoxinegehalte van het bloed beneden een zekere grens zou dalen, zou de onvatbaarheid verdwenen zijn, zoodat volgens hem de immuniteit voor diphtherie na T.A. behandeling na $1\frac{1}{2}$ tot 2 jaar weer voorbij zou zijn. Deze opvatting blijkt echter niet juist, zooals ook hier te lande ten Bokkel Huinick kon aantoonen. Hij kon met zekerheid uitmaken, dat patienten, die met T.A. behandeld waren, en na $1\frac{1}{2}$ tot 2 jaar geen belangrijke hoeveelheid antitoxine in hun serum meer hadden, in een allergischen toestand verkeerden, zoodat zij in staat waren om op een nieuwe T.A.-inspuiting veel sneller met antitoxine-vorming te reageeren dan vroeger. Hij heeft dit onderzocht bij 9 kinderen die ongeveer twee jaar te voren waren geïmmuniseerd met T.A. en daarop hadden gereageerd met de vorming van antitoxine in verschillende hoeveelheden en die allen blijkens een antitoxinebepaling van hun bloed een sterke daling van het vroegere antitoxine-gehalte vertoonden. Reeds twee dagen na de nieuwe T.A. inspuiting bleek het bloed een hoog antitoxine-gehalte te bezitten.

Ten Bokkel Huinick toonde hiermee dus aan, dat er tengevolge van een immunisatie met T.A., een toestand ontstaat, die het individu in staat stelt met groote snelheid antistoffen te vormen als reactie op een hernieuwden specifiek prikkel. Men kan verwachten, dat dergelijke, met T.A. behandelde en in een allergischen toestand verkeerende personen, ook snel antitoxine zullen vormen, zoodra het bij een natuurlijke infectie met diphtheriebacillen tot resorptie van diphtherietoxine komt.

Ook Aldershoff (2) kon, in verband met de reactie van Schick, aantoonen, dat het ontbreken van vrij antitoxine in het

bloed nog niet gemis aan onvatbaarheid beteekent, dat er dus een latente immuniteit bestaat. Van 24 kinderen, die diphtherie hadden gehad, vertoonden 11 een positieve reactie van Schick en 13 een negatieve reactie. Van 33 verpleegsters, die diphtheriepatienten hadden verpleegd, vertoonden 15 een positieve reactie. Wanneer men bij dergelijke, waarschijnlijk onvatbare, personen 0,1 cc T.A. van Behring in verdunning 1/40 intracutaan inspuit, dan ziet men in veel gevallen hierop een sterke reactie ontstaan. Dit is een bewijs, dat deze personen reeds gesensibiliseerd zijn. Personen, die een positieve reactie van Schick vertoonen als uiting van vatbaarheid, reageeren zeer zelden op deze gift T.A. intracutaan.

Verder vond Aldershoff, dat, wanneer men drie à vier dagen na de positief uitgevallen reactie van Schick bij volwassenen of kinderen, die diphtherie hebben gehad, de reactie nogmaals uitvoert, deze in eenige gevallen negatief is geworden. Door den prikkel, uitgeoefend door de kleine hoeveelheid toxine, bij de eerste reactie van Schick ingebracht, is er dus weer vrij antitoxine in voldoende hoeveelheid gevormd.

De reactie van Schick bewijst dus niet de aanwezigheid of afwezigheid van vatbaarheid, maar is alleen een reactie op de al of niet aanwezigheid van vrij antitoxine. Zij behoudt echter voor jonge kinderen haar waarde, omdat die kinderen nog slechts zelden op natuurlijke wijze onvatbaar zijn geworden.

Bij behandeling met T.A. van Behring is in den regel de vorming van antitoxine eerst drie weken na het begin van de behandeling aan te toonen en ook dan herhaaldelijk nog maar in geringe hoeveelheid, terwijl die hoeveelheid in den loop van de tweede maand stijgt. De T.A.-behandeling is dus in verband met den betrekkelijk langen tijd, die voor de vorming van antitoxine noodig is, ongeschikt voor toepassing bij personen, die al met diphtheriebacillen besmet zijn. Deze menschen zullen behandeld moeten worden met voorbehoe-

dende seruminspuitingen om direct tegen de toxinen van de bacillen beschermd te worden. Deze bescherming duurt echter slechts twee tot drie weken. Men heeft daarom getracht de passieve immunisatie te combineeren met de actieve. De eerste drie weken zou dan het ingebrachte heterologe serum de beschuttende werking kunnen uitoefenen, terwijl dan na dien tijd het door de actieve immunisatie ontstane antitoxine de beschermende rol zou kunnen overnemen. In enkele gevallen gelukt dit inderdaad, maar in verreweg de meeste gevallen blijkt, dat het ingebrachte antitoxine de actieve onvatbaarmaking verhindert, zooals Zingher ondervond.

Zingher was in twee weesinrichtingen bezig met de actieve immunisatie tegen diphtherie. In de eerste inrichting was alleen nog maar de reactie van Schick uitgevoerd, in de andere was de eerste inspuiting met het Amerikaansche T.A. reeds gegeven, toen in deze weeshuizen diphtherie uitbrak. Men diende nu een voorbehoedende serumdosis toe, terwijl men met de actieve immunisatie verder ging. Het resultaat was, dat na drie maanden een groot deel der behandelde kinderen nog een positieve reactie van Schick vertoonde. De combinatie van passieve en actieve immunisatie heeft men daarna in Amerika geheel opgegeven. Is passieve immunisatie noodig, dan wacht men in die gevallen twee maanden, vóórdat men een T.A. behandeling laat volgen.

In verband met de door Zingher opgedane ervaring, dat een wegens het optreden eener epidemie noodzakelijk geworden inspuiting met serum, den uitslag der reeds begonnen actieve onvatbaarmaking te niet deed, stelde Aldershoff zich, bij het onderzoek naar onvatbaarheid bij personen, die diphtherie hadden gehad, de vraag, of en in hoeverre de toediening van antidiphtherieserum tijdens de ziekte invloed uitoefent op het ontstaan van onvatbaarheid. Van 23 personen, die diphtherie hadden gehad en met antiserum waren behandeld, vertoonden 15 toch nog een positieve reactie van Schick. Hieruit volgt, dat het ontstaan van natuurlijke immuniteit door serumbehandeling belemmerd wordt.

De ervaringen opgedaan met het T.A. van Behring zijn over het algemeen niet groot, in verhouding misschien nog het grootst hier te lande. (Ten Bokkel Huininck, Hulshoff Poll, Kramer, Aldershoff).

Schreiber (4) behandelde 40 patienten met T.A. van Behring. Uit zijn onderzoek blijkt, dat door middel van eenige injecties met T.A. een antitoxinegehalte van het bloed te verkrijgen is, groot genoeg om een zekere beschutting tegen een niet te sterke bacterieele infectie te geven.

Hahn (5) immuniseerde 40 patienten. Het gelukte hem in de meeste gevallen in drie tot vijf weken, zonder schade voor het organisme, een actieve onvatbaarheid tot stand te brengen. Hij meent, dat men bij een epidemie de klinisch nog gezonden met het T.A. van Behring dient in te spuiten, hetgeen op grond van het voorafgaande minder juist moet worden geacht.

Kleinschmidt en Viereck (5) spoten een dertienjarig meisje in met T.A. van Behring. Het bloed van dit kind bleek na 17 dagen een zeer hoog antitoxinegehalte te bezitten.

In 1914 deelde Behring (6) mede, dat ongeveer 7000 injecties met zijn T.A. uitgevoerd waren. In verband met het resultaat van deze injecties meende Behring te kunnen zeggen, dat bij geregelde toepassing van zijn T.A., de diphtherie als endemische ziekte tot verdwijnen zou zijn te brengen, even goed als pokken door koepokenting.

Röhmer (7) ging de antitoxinevorming bij zuigelingen na. Hij onderzocht 46 kinderen van $2\frac{1}{2}$ maand tot $1\frac{1}{2}$ jaar oud en vond, dat na de injectie in 17 gevallen geen antitoxine in het bloed was aan te toonen. Bovendien was er een duidelijk onderscheid te merken tusschen kinderen, jonger dan $4\frac{1}{2}$ maand en oudere kinderen. Bij de jongste kinderen was het resultaat zeer gering. Immers, kinderen jonger dan 6 maanden zijn als regel passief immuun.

Ten Bokkel Huininck (8) toonde door een onderzoek op een groot aantal schoolkinderen aan, dat het T.A. mengsel van Behring in staat is op ongevaarlijke wijze bij den mensch de vorming van antitoxine op te wekken. Tevens kon hij be-

wijzen, dat ook na T.A.-injectie een allergische toestand ontstaat, die het organisme in staat stelt als reactie op een hernieuwde inspuiting, in zeer veel korter tijd dan voordien, antitoxine te vormen; dat dus geënte personen ook in dit opzicht geheel gelijk te stellen zijn met hen, die op natuurlijke wijze onvatbaar zijn geworden. Tijdens diphtherie-epidemieën in scholen, weeshuizen, enz., beveelt hij aan: actieve immunisatie met behulp van T.A.-inspuitingen, waartegen evenwel dezelfde bezwaren bestaan, als die naar aanleiding van Hahn's opvattingen geuit.

Ook Kramer (9) komt op grond van zijn ervaringen tot dezelfde inzichten. Hij zegt: „Wil men bij epidemieën of bij dreigende epidemieën voorbehoedend ingrijpen, dan moet m.i. de gedragslijn de volgende zijn:

10. In het gezin, waar diphtherie is voorgekomen, aan de medeverdachte kinderen een voorbehoedende serumgift geven; bij de overige gezinsleden de reactie van Schick toepassen en bij een positieve uitkomst dezen met T.A. behandelen.
20. Bij schoolepidemieën, e.d., de op Schicktoxine positief reageerende kinderen met T.A. inspuiten.

In weeshuizen, gestichten, kinderhuizen voor vacantiëkolonies, en dergelijke meer, zal men zonder veel bezwaar, ook zonder dat er diphtherie heerscht, zuiver uit voorzorg dus, naar gelang van den uitslag van de reactie van Schick, een T.A. behandeling kunnen instellen.”

Kramer (10) onderzocht verder bij 114 verpleegsters, die diphtherie-patienten moesten verzorgen, de immuniteit tegen diphtherie met behulp van de reactie van Schick. In die gevallen, waarin de reactie positief was, werd T.A. ingespoten. Was de reactie negatief, dan werd geen behandeling toegepast. De verpleegsters, die met T.A. behandeld waren, kregen over het algemeen geen diphtherie, terwijl bij de onbehandelden, met een negatieve reactie van Schick, wel gevallen van deze ziekte voorkwamen.

De reactie van Schick valt negatief uit, wanneer per cc bloed $1/30$ A.E. of meer, aanwezig is. Voor volwassenen schijnt, blijkens de uitkomsten die Kramer kreeg, deze grens van $1/30$ A.E. per cc te laag te zijn om voldoende te beschutten. Kramer raadt daarom aan, alle volwassenen, die met diphtheriepatienten in aanraking komen, regelmatig met T.A. te behandelen, ook al vertoonen deze menschen een negatieve reactie von Schick.

Bieber (11) vond het groot aantal entingen, noodig bij de T.A. behandeling volgens Behring, een bezwaar voor de algemeene praktische toepassing. Dikwijls zijn vijf inspuitingen intracutaan noodig om onvatbaarheid te veroorzaken, d.w.z. om een voldoende antitoxinegehalte van het bloed te verkrijgen. Bieber trachtte daarom een entstof te bereiden, die op een eenvoudige manier te gebruiken was. Verder moest deze stof de onvatbaarheid snel tot stand brengen, en bovendien onschadelijk voor het organisme zijn. Hij probeerde eerst zijn doel te bereiken met behulp van sterk verdund toxine. Maar de antitoxinevorming was hierbij na één of twee entingen gering. Om met dit verdund toxine een goede immuniteit te verkrijgen, zouden zeer veel entingen noodig zijn, wat weer praktisch onuitvoerbaar is. Daarom keerde Bieber weer terug tot proeven met een T.A.-mengsel, waarin meer antitoxine aanwezig was dan in het T.A. van Behring. Hij onderzocht de werking van dat mengsel door bij 80 menschen inspuitingen ermee te verrichten en vond, dat bij 70 % één enting subcutaan voldoende was om onvatbaarheid te veroorzaken. Bij 30 % van de personen waren twee entingen noodig. Vier weken na de eerste enting werd een voldoende antitoxinegehalte van het bloed gevonden.

Waar Bieber niet aangeeft of zijn mengsel nog toxisch is, valt het resultaat, in verband met de vraag of neutrale en overneutrale mengsels ook immuniseeren, niet voldoende te beoordeelen.

Niettegenstaande met het T.A. van Behring een goede

onvatbaarheid is te verkrijgen, zijn aan deze methode verschillende bezwaren verbonden. De enting in de huid is technisch moeilijk. De herhaalde entingen, twee tot vijf in aantal, zijn lastig voor het kind, voor de ouders en ook voor den arts. Verder is de juiste samenstelling van het toxine-antitoxinemengsel van Behring niet nauwkeurig bekend, en is de giftigheid niet steeds dezelfde (Aldershoff). Behring liet zich over de juiste samenstelling van zijn toxine-antitoxinemengsel niet uit. Er is slechts van bekend, dat het onderneutraal is, d.w.z. dat het aanwezige toxine slechts gedeeltelijk geneutraliseerd is door het antitoxine.

Bovenstaande bezwaren hebben ertoe geleid, dat de intracutane methode van Behring vervangen werd door de subcutane; een methode, die door Park en Zingher in New-York is aangegeven. Deze methode heeft de volgende voordeelen boven die van Behring. De toepassing is eenvoudig. Er zijn maar drie subcutane inspuitingen noodig, telkens met één week tusschenruimte. De samenstelling van het toxine-antitoxinemengsel is bekend, terwijl de methode reeds op groote schaal is toegepast.

Oorspronkelijk gebruikten Park en Zingher een toxine-antitoxinemengsel van de samenstelling 0.85 L† gemengd met 1 A.E., d.w.z. dat een hoeveelheid antitoxine, die in staat is 100 d.l.m. te binden, gemengd wordt met 85/100 deel van L†. L† is de hoeveelheid toxine, die gemengd met 1 A.E. nog juist in staat is een cavia van 250 gram in 4 dagen te doden, dus nog 1 d.l.m. vrij toxine bevat. Berekent men dit voor een toxine, waarvan L† is 0.35 cc. en de d.l.m. is 0.007 cc. dan blijkt, dat op $0.85 \times 0.35 = 0.2975$ cc. toxine, bevattend $\frac{0.2975}{0.007} = 42.5$ d.l.m., komt 1 A.E., die in staat is 100 d.l.m. toxine te neutraliseeren. Het T.A. mengsel is dus volgens deze berekening $\frac{100}{42.5} = 2.35$ maal geneutraliseerd, d.w.z. sterk overneutraal. Toch is het in proeven op dieren onderneutraal, het is toxisch. Wanneer men uitgaat van de tusschen L† en d.l.m. bestaande verhoudingen, is schijnbaar overmaat anti-

toxine toegevoegd. In werkelijkheid blijft nog toxine vrij, omdat een deel van het antitoxine aan de toxoïden wordt gebonden en dus geen voor het toxine neutraliseerende werking heeft.

Bij de bereiding van een T.A.-mengsel moet men dus rekening houden met de antitoxinebindende eigenschappen van het gebruikte toxine en niet uitgaan van een schema, ontleend aan de theoretische verhoudingen tusschen $L\ddagger$, d.l.m., en A.E. Controle door proeven op dieren blijft steeds noodzakelijk, waarbij door Banzhaf (12), die de mengsels van Park en Zingher standaardiseert, voor dit oude mengsel, $0.85 L\ddagger + 1 A.E.$, wordt aangegeven, dat 1 cc. bij een cavia van 350 gram slechts een gering infiltraat mag geven en geen verlamming, terwijl 5 cc. een duidelijke plaatselijke reactie gevolgd door verlamming, dus geen acuten dood, mag veroorzaken.

Dit mengsel, $0.85 L\ddagger + 1 A.E.$, bevat een groote hoeveelheid toxine, die echter voor een groot deel is geneutraliseerd. Nu rijst de vraag: kan men dezelfde uitwerking bereiken door een kleinere hoeveelheid toxine in te spuiten, die voor een kleiner deel door antitoxine is geneutraliseerd? De voordeelen hiervan zijn, dat men minder proteïnen, afkomstig van de bacteriën en van den voedingsbodem, en minder eiwit, afkomstig van het voor neutraliseering toegevoegde serum, in het mengsel heeft. Vooral dit laatste is een voordeel, daar toch herhaalde inspuitingen van zeer kleine hoeveelheden vreemd eiwit, het gevaar voor overgevoeligheid voor dit eiwit doen ontstaan. Dat dit bij de enting met T.A. praktische waarde heeft, blijkt uit de onderzoekingen van Hooker (13) over de opwekking van overgevoeligheid door zeer kleine hoeveelheden paardenserum; met T.A. behandelde personen vertoonen een overgevoeligheid van de huid. Park bevestigt dit, met de opmerking, dat deze overgevoeligheid echter heel wat zwakker is dan bij personen, die vroeger behandeld zijn met therapeutische seruminspuitingen. Hooker acht deze overgevoeligheid echter geen reden om bij de be-

reiding der T.A.-mengsels van serum, afkomstig van een ander dier dan van het paard, gebruik te maken, zelfs niet, als in de toekomst alle kinderen tegen diphtherie zouden worden geïmmuniseerd. Waar men over schapendiphtherieserum beschikt, zooals in het Rijks Serologisch Instituut (R. S. I.) te Utrecht, verdient bereiding van T.A. met behulp van dit serum toch aanbeveling. Zeker is het van groot belang om de hoeveelheid vreemd eiwit in het toxine-antitoxinemengsel zoo gering mogelijk te doen zijn.

Volgens dit beginsel hebben Park en Zingher (14) hun nieuw T.A. bereid. Dit bevat per cc. $0.1 \text{ L}^{\dagger} + 0.075 \text{ A.E.}$, dus per cc. heel wat minder toxine, maar ook absoluut en in verhouding minder antitoxine. Ook hier bestaat controle door proeven op dieren, n.l. 1 cc. moet steeds verlamming geven, die meestal na 18 dagen doodelijk afloopt, terwijl 5 cc. in 10 dagen, maar ook niet eerder, den dood veroorzaakt. Het mengsel is wat meer toxisch dan het vroeger gebruikte $0.85 \text{ L}^{\dagger} + 1 \text{ A.E.}$, maar de reactie bij den mensch is geringer, doordat het minder proteïnen bevat. De onvatbaarmakende werking is even goed gebleken als van het vroeger gebruikte mengsel. Na inspuiting van 1 cc. per keer is de reactie gering. Tegenwoordig wordt het mengsel, bereid volgens het beginsel (*niet* volgens het schema) van Park en Zingher, door het R. S. I. afgeleverd.

Dat dit middel, T.A.U(trecht), goede resultaten geeft, blijkt uit mededeelingen daaromtrent van den geneeskundigen inspecteur Dr. Doyer. Bij de entingen te Uitgeest bleek, dat bij 319 kinderen, die vóór de enting een positieve reactie van Schick vertoonden, deze na de enting nog positief was gebleven bij 9 kinderen, d.i. 2,8 %, terwijl 18 kinderen, d.i. 5.6 %, nog zeer zwak reageerden. Bij 91.5 % kan dus de enting als geslaagd worden beschouwd. Dr. Doyer zegt: „Dit resultaat, wordt nog overtroffen door de praktische gevolgen, want sinds de vaccinatie werd ingesteld, hebben zich te Uitgeest geen gevallen meer voorgedaan. Het practisch resultaat is dus 100 %.”

Opgemerkt dient te worden, dat er nog voorstanders zijn voor de intracutane methode, zij het dan ook op andere gronden. Böhme en Riebold (15) meenen, dat de methode van Behring voor Duitschland te duur is en dat zij daarvoor in de plaats moeten stellen het gebruik van hun „diphtherielympe”. Dit bestaat uit een emulsie van levende diphtheriebacillen. Deze diphtherielympe wordt op dezelfde manier toegepast als koepokstof. Böhme en Riebold hebben 62 personen met hun lympe behandeld. Zij vonden, dat van het gebruik van levende, toxine-afscheidende diphtheriebacillen geen nadeelige gevolgen zijn te vreezen. Toch heeft deze methode tegenover de onderhuidsche inspuiting zooveel nadelen, dat practische toepassing geen aanbeveling verdient.

Naast de genoemde voordeelen bezit T.A. echter ook nadelen. Het blijft toch altijd toxisch. En dat de toxiciteit door allerlei invloeden kan toenemen, blijkt uit het feit, dat in Amerika eenmaal door aflevering van een toxisch mengsel door een „commercial laboratory”, in een der zuidelijke steden acht dooden onder de ingespoten kinderen te betreuren waren. Dit T.A. bleek n.l. bevroren te zijn geweest, waardoor blijkbaar toxine was vrijgekomen. Ook de doodelijke gevallen die zich in Oostenrijk hebben voorgedaan, wijzen erop, dat bij de bereiding en toediening van T.A. alle noodige voorzorgen moeten worden genomen.

Verder bestaat het gevaar, dat de geënte persoon gevoelig, c.q. overgevoelig is voor het serumeiwit van het antitoxine uit het T.A.-mengsel. Verder laat de standvastigheid van de T.A. mengsels te wenschen over. Op den duur treden er veranderingen in op, waardoor de goede werking verloren gaat en gevaren bij het gebruik kunnen ontstaan.

Bovenstaande bezwaren hebben ertoe geleid, pogingen in het werk te stellen om een geheel ongiftig toxine, dat echter zijn onvatbaarmakende antigeenwerking behouden heeft, in handen te krijgen. Verschillende onderzoekingen in deze richting zijn dan ook gedaan.

Busson en Loewenstein (16) meenden, dat door de behan-

deling van diphtherietoxine met formol ook de onvatbaar-makende werking verloren ging. Toevoeging van formaline en maandenlang verblijf bij broedtemperatuur ontnam naar hun ervaring het toxine ook zijn onvatbaar-makende werking. Hun ervaring is echter in strijd met die van tal van anderen.

Glenny en Sudmersen (17) vonden, dat caviae na inspuiten van met formaline bewaard toxine, geen reactie gaven, maar wel onvatbaar werden.

Glenny en Hopkins (18) voegden aan diphtherietoxine één per duizend formaline toe en verwarmden dit vier weken lang op 37° C. De giftigheid van het toxine was hierdoor sterk verminderd maar niet geheel verdwenen. Met dit „modified toxin” of „toxoid”(??) deden zij proeven op konijnen en vonden, dat de onvatbaar-makende werking van diphtherietoxine stijgt, indien het toxine veranderd is in toxoid. In ieder geval kan worden gezegd, dat formol aan het toxine zijn toxische werking ontnemt en de antigeen - d.i. antistofverwekkende - werking doet behouden. Ja, het schijnt zelfs, dat de toxische factor de antigeen factor belemmert.

Practische beteeckenis heeft echter dit ontgifte toxine pas gekregen door den arbeid van Ramon (19) in het Instituut Pasteur te Parijs. Hij vond, dat zich in een mengsel van diphtherietoxine en -antitoxine een vlokkig neerslag vormt, het duidelijkst bij 37° C. Het neerslag ontstaat het eerst in dat mengsel, waar het toxine juist door het antitoxine geneutraliseerd wordt. (floculation initiale). Dit mengsel vertoont bij een cavia geen toxische werking meer, terwijl ook de beschuttende werking verdwenen is, d.w.z. er is noch vrij toxine, noch vrij antitoxine aanwezig.

Met behulp van deze uitvlokkingsreactie is de sterkte van een antitoxine of toxine te bepalen, indien men een toxine of antitoxine van bekende sterkte in handen heeft. Deze methode geeft veel snellere uitkomsten dan de proeven op dieren en spaart vele dieren uit. De toepassing van de reactie is eenvoudig, hoewel ervaring voor betrouwbare aflezing vereischt wordt, en het gebruik van een sterk toxine noodig is, daar

slechts dan de uitvlokking scherp en duidelijk tot stand komt.

Het denkbeeld om antitoxische sera te titreeren door middel van uitvlokking met toxine, is niet van Ramon afkomstig. Reeds in 1909 gebruikten Calmette en Massol de uitvlokingsreactie bij het titreeren van antislangenbeetserum.

Nicolle, Césari, en Debains (20) brachten het beginsel in toepassing bij het titreeren van diphtherie- en tetanus-serum door middel van een ringreactie, die ontstaat, als met toxine vermengde gestolde gelatine wordt overgoten met antitoxisch serum.

Georgi (21) vond, onafhankelijk van de genoemde onderzoekers, dat antitoxische sera door uitvlokking kunnen worden getitreerd. Hij merkte op, dat, wanneer hij bij een mengsel van toxine en antitoxine gecholesterineerd hartextract voegde, uitvlokking optrad ongeveer bij het neutrale punt. Evenwel is aan Georgi ontgaan, dat reeds ook door eenvoudige menging van toxine en antitoxine een neerslag ontstaat.

Ramon voegde aan zijn mengsels van toxine en antitoxine 0.2 per duizend formaline toe, teneinde omzettingen door besmetting met levende kiemen tegen te gaan. Hij merkte op, dat deze formalinetoevoeging geen invloed had op het uitvlokkend vermogen van het toxine. Toxine, waaraan formaline was toegevoegd en dat geruimen tijd aan het licht was blootgesteld geweest, behield zijn waarde om door middel van uitvlokking de sterkte van een serum te bepalen. De toxische eigenschappen namen sterker af, naarmate het formaline langer inwerkte, totdat ten slotte een toxine ontstond, dat geheel onschadelijk werd voor een dier. De omzetting van het toxine in dit ongiftige product kon volgens Ramon worden bespoedigd door toevoeging van méér formaline en door hogere temperatuur. De onvatbaarmakende werking bleef behouden. Toxine, waaraan 3 à 4 per duizend formaline wordt toegevoegd en dat een zekeren tijd aan een temperatuur van 37° — 42° C. wordt blootgesteld, blijft met dezelfde hoeveelheid antitoxisch serum de uitvlokingsreactie geven. De reactie verloopt iets langzamer als met het oorspronkelijke

toxine, maar dit ongiftige toxine, „anatoxine” volgens Ramon, geeft bij een cavia noch plaatselijke noch algemeene verschijnselen, zelfs niet in groote giften van b.v. 5 cc. Een toxine, dat door invloed van formaline en een temperatuur van 37°—42° C. zijn toxische eigenschappen heeft verloren, maar zijn uitvlokkend vermogen nog bezit, heeft ook zijn immuniseerende eigenschappen bewaard. Er blijkt dus een rechtstreeksche verhouding te bestaan tuschen het uitvlokkend vermogen en de onvatbaarmakende werking. De anti-geenwerking wordt dus bepaald door het uitvlokkend vermogen, niet door de toxiciteit. Hoe meer antitoxine-eenheden een bepaalde hoeveelheid anatoxine noodig heeft om uit te vlokken en hoe sneller deze uitvlokking plaats heeft, des te sterker is het onvatbaarmakend vermogen. Door middel van de uitvlokkingsreactie van Ramon is het dus mogelijk de immuniseerende werking van anatoxine te bepalen.

Ramon heeft met zijn anatoxine proeven gedaan op caviae. Veertien dagen na een onderhuidsche inspuiting van 1 cc. anatoxine, verdraagt een cavia reeds meerdere dodelijke giften toxine. Ramon vond verder, dat hij met zijn anatoxine ook paarden kon immuniseeren.

Nadat Ramon bij dieren goede resultaten verkregen had, is het anatoxine ook toegepast om kinderen tegen diphtherie te immuniseeren. Het is gebleken, dat het anatoxine ook bij den mensch onvatbaarheid veroorzaakt. Zoeller meent zelfs na 6 weken 100 % goed gevolg te zien.

Uit mededeelingen van Darré, Loiseau, Laffaille, Roubinovitch en Zoeller (22) valt af te leiden: anatoxine werkt bij den mensch als antigeen. De vóór de enting positieve reactie van Schick wordt negatief en het serum van den patient bevat antitoxine. Deze vorming van antitoxine gaat snel, sneller dan met toxine-antitoxinemengsel. De onvatbaarheid ontstaat bij 88.7 % der geënten na 5 à 6 weken en bij 98.8 % na 8 weken. Verder behoudt het serum van den patient langen tijd zijn antitoxische werking. Volgens deze onderzoekers is de plaatselijke en algemeene reactie zelden merkbaar en hoogst

zelden van eenige beteekenis, waarbij echter dient te worden opgemerkt, dat zij jonge kinderen beneden 6 jaar immuniseerden. Indien bij deze een plaatselijke reactie ontstaat, verdwijnt ze weer spoedig. De algemeene reactie uit zich door lichte temperatuursverhooging, die niet parallel gaat met de plaatselijke reactie.

Park en Zingher (23) hebben ook reeds proeven genomen met „toxoid”. Dit toxoid was niet geheel ongiftig, maar had nog zwak toxische eigenschappen. Zij voegden nog antitoxine toe, zoodat zij dus eigenlijk werkten met een toxine-antitoxinemengsel, waarin verzwakt toxine aanwezig was. De werking van dit mengsel bleek minder toxisch dan van hun oude toxine-antitoxinemengsel, hetgeen niet te verwonderen is. De plaatselijke reactie, toegeschreven aan de aspecifieke proteïnen, was bij kinderen echter zeer sterk, ook bij tienvoudige verdunning. Ook hun bleek, dat het onvatbaarmakend vermogen niet afhangt van de toxiciteit, maar van het vermogen om antitoxine te binden. Vandaar, dat zij er toe overgingen onderzoeken te doen met geheel atoxisch anatoxine, bereid volgens de methode van Ramon, door 4 tot 5 weken verwarmen op 38° C. na toevoeging van 2 à 3 per duizend formaline. De onvatbaarmakende werking van het anatoxine bleek even goed te zijn als van T.A., maar de plaatselijke reactie was zeer sterk door het groote proteïnegehalte van het anatoxine. Ook bij tien- tot twintigvoudige verdunning bleef de plaatselijke reactie bestaan.

Ramon raadt daarom voor het immuniseeren met anatoxine den leeftijd van 1½—6 jaar aan, omdat die kinderen meestal nog niet gesensibiliseerd zijn voor de bacteriënproteïnen, daar zij als regel nog niet in aanraking geweest zijn met diphtheriebacillen, zoodat de plaatselijke reactie bij die kinderen gering is.

Aldershoff (3) vond, dat na toevoeging aan diphtherietoxine van 3 à 4 per duizend formaline, de tijd, die noodig is om een geheel ongiftig anatoxine te verkrijgen, afhankelijk is van de temperatuur, waaraan het toxine wordt blootgesteld en

dat een langzame ontgifting gedurende vier tot vijf weken bij 37° C. de voorkeur verdient boven een snellere bij 40°—42° C., zooals oorspronkelijk door Ramon werd aangegeven. Het immuniseerend vermogen bleef in het eerste geval iets beter. Hij stelt als eisch van onschadelijkheid, dat 5 cc. bij een cavia onderhuids ingespoten, geen plaatselijke of algemeene reactie verwekt.

Wanneer toxine eenigen tijd op 75° C. verhit wordt, zooals noodig is om het toxine zijn giftigheid te doen verliezen, verliest het zijn uitvlokkend vermogen, terwijl ook de immuniseerende eigenschappen bijna geheel verloren zijn. Dit blijkt o.a. ook uit onderzoekingen in het R. S. I. Vijf caviae werden drie maal met $\frac{1}{2}$ cc. van gedurende tien minuten op 75° C. verhit toxine ingespoten. Na twee maanden vertoonden vier van de vijf caviae nog een positieve reactie van Schick en verdroegen een tienvoudige d.l.m. niet. Slechts het vijfde dier vertoonde een negatieve reactie van Schick en verdroeg een tienvoudige d.l.m. zonder bezwaren. Dit dier vertoonde vóór de enting een positieve ware en een positieve pseudoreactie van Schick en was dus waarschijnlijk al in aanraking geweest met diphtheriebacillen, zoodat het dier reeds gesensibiliseerd, allergisch was. De geringe antigeenprikkel van het verhitte toxine is hier misschien voldoende geweest om bij dit allergische dier de beginnende onvatbaarheid volledig te maken. Dat de immuniseerende werking van dit verhitte toxine zeer zwak was, is in overeenstemming met het verdwenen zijn van het uitvlokkend vermogen.

Wanneer toxine echter door langdurige verwarming en toevoeging van formaline geheel omgezet is in anatoxine, verandert door verwarming het uitvlokkend vermogen niet meer, zooals Ramon door verwarming van anatoxine op 72° aantoonde, terwijl ook de onvatbaarmakende werking blijft bestaan. Het onder invloed van formaline uit toxine ontstane anatoxine is dus blijkbaar geheel iets anders dan door warmte verzwakt toxine; het verschilt daarvan in wezen.

Zoeller (24) kon door een nauwkeurig onderzoek met in-

tracutane inspuiting met anatoxine nagaan, dat bij den mensch de onvatbaarheid sneller tot stand komt, naarmate de allergie sterker is ontwikkeld. Hij onderscheidt vier verschillende toestanden, waarin de mensch zich kan bevinden, n.l.:

- 1°. toestand: reactie van Schick is positief, de pseudo-reactie is negatief, d.w.z. de persoon is gevoelig voor diphtherietoxine en nog nooit met diphtheriebacillen in aanraking geweest, is „ongerept.”
- 2°. toestand: reactie van Schick is positief, de pseudo-reactie is positief, d.w.z. de persoon is gevoelig voor diphtherietoxine en is vroeger al in aanraking geweest met diphtheriebacillen, is dus gesensibiliseerd, „allergisch”.
- 3°. toestand: reactie van Schick is negatief, de pseudo-reactie is positief, d.w.z. de persoon is ongevoelig voor diphtherietoxine, maar wel gevoelig voor bacteriënproteïnen, hij is „allergisch onvatbaar”.
- 4°. toestand: reactie van Schick is negatief, de pseudo-reactie is negatief, d.w.z. de persoon is ongevoelig voor diphtherietoxine en ongevoelig voor bacteriënproteïnen, dus „anergisch onvatbaar”.

Zoeller vond nu dat menschen met positieve pseudoreactie van Schick in 50 % van de gevallen onvatbaar gemaakt konden worden door één inspuiting; in 100 % door twee inspuitingen. Menschen met een negatieve pseudoreactie van Schick konden met één inspuiting niet geïmmuniseerd worden, terwijl na twee inspuitingen 50 % onvatbaar werd.

Menschen, die in een allergischen toestand verkeeren, zijn dus makkelijker te immuniseeren dan menschen met een negatieve pseudoreactie van Schick, of wel: *De onvatbaarheid komt des te neller tot stand, naarmate de allergie sterker is ontwikkeld.*

Aldershoff kon deze ervaringen van Zoeller proefondervindelijk bevestigen. Hij nam daartoe twee groepen van caviae.

De eerste groep bestond uit dieren met positieve ware en negatieve pseudoreactie van Schick, d.w.z.: dieren die gevoelig waren voor diphtherietoxine en nooit met diphtheriebacillen in aanraking waren geweest, dus ongerepte dieren. De tweede groep bestond uit caviae met positieve ware en positieve pseudoreactie van Schick, d.w.z.: dieren die gevoelig waren niet alleen voor diphtherietoxine, maar ook voor bacteriënproteïnen, omdat ze reeds vroeger met diphtheriebacillen in aanraking waren geweest. Deze caviae waren namelijk gevoelig gemaakt voor de bacteriënproteïnen door ze van te voren in te spuiten met doode diphtheriebacillen.

Hij stelde zich nu de vraag: worden de dieren uit de tweede groep, die reeds voor bacteriënproteïnen zijn gesensibiliseerd, na behandeling met anatoxine eerder onvatbaar dan die dieren, die nooit met bacteriënproteïnen in aanraking waren geweest?

Na twee en drie inspuitingen met anatoxine, telkens $\frac{1}{2}$ cc. met één week tusschenruimte, waren de dieren onvatbaar voor een tienvoudige d.l.m. Bij ongerepte caviae werd de reactie van Schick na één maand negatief, terwijl de pseudoreactie, die ontstaan was onder invloed van het anatoxine in veel gevallen weer negatief werd, d.w.z.: dat een gedeelte der dieren ten opzichte van de bacteriënproteïnen weer is gesensibiliseerd.

Deze onderzoeken omtrent de onvatbaarmaking met anatoxine doen tevens zien, geheel in overeenstemming met de resultaten die Ramon verkreeg, dat anatoxine sneller onvatbaar maakt dan toxine-antitoxinemengsel, hetgeen trouwens niet kan verwonderen, daar het ongiftige anatoxine onverdund wordt ingespoten, terwijl in T.A. het antigeen in sterke verdunning aanwezig is. De reactie van Schick werd bij de gesensibiliseerde caviae reeds na 14 dagen zwak positief of negatief. Bij de ongerepte caviae duurde dit een maand. De gesensibiliseerde dieren werden dus sneller onvatbaar dan de ongerepte dieren. De onvatbaarheid komt ook hier des te sneller tot stand, naarmate de aller-

gie sterker is ontwikkeld, hetgeen, zooals wij boven zagen, Zoeller ook reeds bij den mensch aantoonde.

Ook bij paarden is met anatoxine onvatbaarheid te wekken. Sterke hyperimmunisatie, die zich uit door een hoog antitoxinegehalte van het bloedserum, is mogelijk, zooals uit onderzoeken van Ramon is gebleken. De tijd, waarin dit hoge antitoxinegehalte van het bloedserum ontstaat, is volgens Ramon bij behandeling met anatoxine $\pm$ 6 weken, terwijl bij behandeling met toxine-antitoxinemengsel het tweemaal zoo lang duurt, voordat hetzelfde antitoxinegehalte wordt verkregen. Verder wordt het paard bij behandeling met anatoxine niet telkens weer blootgesteld aan den toxineprikkel, zoodat de gezondheidstoestand van het dier veel beter is en het paard ook veel langer te gebruiken zou zijn.

De ervaringen in het R. S. I. met hyperimmunisatie van paarden door anatoxine opgedaan, zijn echter niet zoo gunstig als die van Ramon, vooral wat betreft den eindtiter van het verkregen serum. Toch is het gelukt op deze wijze sera te verkrijgen van 700 A.E. per cc.

De vraag is: moet bij het onvatbaar maken tegen diphtherie het T.A.U. vervangen worden door anatoxine? Aangezien de onvatbaarmakende werking van het anatoxine wel vaststaat, is men geneigd deze vraag bevestigend te beantwoorden en het door Loiseau, Park en Zingher, e.a. gegeven voorbeeld te volgen. Maar onverdund anatoxine geeft vooral bij kinderen boven 6 jaar en bij oudere menschen een sterke plaatselijke proteïne-reactie, doordat deze personen meestal allergisch zijn voor bacteriënproteïnen. Deze plaatselijke reactie is onschuldig, maar vormt toch voor de algemeene toepassing van anatoxine een groote belemmering.

Men zou anatoxine kunnen verdunnen en wel in die mate, dat ook bij volwassenen de plaatselijke proteïne-reactie niet sterker is dan bij gebruik van T.A.U. Maar dan is de vraag: werkt in die mate verdund anatoxine zeker en betrouwbaar immuniseerend? Is dit niet het geval, dan moet getracht wor-

den een anatoxine te krijgen, dat zooveel mogelijk is bevrijd van proteïnen, zoodat, ook onverdund, een niet te sterke plaatselijke reactie optreedt, zoodat de toepassing hierdoor niet belemmerd wordt.

Een voordeel van anatoxine is, dat het geen soortvreemd serum bevat, zoodat geen overgevoeligheid hiervoor kan ontstaan. (Hooker).

Ter beantwoording der in deze inleiding gestelde vragen werden de in de volgende hoofdstukken beschreven onderzoeken ingesteld.

HOOFDSTUK II.

Wordt bij de bereiding van anatoxine de toxische werking weggenomen door formaline of door verwarmen?

Om deze vraag te beantwoorden werd aan vier fleschjes toxine No. 48 respectievelijk toegevoegd 3, 4, 5 en 6 per duizend formaline en werden deze fleschjes geplaatst in de broedstoof bij een temperatuur van 37° C. (Tabel I).

Het toxine in het eerste fleschje, dat 3 per duizend formaline bevatte, bleek zijn toxische werking verloren te hebben na 36 dagen; 6 cc. van het zoo verkregen *anatoxine 48 I* bleek, ingespoten bij een cavia, noch plaatselijke noch algemeene reactie meer te geven.

Het toxine, waaraan 4 per duizend formaline was toegevoegd, bleek volgens de dierproef na 29 dagen ongiftig te zijn geworden. Het zoo verkregen anatoxine werd genoemd *anatoxine 48 II*.

Het toxine, waaraan 5 per duizend formaline was toegevoegd had zijn toxische werking verloren na 11 dagen en werd genoemd *anatoxine 48 III*, terwijl het toxine, waaraan 6 per duizend formaline was toegevoegd, na 9 dagen ongiftig was geworden. Dit is het *anatoxine 48 IV*.

Verder werd aan vier fleschjes toxine No. 48 respectievelijk toegevoegd 0, 3, 5 en 6 per duizend formaline en werden deze fleschjes geplaatst in een waterbad van 58° C. (Tabel II). Het toxine, waaraan geen formaline was toegevoegd, bleek atoxisch te zijn na een verwarming van 56 uur (*anatoxine 48 Oa*). Het toxine, waaraan 3 per duizend formaline was toegevoegd, was atoxisch na drie dagen (*anatoxine 48 Ia*), evenals het toxine met 5 per duizend formaline (*anatoxine 48 IIIa*). (Deze beide laatste anatoxinen werden niet eerder op ongiftigheid beproefd, zoodat het mogelijk is, dat zij ook

reeds, evenals de anatoxinen 48 Oa en 48 IVa na 56 uur hun giftigheid hadden verloren). Het toxine met 6 per duizend formaline had zijn giftige werking verloren na een verwarming van 56 uur (*anatoxine 48 IVa*).

Met de zoo verkregen anatoxinen werden caviae behandeld, telkens in groepen van vier. Twee dieren van elke groep kregen twee inspuitingen subcutaan van $\frac{1}{2}$ cc. met een week tusschenruimte, terwijl de twee overige dieren van elke groep drie onderhuidsche inspuitingen kregen van $\frac{1}{2}$ cc. telkens met een week tusschenruimte. 27 dagen na het begin van de behandeling werd de reactie van Schick toegepast, terwijl de dieren drie dagen later ingespoten werden met 20 of 40 d.l.m. ter bepaling van den graad van hun onvatbaarehid. Uit tabel I blijkt:

1°. *Anatoxine 48 I* heeft een goede immuniseerende werking. Op de eerste injectie van $\frac{1}{2}$ cc. reageerden de dieren niet. Na de tweede en derde injectie trad een kleine plaatselijke reactie op, zich uitende in een lichte roodheid en schilfering der huid. Dit is een aanduiding, dat de dieren door de eerste inspuiting van $\frac{1}{2}$ cc. anatoxine reeds gesensibiliseerd, „allergisch”, zijn. De dieren zijn al op weg naar de onvatbaarwording. Veertien dagen na de laatste injectie bleken alle dieren een negatieve reactie van Schick te vertoonen (uitgezonderd cavia No. 3, die zeer licht reageerde), terwijl ook de pseudoreactie van Schick bij alle dieren negatief was; dus ook bij die dieren, die op de tweede en derde inspuiting van $\frac{1}{2}$ cc. anatoxine wél plaatselijk reageerden. Dit is een teeken, dat die dieren ten opzichte van de bacterieproteïnen en eiwitten uit den voedingsbodem weer zijn gedesensibiliseerd, anergisch immuun zijn geworden (Zoeller). Bij alle dieren was de reactie op een inspuiting van 40 d.l.m. slechts plaatselijk. Er vormde zich om de plaats van inspuiting een licht infiltraat, terwijl er geen algemeene ziekteverschijnselen optraden. Deze lokale reactie treedt dus ook op bij dieren, die een negatieve reactie van Schick vertoonen. Men moet echter

in het oog houden, dat de reactie van Schick negatief uitvalt, wanneer het antitoxinegehalte van het bloed gelijk is aan of grooter is dan $1/30$ A.E. per cc. Dit antitoxinegehalte behoeft dan niet voldoende te zijn om de, in de weerstandspreef, ingespoten hoeveelheid toxine geheel te neutraliseeren, zoodat nog een plaatselijke toxinewerking optreedt. Dieren, die na een gift van 20 of 40 d.l.m. alleen reageeren door het vormen van een plaatselijk infiltraat, kunnen als voldoende immuun worden beschouwd. Ontstaat later een plaatselijke huidnecrose, dan is dit een bewijs, dat de specifieke toxinewerking nog zeer sterk is. Dieren waarbij een necrose optreedt kunnen dus niet als voldoende immuun worden beschouwd.

2°. *Anatoxine 48 II* blijkt eveneens een goede immuniserende werking te bezitten. Geen enkele van de behandelde dieren vertoonde een plaatselijke reactie na de verschillende injecties van $1/2$ cc. anatoxine. Caviae No. 3 en 4 hadden een negatieve ware en een negatieve pseudoreactie van Schick. Cavia No. 1 vertoonde een licht positieve ware en een negatieve pseudoreactie, terwijl cavia No. 2 op beide intracutane injecties licht positief reageerde. Een maand na de eerste injectie verdroegen caviae No. 1 en 4 een gift van 40 d.l.m. zonder eenige reactie, terwijl daarop cavia No. 3 licht en cavia No. 2 iets sterker plaatselijk reageerden.

3°. *Anatoxine 48 III* blijkt ongeschikt te zijn voor het onvatbaarmaken van de dieren. Cavia No. 1 werd negen dagen na de eerste injectie paralytisch en stierf vier dagen later. De overige dieren reageerden niet op de inspuitingen van $1/2$ cc. Cavia No. 2 vertoonde een negatieve ware en een negatieve pseudoreactie van Schick. Caviae No. 3 en 4 vertoonden een positieve ware en een positieve pseudoreactie (gecombineerde reactie), terwijl de ware reactie veel sterker was dan de pseudoreactie. Op inspuiting van 40 d.l.m. reageerde cavia No. 2 alleen plaatselijk; caviae No. 3 en 4 reageerden sterk plaatselijk maar ook algemeen. Cavia No. 4 stierf zelfs al twee dagen na het toedienen van 40 d.l.m.

Eigenaardig is dat Cavia No. 2 met twee injecties onvat-

baar werd, terwijl caviae No. 3 en 4 met drie injecties nog vatbaar bleven. Individuele verschillen spelen, zooals ook blijkt uit het optreden van paralyse, bij caviae dus blijkbaar een groote rol.

4°. *Anatoxine 48 IV* blijkt evenmin goede onvatbaar makende eigenschappen te bezitten. De dieren reageerden niet op de eerste twee inspuitingen van het anatoxine. Op de derde inspuiting was de reactie zwak. Alle vier de dieren vertoonden een negatieve ware en een negatieve pseudoreactie van Schick. Toch was de graad van onvatbaarheid niet hoog, zooals bleek uit de reactie op een gift van 20 of 40 d.l.m. Cavia No. 2 stierf vier dagen na een gift van 40 d.l.m. Cavia No. 3 reageerde op 20 d.l.m. lokaal, later met necrose. Alleen cavia No. 4 vertoonde na een gift van 40 d.l.m. geen enkele reactie; alleen dit laatste dier was voldoende immuun.

Uit Tabel II blijkt:

1°. *Anatoxine 48 Oa* bezit in het geheel geen immuniseerende werking. Drie dieren vertoonden een positieve ware en een negatieve pseudoreactie van Schick, terwijl deze dieren na een gift van 20 of 40 d.l.m. na één dag stierven. Alleen cavia No. 1 vertoonde een negatieve ware en een negatieve pseudoreactie van Schick, terwijl het dier ook op een gift van 20 d.l.m. niet reageerde; dit dier was dus blijkbaar onvatbaar, hoewel een verklaring hiervoor niet is te geven.

2°. *Anatoxine 48 Ia* blijkt eveneens een onvoldoende immuniseerende werking te hebben. De reacties op de verschillende inspuitingen van $\frac{1}{2}$ cc. anatoxine waren allen negatief. Cavia No. 1 vertoonde een negatieve ware en een negatieve pseudoreactie van Schick. Dit dier reageerde op een injectie van 20 d.l.m. sterk plaatselijk, terwijl na twee dagen lichte necrose optrad. Cavia No. 2 vertoonde een positieve ware en een negatieve pseudoreactie van Schick. Het dier was dus nog vatbaar, wat ook bleek na toediening van 40 d.l.m. Het dier stierf na één dag. Cavia No. 3 vertoonde een positieve ware en een positieve pseudoreactie van Schick. Op 20 d.l.m. reageerde het dier plaatselijk met lichte necrose. Cavia No. 4

vertoonde een negatieve ware en een negatieve pseudoreactie van Schick. Het dier was echter al eenigen tijd ziek, zoodat de reactie op een gift van 40 d.l.m. niet was na te gaan. Bij de sectie bleek het dier niet aan diphtherie gestorven te zijn.

3°. *Anatoxine 48 IIIa* bezat een zeer goede onvatbaarmakende werking, terwijl de dieren niet reageerden op de verschillende injecties van $\frac{1}{2}$ cc. van het anatoxine. De ware zoowel als de pseudoreactie van Schick was bij drie dieren negatief. Cavia No. 2 vertoonde een positieve ware en een positieve pseudoreactie. Op een gift van 20 en 40 d.l.m. reageerden de dieren in het geheel niet. Ook slechts twee injecties van $\frac{1}{2}$ cc. anatoxine bleken een zeer voldoende onvatbaarheid te veroorzaken. Met het oog op de sterke tegenstelling tusschen de werking van anatoxine 48 IIIa met die van de anatoxinen 48 Oa en 48 Ia zijn later de proeven met anatoxine 48 IIIa herhaald (zie blz. 30).

4°. *Anatoxine 48 IVa* had geen onvatbaarmakende werking. De dieren vertoonden na de injecties van $\frac{1}{2}$ cc. geen reactie. Alle dieren hadden een positieve ware en een negatieve pseudoreactie van Schick. De caviae No. 1 en 4 stierven na een gift van respectievelijk 20 en 40 d.l.m., terwijl de dieren No. 2 en 3 een sterke necrose vertoonden na injectie van 40 en 20 d.l.m.

5°. Verder werd een fleschje toxine No. 48 verwarmd op 50° zonder dat formaline was toegevoegd. De giftige werking bleek verdwenen te zijn na verwarming gedurende 56 uur. Met dit zoo verkregen *anatoxine 48b* werden weer vier caviae behandeld. De dieren vertoonden na inspuiting van $\frac{1}{2}$ cc. geen reactie. De ware reactie van Schick was bij alle dieren positief en de pseudoreactie negatief. Ter besparing van dieren werd alleen cavia No. 4 ingespoten met 40 d.l.m. Het dier stierf na één dag.

Uit deze proeven valt af te leiden, dat anatoxine 48 I goede onvatbaarmakende eigenschappen bezit. *Alleen de plaatselijke aspecifieke reacties, volgende op de tweede en derde*

injectie, vormen een bezwaar voor de toepassing bij den mensch, zooals enkele op den mensch toegepaste entingen met anatoxine reeds hebben geleerd. Vandaar dat werd getracht een anatoxine te bereiden, dat deze aspecifieke werking niet bezat (zie hoofdstuk IV en IX).

Anatoxine 48 II heeft eveneens een goede immuniseerende werking, terwijl na de verschillende injecties geen plaatselijke reacties optraden. Hoe moet dit laatste verschijnsel worden verklaard? De toegevoegde formaline schijnt op de eiwitten, afkomstig van de bacteriën en van den voedingsbodem, een destrueerende werking uit te oefenen, des te sterker naarmate meer formaline wordt toegevoegd. Een formalinegehalte van 4 per duizend geeft in dit opzicht de meest juiste uitkomsten, daar hierbij de eiwitten zoover worden afgebroken, dat zij geen plaatselijke reactie meer veroorzaken, terwijl toch, zooals blijkt uit het behoud der onvatbaarmakende werking, het toxine niet te ver wordt vernietigd, maar in anatoxine wordt omgezet. Bij een formalinegehalte, hooger dan 4 per duizend, wordt echter blijkbaar ook het toxine te ver gedestruëerd, zoodat ook de antigeeneigenschappen verdwijnen.

Dit wordt bevestigd door het feit, dat anatoxine 48 III en anatoxine 48 IV een onvoldoende onvatbaarmakende werking bezitten.

Uit de werking van de anatoxinen 48 Oa en 48b blijkt, dat een verhoogde temperatuur alléén geen aanleiding geeft tot het vormen van anatoxine. De toxische werking wordt wel weggenomen, maar ook de onvatbaarmakende antigeenwerking is verdwenen. Voor de omzetting van toxine in anatoxine is dus een bepaald formalinegehalte noodig.

Merkwaardig is het verschil in werking tusschen anatoxine 48 III en anatoxine 48 IIIa. De vraag doet zich voor:

Heeft bij anatoxine 48 IIIa de formaline gelegenheid gehad eenigen tijd in te werken vóórdat de verwarming tot 58° plaats vond? Is misschien een zekere fixatie van het antigeenlichaam van het toxine mogelijk geweest vóór de inwer-

king der hooge temperatuur, die, zooals bekend is, door eenmaal gevormd anatoxine wordt verdragen?

Om deze vraag te beantwoorden werd een nieuwe proefreeks opgesteld. (Tabel III). Aan toxine No. 50 werd achtereenvolgens toegevoegd 3, 4, 5 en 6 per duizend formaline. Deze monsters werden drie dagen verwarmd op 37° en daarna 56 uur op 58° . De giftigheid bleek daarna volgens de dierproef verdwenen te zijn; 6 cc. ingespoten bij een cavia, gaf geen verschijnselen. Tevens werd een tweede proefreeks opgesteld. Aan toxine No. 50 werd weer achtereenvolgens toegevoegd 3, 4, 5 en 6 per duizend formaline. Deze monsters werden nu zeven dagen in de ijskast geplaatst en daarna verwarmd op 58° , weer gedurende 56 uur. Ook hier was na deze behandeling de toxiciteit blijkens de dierproef verdwenen. De zoo verkregen producten werden genoemd *anatoxine 50 I—IV* en *anatoxine 50a I—IV*.

Uit tabel III volgt, dat de onvatbaarmakende werking van deze anatoxinen 50 en 50a onvoldoende is. Wel bezaten eenige dieren na de behandeling een zekere mate van onvatbaarheid, hetgeen blijkt uit het resultaat van de reactie van Schick, maar toch was in de meeste gevallen de immuniteit niet voldoende om een gift van 20 tot 40 d.l.m. te overwinnen. De meeste dieren stierven na het toedienen van deze gift. Slechts twee dieren bezaten een voldoende immuniteit, namelijk caviae No. 8 en No. 12.

Hieruit blijkt dat, wanneer de formaline gelegenheid heeft eenigen tijd op het toxine in te werken bij een temperatuur van $\pm 4^{\circ}$ of bij een temperatuur van 37° vóórdat de verwarming tot 58° plaats heeft, het antigeenlichaam niet gefixeerd wordt.

Voor het vormen van anatoxine is het dus noodig, dat de formaline langen tijd op het toxine kan inwerken bij een temperatuur van 37° .

De bevreedende immuniseerende werking van het *anatoxine 48 IIIa* (tabel IV) werd nu opnieuw beproefd, terwijl een tweede hoeveelheid toxine No. 48 op dezelfde manier werd

behandeld als waarop het anatoxine 48 IIIa was verkregen. Dit werd genoemd *anatoxine 48 IIIa II*.

Uit tabel IV blijkt, dat zoowel anatoxine 48 IIIa als anatoxine 48 IIIa II onvoldoende onvatbaarmakende eigenschappen bezitten. Alle dieren vertoonen een sterk positieve ware reactie van Schick. Geen enkel dier was dus door de behandeling met deze beide anatoxinen voldoende onvatbaar geworden. Dit bleek ook uit de reactie volgende op een gift van 20 of 40 d.l.m. Slechts twee caviae overleefden deze dosis, terwijl de zes overige dieren binnen drie dagen stierven.

Merkwaardig is de verschillende werking van anatoxine 48 IIIa in de eerste en tweede proef. De in tabel II hiermee behandelde dieren bezitten een sterke immuniteit, terwijl de dieren van tabel IV in het geheel geen onvatbaarheid vertoonen. Een verklaring hiervoor te vinden is mij niet gelukt. Waarom het anatoxine 48 IIIa in het eerste geval een zeer goede, en in het tweede geval géén onvatbaarmakende werking bezat, blijft een open vraag.

Verder volgt uit deze proeven, dat een negatieve reactie van Schick nog niet een voldoende onvatbaarheid waarborgt, althans niet tegen de in de proeven gebruikte hoeveelheid toxine. Daarentegen blijkt een positieve reactie van Schick een zekere uiting te zijn van vatbaarheid, althans bij dieren op deze wijze onvatbaar gemaakt. Alle dieren, die na de entingen een positieve reactie van Schick vertoonden, werden na een gift van 20 of 40 d.l.m. ziek en meestal stierven zij in korten tijd.

HOOFDSTUK III.

Werken verdunningen van anatoxine voldoende immuniseerend?

Daar bij het gebruik van onverdund anatoxine dikwijls na de onvatbaarmakende inspuitingen plaatselijke reacties, afhankelijk van het hooge gehalte aan aspecifieke eiwitten, optreden, werd onderzocht in welke verdunningen anatoxine nog voldoende onvatbaarmakend werkt.

Van vijf verschillende anatoxinen, in tien- tot dertigvoudige verdunning, werd de onvatbaarmakende werking onderzocht. De uitkomsten van deze proefneming worden weergegeven in tabel V. De dieren kregen weer twee of drie onvatbaarmakende inspuitingen van $\frac{1}{2}$ cc. Een maand later werden zij ingespoten met 20 of 40 d.l.m., nadat drie dagen te voren, althans in een gedeelte der proeven, de reactie van Schick was uitgevoerd.

Vier caviae werden behandeld met anatoxine No. 47, bereid van toxine No. 47 waarvan de d.l.m. groter dan 10 mgr. was, in een tienvoudige verdunning. Reacties na de immuniseerende injecties traden niet op. Alle dieren vertoonden een negatieve pseudoreactie van Schick en een sterk positieve ware reactie. Alleen caviae No. 1 en 3 werden ingespoten met 20 d.l.m. Beide dieren stierven na deze injectie, geheel in overeenstemming met het resultaat van de reactie van Schick.

Zeven caviae werden behandeld met anatoxine No. 43 I, bereid van toxine No. 43, waarvan de d.l.m. kleiner dan 4 mgr. was, in een tienvoudige verdunning. Na de eerste immuniseerende inspuiting volgde bij geen enkel dier een reactie. Na de tweede injectie trad bij vijf caviae een lichte plaatselijke reactie op, terwijl op de derde injectie drie die-

ren reageerden. De reactie van Schick werd niet uitgevoerd. Alle dieren bleken immuun voor een gift van 20 d.l.m.; ook die dieren, die reeds drie weken na de eerste injectie ingespoten werden.

Vervolgens werd de onvatbaarmakende werking getoetst van een *anatoxine*, afkomstig uit het instituut Pasteur te *Parijs*, in een *tienvoudige verdunning*. Elf dieren werden met dit anatoxine behandeld. Plaatselijke reacties traden na de immuniseerende injecties niet op. Reeds ongeveer drie tot vier weken na het begin der behandeling bleken de dieren voor een gift van 20 of 40 d.l.m. een zekere, maar niet voldoende mate van onvatbaarheid te bezitten. Twee dieren overleefden deze dosis niet. Drie caviae, n.l. de Nos. 1, 3 en 11 vertoonden een negatieve reactie, terwijl de overige dieren alleen plaatselijk reageerden. Cavia No. 11 werd later paralytisch.

Vervolgens werd de immuniseerende werking nagegaan van anatoxine No. 43 II in een *tienvoudige verdunning*. Vier dieren werden hiermee behandeld. Bij geen enkel dier trad na de onvatbaarmakende inspuitingen een plaatselijke reactie op. Ongeveer drie en vier weken na de eerste injectie werden de dieren ingespoten met 40 d.l.m. Drie dieren vertoonden hierop geen verschijnselen. Alleen cavia No. 1 verdroeg deze dosis niet, het dier stierf in korten tijd.

Vier dieren werden geïmmuniseerd met anatoxine No. 43 II in een *twintigvoudige verdunning*. Na de verschillende inspuitingen van $\frac{1}{2}$ cc. volgden geen verschijnselen. De reactie van Schick werd uitgevoerd. Drie dieren vertoonden een negatieve pseudo- en een positieve ware reactie van Schick. Cavia No. 4 vertoonde een gecombineerde reactie. Na een gift van 20 d.l.m. stierf cavia No. 1. De drie overige dieren reageerden alleen plaatselijk, terwijl bij caviae No. 2 en 3 later een lichte necrose optrad. De verkregen immuniteit was dus wel zeer onvolkomen.

Daarna werd de onvatbaarmakende werking van anatoxine No. 43 II in een *dertigvoudige verdunning* onderzocht, eveneens op vier caviae. Plaatselijke reacties traden na de im-

muniseerende inspuitingen niet op. Alle dieren vertoonden een negatieve pseudoreactie en een positieve ware reactie van Schick. Alleen caviae Nos. 1 en 3 kregen een gift van 20 d.l.m. Cavia No. 1 stierf, cavia No. 3 reageerde sterk plaatselijk, later gevolgd door het optreden van necrose. Ook deze verdunning gaf dus slechte resultaten.

Ten slotte werden vier caviae behandeld met anatoxine No. 48, bereid van toxine No. 48, waarvan de d.l.m. 6 mgr. was, in een vijftienvoudige verdunning. Na de verschillende injecties van $\frac{1}{2}$ cc. volgden geen verschijnselen. Drie dieren vertoonden een negatieve pseudo- en een zwak positieve ware reactie van Schick. Bij cavia No. 4 waren beide reacties negatief. Alleen caviae Nos. 1 en 3 werden ingespoten met 20 d.l.m. Cavia No. 1 stierf, cavia No. 2 reageerde plaatselijk.

Samenvatting.

Anatoxine No. 47 in een tienvoudige verdunning is ongeschikt voor het immuniseeren van caviae.

Anatoxine No. 43 I in een tienvoudige verdunning heeft zeer goede onvatbaarmakende eigenschappen. De plaatselijke reacties na de immuniseerende injecties, hoewel aanmerkelijk minder sterk dan na gebruik van onverdund anatoxine, blijven echter een bezwaar vormen voor de toepassing bij den mensch.

Ook *anatoxine Parijs in een tienvoudige verdunning* heeft een vrij goede immuniseerende werking. Van elf dieren bleken slechts twee dieren nog vatbaar voor een dosis van 40 d.l.m. De overige dieren verdroegen een dosis van 20 of 40 d.l.m., zij het dan ook door het vormen van een plaatselijk infiltraat.

Anatoxine No. 43 II in een tienvoudige verdunning heeft goede onvatbaarmakende eigenschappen. Plaatselijke reacties na de verschillende injecties traden niet op. Drie dieren reageerden niet op een gift van 40 d.l.m., slechts één dier met twee inspuitingen stierf.

Vergelijkt men de werking van anatoxine Parijs en anatoxine No. 43 II, beide in tienvoudige verdunning, dan blijkt

dat de beide anatoxinen, wat betreft het geven van plaatselijke reacties na de onvatbaarmakende inspuitingen, gelijk staan, maar dat de immuniseerende werking van het anatoxine Parijs iets minder goed is dan van anatoxine No. 43 II.

Anatoxine No. 43 II in een twintigvoudige en in een dertigvoudige verdunning geeft een minder betrouwbare onvatbaarheid. Na de behandeling verdroegen de meeste dieren wel een gift van 20 d.l.m., maar de na die gift optredende plaatselijke reactie was zeer sterk. Ook de reactie van Schick was bij alle dieren positief, uitgezonderd bij één cavia, die een gecombineerde reactie vertoonde.

Anatoxine No. 48 in een vijftienvoudige verdunning bezit eveneens minder goede onvatbaarmakende eigenschappen. De reactie van Schick was bij drie dieren zwak positief, bij één dier negatief. Het eerste dier verdroeg een gift van 20 d.l.m. niet, terwijl cavia No. 3 daarop sterk plaatselijk reageerde.

Conclusie: anatoxine in een tienvoudige verdunning, mits onverdund goed immuniseerend en stammend van een sterk toxine, bezit een goede immuniseerende werking. Grootere verdunningen hebben onvoldoende onvatbaarmakende eigenschappen.

HOOFDSTUK IV.

Is het mogelijk, anatoxine te bereiden, arm aan eiwitten, waardoor de aspecifieke reactie wordt verminderd, maar de antigeenwerking behouden blijft? of wel:

Welke eiwitten kunnen uit anatoxine worden verwijderd zonder dat de immuniseerende werking verloren gaat?

De aanwezigheid van een werkzaam antigeen is alleen vast te stellen door de immuniseerende werking te beproeven op dieren, of door middel van de uitvlokingsreactie van Ramon, zooals later zal blijken (zie hoofdstuk I en VIII).

Toxine bezit naast de antigeenwerking ook de giftige werking, zoodat bij toxine gemakkelijk te controleeren is aan welk eiwit deze giftigheid en tevens het antigeen gebonden is. Daarom werd eerst nagegaan welke eiwitten uit toxine konden worden verwijderd, zóó, dat de toxiciteit bleef bestaan. Uitgegaan werd van toxine No. 26 met een d.l.m. van 3 mgr. Aan 30 cc. toxine werd toegevoegd 15 cc. verzadigd ammoniumsulfaat. Hierdoor ontstond een neerslag, hoofdzakelijk bestaande uit euglobulinen. Het filtraat werd behandeld met een gelijk volume verzadigd ammoniumsulfaat, waardoor hoofdzakelijk de pseudoglobulinen neerslaan. Het laatste filtraat bevat dan albuminen. Dit filtraat werd nu geheel verzadigd met ammoniumsulfaat, waardoor deze albuminen neergeslagen worden.

Het neerslag van euglobulinen werd opgelost in 10 cc. water. Hiervan werd 10 mgr. subcutaan ingespoten bij een cavia. Het dier reageerde op deze injectie alleen plaatselijk met een licht infiltraat. Het toxinegehalte van deze euglobuline-oplossing is dus gering.

Het neerslag van pseudoglobulinen werd eveneens opgelost in 10 cc. water. Hiervan werd bij een cavia 10 mgr. onderhuids ingespoten. Deze injectie veroorzaakte een sterke

plaatselijke reactie, terwijl het dier na twee dagen stierf. Een tweede marmot werd ingespoten met 5 mgr. Ook dit dier ging na twee dagen dood. Daarna werd $2\frac{1}{2}$ mgr. bij een derde dier ingespoten. Dit dier stierf na vier dagen. Deze $2\frac{1}{2}$ mgr. van de pseudoglobuline-oplossing bleek dus juist één d.l.m. te bevatten. In deze oplossing is dus een groot gedeelte van het toxine aanwezig.

Van de albuminen, opgelost in 10 cc. water, gaf 10 mgr., bij een cavia ingespoten, geen enkele plaatselijke of algemeene reactie. Een injectie van 6 cc. veroorzaakte in 30 minuten den dood van een dier. Deze dood was echter niet het gevolg van de giftigheid van de albuminen, maar van de giftige werking van het ammoniumsulfaat, dat bij de bereiding van de albuminen in het neerslag was achtergebleven. Dit bleek uit een controleproef, waarbij een cavia werd ingespoten met een oplossing van ammoniumsulfaat. Ook hier trad de dood op in zeer korten tijd en met dezelfde verschijnselen als bij de injectie met 6 cc. van de albumine-oplossing.

Uit deze proeven valt af te leiden, dat de toxische werking van toxine voor een groot deel is gebonden aan de pseudoglobulinen.

Verondersteld werd nu, dat de antigeenwerking van anatoxine eveneens gebonden zou zijn aan de in het anatoxine aanwezige pseudoglobuline.

Nu werden 90 cc. anatoxine No. 45 II behandeld met 45 cc. verzadigd ammoniumsulfaat. Aan het filtraat werd toegevoegd een gelijk volume verzadigd ammoniumsulfaat. Het zoo verkregen neerslag werd verzameld en opgelost in 30 cc. water. Zoo werd dus:

- 1°. een oplossing verkregen, waarin de concentratie van de pseudoglobulinen drie maal sterker was dan in het oorspronkelijke anatoxine.
- 2°. Door 10 cc. van deze oplossing weer te verdunnen met 20 cc. water, werd dezelfde pseudoglobulineconcentratie verkregen als die van het oorspronkelijke anatoxine.

Met deze pseudoglobuline-oplossingen werden nu immuniseeringsproeven op caviae genomen.

Zooals uit tabel VI blijkt, heeft de driemaal geconcentreerde pseudoglobuline-oplossing een vrij goede onvatbaarmakende werking. De dieren vertoonden na de eerste twee injecties geen plaatselijke reactie, terwijl na de derde injectie de reactie bij twee dieren negatief was en bij drie dieren slechts een zeer licht plaatselijk infiltraat gevormd werd. Bijna alle dieren vertoonden na twee of drie injecties van $\frac{1}{2}$ cc. van de pseudoglobuline-oplossing een zwakke gecombineerde reactie van Schick. Cavia No. 7 vertoonde een negatieve pseudo-reactie en een positieve ware reactie, terwijl bij caviae Nos. 8 en 9 beide reacties negatief uitvielen. Alle dieren verdroegen een gift van 20 of 40 d.l.m., uitgezonderd cavia No. 7, welk dier in overeenstemming met het resultaat van de reactie van Schick, twee dagen na de onderhuidsche injectie van 40 d.l.m. stierf. Bij de overige dieren trad alleen een plaatselijke reactie op, behalve bij caviae Nos. 8 en 9, die in het geheel geen verschijnselen vertoonden, eveneens in overeenstemming met de reactie van Schick.

De pseudoglobuline-oplossing in dezelfde concentratie bezit een zwakke immuniserende werking. De reactie na de verschillende injecties van $\frac{1}{2}$ cc. was in alle gevallen negatief. Caviae Nos. 1 en 2 vertoonden een gecombineerde reactie van Schick. Toch stierf cavia No. 2 twee dagen na een gift van 40 d.l.m., terwijl cavia No. 1 daarop alleen plaatselijk reageerde. Cavia No. 3 vertoonde een negatieve ware en een negatieve pseudoreactie van Schick, terwijl het dier 40 d.l.m. verdroeg zonder verschijnselen te geven. Cavia No. 4 was volgens de reactie van Schick vatbaar, wat ook bleek na de injectie van 40 d.l.m. Het dier stierf in twee dagen.

Conclusie: De driemaal geconcentreerde pseudoglobuline-oplossing, verkregen uit anatoxine, heeft bevredigende immuniseerende eigenschappen, terwijl de oplossing van dezelfde concentratie als in het oorspronkelijke anatoxine, slechts zwakke onvatbaarmakende werking heeft.

HOOFDSTUK V.

Heeft zwak toxisch anatoxine een betere immuniseerende werking dan geheel atoxisch anatoxine?

Ter beantwoording van deze vraag werd de onvatbaar-makende werking van anatoxine No. 43 I onderzocht. Dit anatoxine bezat nog een geringe giftigheid; 6 cc. ingespoten bij een cavia veroorzaakte de dood van het dier in drie dagen. Met dit onverdunde anatoxine werden zeven caviae behandeld. Zooals tabel VII aangeeft was de plaatselijke reactie na de verschillende injecties van $\frac{1}{2}$ cc. bijna altijd positief. Daar dit een groot bezwaar vormt voor de practische toepassing bij den mensch, werd een tweede proefreeks opgesteld met anatoxine No. 43 I in een tienvoudige verdunning. De reacties, die hierbij na de eerste injecties van $\frac{1}{2}$ cc. optraden, waren negatief. Na de tweede en derde injectie vertoonden de meeste dieren een zwakke reactie. De immuniseerende werking van het tienvoudig verdunde anatoxine bleek goed te zijn. Alleen cavia No. 1 reageerde plaatselijk op een gift van 20 d.l.m., terwijl de overige dieren geen verschijnselen vertoonden.

Verder werd het anatoxine No. 43 nog eenige dagen op een temperatuur van 37° gebracht, waardoor de giftigheid verdween zooals uit een dierproef bleek; 6 cc. was voor een cavia niet toxisch.

Met dit ongiftige anatoxine No. 43 II werden opnieuw zes caviae behandeld. Vier dieren kregen twee injecties van $\frac{1}{2}$ cc., twee dieren kregen één injectie. Plaatselijke reacties traden na deze inspuitingen niet op, terwijl de na de behandeling verkregen onvatbaarheid wel niet zeer sterk, maar toch voldoende was, zooals blijkt uit de uitkomst na de giften van 40 d.l.m.

Wanneer men nu de immuniseerende werking van de ana-

toxinen Nos. 43 I 1/10, 43 II, 48 I en 48 II vergelijkt, ziet men, dat anatoxine No. 43 I 1/10 de beste onvatbaarmakende eigenschappen bezit, tenminste te oordeelen naar de plaatselijke reactie, optredende na een gift van 20 d.l.m. Bij de anatoxinen No. 48 I en 48 II vormen zich na een gift van 40 d.l.m. vrij sterke plaatselijke reacties. Anatoxine No. 43 I werd, wegens te sterke reactie na de inspuitingen, uitgeschakeld.

Uit deze proeven blijkt, dat zwak toxisch anatoxine zeer goed immuniseert, misschien zelfs beter dan geheel atoxisch anatoxine. Toch moet voor het gebruik bij den mensch aan het ongiftige anatoxine de voorkeur worden gegeven, daar bij het gebruik van het zwak toxisch anatoxine de plaatselijke reacties, optredende na de immuniseerende injecties, een bezwaar vormen, evenals de giftigheid, al is die dan ook geringer dan die van T.A.

Het is de vraag of de lokale reactie, optredende na een gift van 40 d.l.m., veroorzaakt wordt door het toxine, dat zich in de dosis van 40 d.l.m. bevindt, of dat de reactie niets anders is dan een anaphylactisch verschijnsel, veroorzaakt door de aspecifieke eiwitten, die zich zoowel in het anatoxine als in het toxine bevinden. De dieren zijn door de verschillende inspuitingen voor deze eiwitten gesensibiliseerd. Het plaatselijk gevormde infiltraat zou dan eigenlijk overeenkomen met een positieve pseudoreactie van Schick, in een meer uitgebreide vorm.

Indien dit juist is, heeft het ontstaan van een plaatselijk infiltraat na het toedienen van een aantal d.l.m. geen betekenis en zou de uitwerking van een dergelijke gift alleen moeten worden beoordeeld naar het ziek worden of sterven van het dier.

De volgende proef leert echter, dat de lokale reactie, optredend na een gift van 40 d.l.m., wel degelijk op een specifieke toxinewerking berust.

Acht caviae werden drie maal ingespoten met $\frac{1}{2}$ cc. anatoxine, telkens met twee dagen tusschenruimte. De dieren

werden zoo dus voor de eiwitten uit het anatoxine gesensibiliseerd. Twee weken na de laatste injectie werden de dieren behandeld met een dosis verwarmd toxine, waarin dezelfde hoeveelheid eiwit aanwezig was als in 40 d.l.m. Geen enkele van de dieren reageerde op deze injectie. Hieruit volgt, dat het plaatselijke infiltraat, dat dikwijls ontstaat na inspuiten van 40 d.l.m. op specifieke toxinerwerking berust.

Voor het beoordeelen van de mate van immuniteit moet dus met het al of niet ontstaan van een plaatselijk infiltraat na een injectie van 40 d.l.m., rekening worden gehouden.

HOOFDSTUK VI.

Wordt de onvatbaarmakende werking van een anatoxine bepaald door de oorspronkelijke giftigheid van het toxine; staat zij dus in rechtstreeksch verband met de d.l.m.?

In onderstaande tabel is een overzicht gegeven van de onvatbaarmakende werking van de in de proeven gebruikte anatoxinen.

Toxine, waaruit het anatoxine is bereid.	d.l.m. in mgr.	Anatoxine.	Immuniseerende werking.
48	6	48 I 48 II	goed goed
43	3	48 I 1 : 15 43 I 1 : 10 43 II 1 : 10 43 II 1 : 20 43 II 1 : 30	onvoldoende goed goed onvoldoende onvoldoende
47	>10	47 1 : 10	slecht

Uit deze tabel blijkt, dat anatoxine No. 48 I en anatoxine No. 48 II goede immuniseerende eigenschappen bezitten. Een vijftienvoudige verdunning van dit anatoxine bezit een onvoldoende werking. De d.l.m. van het overeenkomstige toxine was 6 mgr.

De anatoxinen Nos. 43 I en 43 II, in tienvoudige verdunning, vertoonen een goede onvatbaarmakende werking. Anatoxine No. 43 II in twintig- en dertigvoudige verdunning werken onvoldoende. De d.l.m. van het oorspronkelijke toxine No. 43 was 3 mgr.

Anatoxine No. 47 in tienvoudige verdunning heeft een slechte immuniseerende werking. Het oorspronkelijke toxine had een d.l.m. grooter dan 10 mgr.

Wordt de werking van de verschillende verdunningen van de anatoxinen met elkaar vergeleken, dan blijkt dat de anatoxinen Nos. 43 1:10 en 43 II 1:10 goede immuniseerende eigenschappen bezitten. De anatoxinen Nos. 48 I 1:15 en 47 1:10 vertoonen een onvoldoende onvatbaarmakende werking.

Conclusie: Bij de bereiding van anatoxine moet men uitgaan van een toxine met een kleine d.l.m. en, zooals later zal blijken, met een groot uitvlokkend vermogen.

HOOFDSTUK VII.

Is immuniseeren per os mogelijk?

We weten dat toxine per os onschadelijk is, dus geen toxinewerking vertoont. Hiermee behoeft echter nog niet samen te gaan een verdwijnen der antigeenwerking. Vandaar dat de bovenstaande vraag gesteld werd.

Ter beantwoording van deze vraag werd aan een aantal caviae toxine No. 26, in een vijfvoudige verdunning, per os toegediend. Tevens werd aan een tweede groep dieren op dezelfde wijze anatoxine No. 43 II in een tienvoudige verdunning gegeven. Daarnaast werd nog de werking van T.A.U., per os toegediend, nagegaan.

In deze proeven kregen de dieren twee of drie giften van 2 cc. per keer, telkens met een week tusschenruimte. Ongeveer 27 dagen na de eerste dosis werd de reactie van Schick toegepast. Uit tabel VIII blijkt, dat de dieren na de verschillende giften van 2 cc. toxine, T.A.U., of anatoxine geen enkele reactie vertoonden, uitgezonderd cavia No. 4. Dit dier stierf één dag na het toedienen van de eerste gift van 2 cc. toxine. Waarschijnlijk is een gedeelte van het toxine gekomen in de trachea. Het slijmvlies daarvan heeft het vermogen toxine direct op te nemen, waardoor de dood van het dier verklaard is. Cavia No. 3 vertoonde een negatieve pseudo-reactie en een negatieve ware reactie van Schick. Al de andere dieren vertoonden een negatieve pseudoreactie en een positieve ware reactie. Volgens de uitkomsten van deze reacties was dus alleen cavia No. 3 immuun, terwijl de overige dieren nog vatbaar waren. Caviae Nos. 1, 3, 6 en 10 werden ingespoten met 40 d.l.m. Na deze injectie vertoonde cavia No. 1 een plaatselijke reactie, de drie overige dieren stierven.

Conclusie: Toxine, T.A.U. of anatoxine, per os toegediend, heeft geen immuniseerende werking.

HOOFDSTUK VIII.

Proeven omtrent de uitvlokkingsreactie van Ramon.

Een andere bron ter verkrijging van een eiwitarm anatoxine zou misschien gelegen zijn in de binding toxine-antitoxine of anatoxine-antitoxine, zooals die bij de uitvlokkingsreactie van Ramon ontstaat. Teneinde dit na te gaan, diende eerst deze reactie nader te worden bestudeerd.

Van verschillende toxinen en anatoxinen werd het uitvlokkend vermogen bepaald (zie hoofdstuk I).

Aan een serie buizen, elk bevattende 10 cc. van de verschillende toxinen of anatoxinen, werd achtereenvolgens een stijgende hoeveelheid antitoxisch serum toegevoegd. Deze buizen werden gebracht bij een temperatuur van 37° of 50°. Na eenigen tijd trad in verscheidene van de buizen een opalescentie op, gevolgd door het ontstaan van een fijn neerslag, dat zich het eerst vormde in één van de buizen, doch dikwijls ook in twee of drie buizen tegelijk. Hierdoor is dus de uitkomst der reactie niet af te lezen. Pas wanneer het fijne precipitaat tot wattige vlokken samenklontert, en dit gebeurt in één buis vóór alle andere (*floculation initiale*), is het oogenblik van aflezen der reactie gekomen. Deze buis bevat dan juist een neutraal mengsel van toxine en antitoxine. Tabel IX geeft een overzicht van het uitvlokkend vermogen van verschillende toxinen en anatoxinen. In elke proef werd 10 cc. toxine of anatoxine gebruikt. De laatste kolom geeft de hoeveelheid antitoxisch serum aan, waarmee de uitvlokking het eerst optrad.

Vergelijkt men het uitvlokkend vermogen van de toxinen Nos. 26, 43, 49 en 45, dan blijkt, dat het toxine met de kleinste d.l.m. het grootste uitvlokkend vermogen bezit. Verder bezitten een versch toxine en het daaruit bereide anatoxine hetzelfde uitvlokkend vermogen, zooals aangetoond wordt

door de werking van de toxinen Nos. 43 en 49 met de betreffende anatoxinen.

Toxine No. 45, waarvan de oorspronkelijke d.l.m. 5 mgr. was, blijkt een kleiner uitvlokkend vermogen te bezitten dan het daarvan bereide anatoxine No. 45. Het eenmaal in anatoxine omgezette toxine behoudt het uitvlokkend vermogen van het oorspronkelijke toxine, zoodat hier moest worden aangenomen, dat het toxine No. 45 zoowel in uitvlokkend vermogen als in toxiciteit achteruit was gegaan. Dit bleek juist te zijn. De oorspronkelijke d.l.m. van 5 mgr. bleek nu 8 mgr. te zijn geworden, welke verzwakking, behalve door het bewaren, volkomen werd verklaard door de te hooge zuurgraad van het toxine. De Ph was 6,8, terwijl voor goede bewaring een Ph van 7,5 gewenscht is.

De zuurgraad van de toxinen Nos. 43 en 49 was steeds nagegaan en door toevoeging van phosphorzuur op de juiste waarde gehouden, waardoor de oorspronkelijke d.l.m. veel minder was veranderd. Het uitvlokkend vermogen van deze toxinen is constant gebleven, zooals blijkt uit de werking van de overeenkomstige anatoxinen. Uit het bovenstaande is de conclusie te trekken:

Indien men een toxine langeren tijd wil bewaren, zóó, dat het uitvlokkend vermogen en dus ook de antigeeneigenschappen, b.v. voor bereiding van T.A., constant blijven, is het noodig dat de waterstofionen-concentratie van het toxine op de juiste waarde ($Ph = 7.5$) wordt gehouden. Bij het bewaren van toxine wordt het afnemen der giftigheid niet veroorzaakt doordat het toxine overgaat in anatoxine, want dan zou het uitvlokkend vermogen hetzelfde moeten blijven, maar doordat het toxine overgaat in toxoïden. Toxoïde is dus blijkbaar geheel iets anders dan anatoxine, en is de door Glenny e.a. gebruikte term „toxoid” in dezen zin minder juist.

Verder werd de invloed nagegaan van de temperatuur op het verloop van de reactie. Bij kamertemperatuur duurde het langen tijd vóórdat de uitvlokking optrad. Bij een temperatuur van 37° was deze tijd twee tot vier uur, terwijl bij 50°

à 55° de reactie in de meeste gevallen, in ongeveer een half uur tot stand kwam, tenminste, wanneer toxine gebruikt werd. Met behulp van anatoxine was het verloop van de reactie veel langzamer. Meestal was dan een verwarming op 50° gedurende eenige uren noodig, terwijl bij een temperatuur van 37° de uitvlokking dikwijls pas optrad na vierentwintig uur.

Zoo moet de negatieve uitkomst worden verklaard, die Nélis (25) verkreeg met een toxine, dat zes maanden lang in de broedstoof was geweest. Hij zegt: „Ce produit ne floccule plus du tout après 12 heures à 37°. D'après Ramon, il conserverait cependant son pouvoir de floculation, à part un retard dans son apparition. Il en résulte que le résultat que j'ai obtenu n'est pas général.”

Nélis meende dus, dat de uitvlokkingreactie met behulp van zes maanden lang verwarmd toxine niet meer optrad. Deze meening is echter onjuist. Wordt toxine zes maanden verwarmd op 37°, dan verliest het zijn giftigheid, maar niet zijn uitvokkend vermogen, zooals Ramon aantoonde. Het toxine gaat namelijk over in anatoxine. Indien Nélis bij het uitvoeren van de reactie de verwarming op 37° langer dan 12 uur had toegepast, zou de uitvlokking waarschijnlijk wel tot stand zijn gekomen.

De hoeveelheid antitoxisch serum, noodig voor het ontstaan der reactie, was bij elke temperatuur, lager dan 55°, dezelfde. De temperatuur heeft alleen invloed op de snelheid van de reactie. Toch verdient het aanbeveling de reactie uit te voeren bij een temperatuur tusschen 40° en 50°. Tusschen 50° en 55° verloopt de reactie te snel. Meestal ontstaat dan de uitvlokking in meerdere buizen zoo snel achtereen, dat een juiste waarneming der tijdsverschillen bezwaarlijk wordt. Bij een temperatuur hooger dan 55°, treden onregelmatigheden in het verloop van de reactie op, zoodat de uitvlokking dan geen waarde meer heeft.

De reactie is het scherpst bij 37°. De tijd, noodig voor het ontstaan der uitvlokking is dan echter dikwijls lang, wat

voor practische toepassing een groot bezwaar vormt. Tusschen 40° en 50° verloopt de reactie veel sneller en is een juiste waarneming zeer goed mogelijk. Meestal ontstaat, bij een temperatuur hooger dan 40° , het fijne precipitaat in meerdere buizen tegelijk, maar de eigenlijke donzige uitvlokking vertoont zich altijd het eerst in één van die buizen, zoodat na eenige ervaring, een juiste aflezing geen moeilijkheden geeft.

Toch dient men steeds zijn aandacht aan het verloop der reactie te wijden, zoodat het goede tijdstip van uitvlokking kan worden waargenomen.

Teneinde te trachten dit practische bezwaar te ondervangen, werd de vraag gesteld: *bevat de middelste van de buizen waarin de uitvlokking heeft plaats gehad, het juist neutrale mengsel van toxine en antitoxine?* Kan men dus de reactie laten afloopen en dan het eindresultaat leeren kennen door de verhoudingen tusschen toxine (anatoxine) en antitoxine, die de middelste der uitgevlokte buizen aangeeft? Dit bleek volgens een proefneming niet het geval te zijn. Een rij buizen, gevuld met 10 cc. toxine No. 26, waaraan stijgende hoeveelheden antitoxisch serum waren toegevoegd, werd 24 uur bij 37° gebracht. In dertien buizen was een uitvlokking ontstaan. De middelste van die buizen bevatte 0.7 cc. serum. Tevens was nagegaan in welke buis de uitvlokking het eerst optrad. Dit geschiedde in de buis die 0.6 cc. serum bevatte. Bovenstaande vraag moet dus ontkennend worden beantwoord.

Conclusie: bij het uitvoeren van de reactie van Ramon is het noodig het verloop van de reactie voortdurend te volgen, zoodat een juiste waarneming van het mengsel, waarin het eerst de uitvlokking ontstaat, kan geschieden.

Kan de reactie met kleinere hoeveelheden toxine uitgevoerd worden?

In al deze proeven werd, in verband met de af te meten hoeveelheden serum, steeds 10 cc. toxine of anatoxine gebruikt. Indien het mogelijk was het serum te verdunnen, zou

de reactie uitgevoerd kunnen worden met een kleine hoeveelheid toxine.

Met behulp van tweemaal verdund antitoxisch serum bleek de reactie op dezelfde wijze te verlopen als met onverdund serum, Hierbij kon dus de hoeveelheid toxine tot op de helft worden verminderd.

Een viervoudige verdunning gaf minder goede resultaten. De uitvlokking ontstond in meerdere buizen tegelijk, zoodat een scherpe aflezing onmogelijk werd. Tevens was de tijd, waarin de reactie tot stand kwam veel langer dan bij gebruik van onverdund of tweemaal verdund serum. Uit deze proeven volgt: Bij de toepassing van de reactie van Ramon kan het toegevoegde antitoxische serum tweemaal verdund worden, Sterkere verdunning van het serum veroorzaakt een minder scherpe uitvlokking, althans met het in de proeven gebruikte toxine, zoodat dan de waarde van de reactie verloren gaat.

Met behulp van deze uitvlokkingreactie is de sterkte van een willekeurig antitoxisch serum te bepalen, indien men een toxine van bekend uitvlokkend vermogen in handen heeft.

Serum van paard 1 bevatte, volgens een titratie op caviae 220 A.E. per c.c. Toxine No. 26 vertoonde de uitvlokkingreactie met 0.6 c.c. van dit serum. Deze 0.6 c.c. bevatte $0.6 \times 220 = 132$ A.E. Dus 10 c.c. toxine No. 26 heeft voor de uitvlokking 132 A.E. noodig.

Het uitvlokkend vermogen van een toxine wordt weergegeven door de L.f. (limes flocculationis); dit is, volgens Glenny en Okell, de hoeveelheid toxine, die de uitvlokkingreactie geeft met 1 A.E. Uit bovenstaande gegevens kan men de L.f. van toxine No. 26 afleiden. 10 c.c. toxine No. 26 geeft de reactie van Ramon met 132 A.E. of 1 A.E. is equivalent met $\frac{1}{13,2}$ c.c. toxine. De L.f. van toxine No. 26 is dus $\frac{1}{13,2}$

De sterkte van een willekeurig antitoxisch serum is nu te bepalen met behulp van dit toxine No. 26. Men gaat uit van

een bepaalde hoeveelheid serum en gaat na hoeveel cc toxine toegevoegd moet worden om de uitvlokkingsreactie tot stand te brengen. Daar de L. f. van het toxine $\frac{1}{13,2}$ is, is dan het aantal A.E. van de gebruikte hoeveelheid serum gelijk aan de hoeveelheid toxine in c.c., vermenigvuldigd met 13,2. Deelt men deze uitkomst door het aantal cc. van het serum, dan vindt men de sterkte hiervan in A.E. per cc. B.v.: 0.5 cc. serum geeft de reactie met 8 cc. toxine No. 26 en bevat dus $8 \times 13,2 = 105,6$ A.E. of de sterkte van het serum is $\frac{105,6}{0.5} = 211$ A.E.

Men kan ook uitgaan van een bepaalde hoeveelheid van het toxine en nagaan hoeveel cc. serum moet toegevoegd worden om de uitvlokkingsreactie tot stand te brengen: b.v. men gaat uit van 10 cc. toxine. Deze 10 cc. toxine is equivalent met 132 A.E. Is b.v. 0.5 cc. serum gebruikt, dan bevat deze 0.5 cc. serum 132 A.E. Dus de sterkte van het serum is 264 A.E.

Door middel van een toxine waarvan de L.f. bekend is, kan men nu ook, met behulp van een willekeurig serum, het uitvlokkend vermogen van elk ander toxine bepalen. Men bepaalt eerst, door middel van het toxine van bekend uitvlokkend vermogen, de sterkte van het serum, en met behulp hiervan het uitvlokkend vermogen van het tweede toxine.

Men moet goed in het oog houden, dat men met behulp van deze uitvlokkingsreactie de toxiciteit van een toxine niet kan bepalen; men bepaalt alléén het uitvlokkend vermogen. Practisch gaan echter toxiciteit en uitvlokkend vermogen grootendeels parallel, zoodat ook wel als regel een toxine met een groot uitvlokkend vermogen, dus met een kleine Lf, een kleine d.l.m. bezit.

De beschreven uitvlokkingsproeven werden alle uitgevoerd met behulp van versch serum. Oud en ook gezuiverd, eiwit-arm serum bleek de reactie niet te geven, echter wel, wanneer aan oud of gezuiverd serum een weinig versch serum werd toegevoegd. De sterkten van deze oude of gezuiverde sera zijn

nu ook weer te bepalen, indien de sterkte van het toegevoegde versche serum bekend is. Een hoeveelheid versch serum van 220 A.E. werd vermengd met een zelfde hoeveelheid oud serum. 10 cc. Toxine No. 26 gaf de reactie met 0.4 cc. van dit mengsel. Deze 0.4 cc. bevatte dus 132 A.E. Hierbij is 0.2 cc. versch serum, bevattende $0.2 \times 220 = 44$ A.E. Dus 0.2 cc. oud serum bevat $132 - 44 = 88$ A.E., of 1 cc. bevat 440 A.E.

HOOFDSTUK IX.

Proeven ter verkrijging van een eiwitarm anatoxine, bereid uit het neerslag van Ramon.

Wordt het bij de reactie van Ramon verkregen neerslag, bestaande uit een verbinding van toxine en antitoxine, opgelost met behulp van een weinig azijnzuur en wordt deze oplossing een uur lang verwarmd op 60° , dan blijkt, dat het toxine vernietigd is, terwijl de oplossing antitoxische eigenschappen heeft gekregen. Dit werd bevestigd door de volgende proefneming. Het neerslag, verkregen door aan 15.6 cc. serum een overeenkomstige hoeveelheid toxine toe te voegen, werd verzameld en opgelost in 11 cc. aangezuurd water en daarna een uur lang op 60° C. verwarmd. Het serum bevatte oorspronkelijk 300 A.E. per cc. In deze oplossing was dus aanwezig 4680 A.E. of 425 A.E. per cc., eventueele verliezen buiten beschouwing gelaten. De oplossing werd nu getitreerd op 400 A.E. per cc. en ingespoten bij een cavia. Het dier stierf in vier dagen. Opgemerkt dient te worden, dat de gebruikte cavia 300 gram zwaar was. Deze titratie was dus niet zuiver quantitatief, maar toont aan dat vrijwel al het antitoxine behouden is gebleven.

Uit het neerslag, bestaande uit toxine en antitoxine, verkregen volgens de reactie van Ramon, was dus het antitoxine weer vrij te krijgen, op welk feit Ramon dan ook de bereiding van een zeer zuiver eiwitarm antitoxine heeft gegrond.

Voor ons doel, de bereiding van een eiwitarm anatoxine, was echter de vraag: *Is het mogelijk uit het neerslag het antitoxine te verwijderen, zoodat het anatoxine overblijft?*, van meer belang.

Het antwoord op deze vraag zou voor de bereiding van een eiwitarm anatoxine van groote beteekenis kunnen zijn.

C. Hallauer (26) beschreef de werking van zuren op bacterieele toxinen. Hij vond, dat waterige oplossingen van diphtherietoxine door toevoeging van zuren hare giftigheid verliezen. De toxiciteit is weer terug te krijgen door de zure oplossing te neutraliseeren met alkaliën. Tegelijk met de giftwerking verdwijnen bij het aanzuren ook de antigeeneigenschappen, terwijl bij het neutraliseeren van de zure oplossing deze eigenschappen weer terug komen. Op deze manier is dus een antigeen om te zetten in een niet-antigeen en omgekeerd een niet-antigeen weer in een antigeen. Het inactiveeren van toxine door zuren is een proces, waarvan het verloop afhangt van den zuurgraad der toxineoplossing. De omzetting geschiedt niet in eens, maar heeft plaats na een lange inwerking van het zuur. De reactiveering van het toxine door alkaliën verloopt veel sneller. Hiervoor is slechts een korten tijd noodig.

In verband met deze vinding van Hallauer werd de werking van zuur op een oplossing van het neerslag van toxine en antitoxine, verkregen volgens de reactie van Ramon, nagegaan.

Aan 300 cc. toxine No. 26 werd 18.5 cc. serum toegevoegd, bevattend dië hoeveelheid antitoxine, waardoor het toxine juist geneutraliseerd werd, d.w.z. die de sterkste uitvloeking gaf. Dit mengsel werd 24 uur bij 37° C. geplaatst. Het zoo verkregen neerslag werd afgecentrifugeerd en de helft daarvan werd opgelost in 9 cc. water, waaraan 1 cc. normaal zoutzuur was toegevoegd. *Deze zure oplossing bleef 24 uur staan bij kamertemperatuur.* Bij een cavia werd daarna ½ cc. van de zure oplossing ingespoten. Het dier vertoonde na deze injectie geen enkele reactie; de zure oplossing was dus of neutraal gebleven of antitoxisch geworden. Om dit na te gaan werd een tweede cavia behandeld met ½ cc. van de zure oplossing, waaraan een hoeveelheid toxine was toegevoegd, overeenkomende met 5 d.l.m. Ook dit dier vertoonde na de injectie geen verschijnselen, zoodat er blijkbaar antitoxine vrij was gekomen en wel voldoende om deze 5 d.l.m. te binden.

Na 24 uur werd de zure oplossing nauwkeurig *geneutraliseerd met kaliloog*. Van deze neutrale oplossing werd $\frac{1}{2}$ cc. bij een cavia ingespoten. Het dier stierf na vier dagen; de scheikundig neutrale oplossing was dus biologisch niet neutraal gebleven, maar toxisch geworden; bij de wisseling der scheikundige reactie is dus antitoxine vernietigd.

Het tweede gedeelte van het oorspronkelijke neerslag werd opgelost in 9 cc. water, waaraan 1 cc. normaal zoutzuur was toegevoegd. Na 24 uur werd $\frac{1}{2}$ cc. van deze oplossing vermengd met een hoeveelheid toxine, overeenkomende met 50 d.l.m., ingespoten bij een cavia. Het dier vertoonde geen reactie. Dus is een groote hoeveelheid toxine tijdelijk buiten werking en een groote hoeveelheid antitoxine vrij. Na 2×24 uur werd deze proef herhaald bij een tweede cavia. Ook dit dier vertoonde geen verschijnselen, terwijl bij een herhaling van de proef na 3×24 uur hetzelfde resultaat werd verkregen. Na 3×24 uur werd de zure oplossing *geneutraliseerd*. Een cavia, ingespoten met 1 cc. van deze neutrale oplossing, vertoonde geen verschijnselen, in tegenstelling met de werking van de na 1×24 uur *geneutraliseerde* oplossing.

Uit deze proeven volgt dus: in de zure oplossing van het neerslag, bestaande uit toxine en antitoxine, is vrij antitoxine aanwezig. De binding tusschen het toxine en het antitoxine schijnt opgeheven te zijn, terwijl het toxine door de werking van het toegevoegde zuur zijn giftigheid en tevens zijn antitoxinebindende eigenschappen heeft verloren. In de na 24 uur *geneutraliseerde* oplossing is een overschot aan toxine. Hieruit volgt, dat het door het zuur geïnactiveerde toxine zijn giftigheid geheel of gedeeltelijk heeft teruggekregen, terwijl tegelijkertijd het antitoxine gedeeltelijk door het zuur is vernietigd. In de eerst aangezuurde en daarna *geneutraliseerde* oplossing is dus naast elkaar aanwezig vrij toxine en toxine gebonden aan antitoxine.

Wanneer het toxine 3×24 uur aan de werking van het toegevoegde zuur is blootgesteld, wordt het toxine door *neutraliseeren* van de zure oplossing niet meer gereactiveerd.

Het antitoxine is nog in vrij groote hoeveelheid aanwezig, zooals blijkt uit het feit, dat 50 d.l.m. totaal geneutraliseerd worden.

Verondersteld werd nu, dat zuur op een oplossing van het neerslag bestaande uit anatoxine en antitoxine, verkregen volgens de reactie van Ramon, op overeenkomstige wijze inwerkt als op een oplossing van het neerslag van toxine en antitoxine. Indien dit juist was, zou door aanzuren en daarna neutraliseeren van de oplossing van anatoxine en antitoxine, een oplossing verkregen worden, waarin naast elkaar aanwezig zijn: vrij anatoxine en anatoxine gebonden aan antitoxine; d.w.z. in de oplossing is een overmaat aan vrij ongiftig antigeen. Zoo zou dan een oplossing worden verkregen die veel overeenkomst heeft met T.A., wat betreft de verhouding antigeen antitoxine. Immers, in T.A. is naast elkaar aanwezig toxine en toxine gebonden aan antitoxine, T.A. bezit dus eveneens een overmaat van vrij, maar giftig, antigeen. Het voordeel van het ongiftige anatoxine-antitoxine, A.A., voor immuniseeringsdoeleinden springt onmiddellijk in het oog, vooral in verband met de in den laatsten tijd in het buitenland door T.A. verwekte ongevallen.

Aan 300 cc. anatoxine No. 43 II werd 18 cc. serum toegevoegd; dit is diè hoeveelheid — waarmee de sterkste uitvloking optreedt. Dit mengsel werd zoolang in de broedstoof geplaatst, totdat een duidelijk neerslag was gevormd. Dit neerslag werd afgecentrifugeerd en opgelost in 45 cc. water, waaraan 5 cc. normaal zoutzuur was toegevoegd. Na 24 uur werd deze oplossing geneutraliseerd. Daarna werd een gedeelte van de oplossing zesmaal verdund, een tweede gedeelte werd drie maal verdund en een derde gedeelte werd tweemaal verdund. Zoo werden dus drie oplossingen verkregen, waarbij in de eerste oplossing het antigeen aanwezig was in dezelfde concentratie als in het oorspronkelijke anatoxine. In de tweede oplossing was het antigeen tweemaal en in de derde oplossing driemaal geconcentreerd. De drie oplossingen werden achtereenvolgens genoemd: A.A. I, II en III.

De onvatbaarmakende werking van dit A.A. werd nu onderzocht. Drie groepen van vier caviae werden achtereenvolgens behandeld met A.A. I, II en III. De dieren kregen twee of drie immuniseerende injecties van $\frac{1}{2}$ cc, telkens met een week tusschenruimte. Ongeveer 27 dagen na de eerste injectie werd de reactie van Schick uitgevoerd. Daar in dit A.A. analoge verhoudingen tusschen anatoxine en antitoxine aanwezig zijn als in T.A. tusschen toxine en antitoxine, was te verwachten, dat de dieren na 27 dagen nog niet een voldoende immuniteit zouden bezitten. Immers, caviae behandeld met T.A., zijn pas na zes weken immuun. Daarom werd ongeveer zes weken na de eerste immuniseerende injectie een tweede reactie van Schick uitgevoerd. Drie dagen daarna werden de caviae ingespoten met 40 d.l.m. Tabel X geeft een overzicht van de verkregen resultaten.

Bij geen enkele van de dieren trad na de immuniseerende injecties een plaatselijke reactie op. De eerste reactie van Schick, evenals bij immuniseeren met zuiver anatoxine verricht na 4 weken, was bij alle dieren positief, in tegenstelling met het resultaat van de twee weken later, dus als na immuniseeren met T.A., uitgevoerde reactie. Nu reageerden alle dieren negatief. Een pseudoreactie van Schick trad in geen enkel geval op, hetgeen de eiwitarmoede van het gebruikte A.A. duidelijk bevestigt. De dieren waren dus volgens de reactie van Schick na zes weken onvatbaar geworden, hetgeen ook verwacht werd.

Over de uitkomsten na de gift van 40 d.l.m. valt niet te oordeelen, daar het grootste gedeelte van de dieren eenige dagen na het toedienen van die gift stierven aan leverbotziekte. Geen enkele van de gestorven dieren, uitgezonderd cavia No. 4, vertoonde verschijnselen van diphtherietoxinevergiftiging. Dit laatste dier vertoonde lichte diphtherische verschijnselen, hoewel niet met zekerheid was uit te maken, dat dit dier aan diphtherie gestorven was.

Uit de resultaten van de toediening der 40 d.l.m. valt helaas door de ongelukkige sterfte der proefdieren aan leverbot,

geen goede gevolgtrekking te maken. Daar evenwel de reactie van Schick bij alle dieren negatief uitviel, kan op grond van de ervaring, dat deze negatieve reactie parallel loopt met onvatbaarheid, worden besloten, dat de immuniseerende werking van A.A. een goede is.

SAMENVATTING.

Onmiskenbaar is de groote beteekenis, die reeds thans bij de diphtheriebestrijding, de immunisatie met het toxine-antitoxinemengsel (T.A.) van Park en Zingher heeft. Ondertusschen zijn de aan het gebruik ook van dit mengsel verbonden bezwaren niet denkbeeldig gebleken (zie inleiding).

Tot op zekere hoogte voorziet reeds thans, in theorie, het door Ramon aangegeven anatoxine — een door inwerking van formaline op toxine bereide, als onschadelijk aanbevolen, entstof — in deze leemte. Bij de practische toepassing is ondertusschen hier te lande en elders gebleken, dat aan de enting onaangename, zij het onschadelijke, reactieverschijnselen verbonden zijn.

Een poging, om deze te ondervangen lag aan de proefnemingen, die in deze verhandeling neergelegd zijn, ten grondslag.

Allereerst werd een systematisch onderzoek ingesteld naar de factoren, die bij de omzetting van toxine in anatoxine een rol spelen. Daarbij bleek, dat voor deze omzetting een bepaald formalinegehalte noodig was. De beste uitkomsten werden verkregen met een formalinegehalte van 0.4 %. Bij nadere bestudeering van het wezen van het verkregen product bleek, dat de antigeenwerking van het toxine door inwerking der formaline niet vernietigd werd tenzij het formalinegehalte hooger genomen werd dan 0.4 %. Dan verdwenen ook de anti-geeneigenschappen.

Wat de temperatuur betreft, waarbij de omzetting van toxine in anatoxine plaats vindt, bleek bij een formalinegehalte van 0.4 %, 37° C. gedurende 29 dagen de voorkeur te verdienen. Bij inwerking van hoogere temperatuur verdwijnt de giftigheid wel veel sneller, maar blijft niet de volle antigeenwerking behouden. Dit geschiedt het best bij 37° C., ter-

wijl de giftigheid verloren gaat. Inwerking van een hooge temperatuur alléén geeft geen aanleiding tot het vormen van anatoxine. De toxische werking wordt dan wel weggenomen, maar ook de onvatbaarmakende werking verdwijnt.

Vervolgens werd gezocht naar een antwoord op de vraag of een zekere mate van overgebleven toxiciteit de onvatbaarmakende werking van anatoxine ten goede kwam. Uit de genomen proeven bleek, dat zwak toxisch anatoxine zeer goed immuniseerde, misschien zelfs beter dan geheel atoxisch anatoxine. Afgezien van het vraagstuk der plaatselijke reactie, moest toch de giftigheid van dit mengsel als een bezwaar voor de toepassing bij den mensch beschouwd worden.

Een nader onderzoek naar de immuniseerende werking van verschillende anatoxineoplossingen leerde nog het volgende: de onvatbaarmakende werking van een anatoxine wordt gedeeltelijk bepaald door de vergiftigheid van het oorspronkelijke toxine. Het sterkst immuniseerende anatoxine wordt verkregen wanneer men uitgaat van een toxine met een kleine dosis letalis minima.

Uit de negatieve resultaten van proeven om caviae te immuniseeren door middel van toediening door den mond van toxine, T.A.U., of anatoxine, werd de slotsom getrokken, dat zoodanige toedieningswijze geen immuniseerende werking heeft.

Vervolgens werd de invloed bestudeerd, die verdunnen heeft op het optreden van plaatselijke reactie eenerzijds en de immuniseerende werking anderzijds; een en ander in verband met de hierboven genoemde onaangename reactie, verbonden aan het inspuiten van onverdund anatoxine, in de gebruikelijke dosis. Deze reacties zijn afhankelijk van het hooge gehalte aan aspecifieke eiwitten. Uit de genomen proeven valt af te leiden, dat de tienvoudige verdunning van een werkzaam anatoxine (en deze weer afkomstig van een sterk werkend toxine) een goede onvatbaarmakende werking bezit. Grootere verdunningen hebben onvoldoende onvatbaar makende eigenschappen. Plaatselijke reacties traden na de im-

muniseerende injecties met een dergelijk tienvoudig verdund anatoxine, niet op.

Ondertusschen werd de mogelijkheid verondersteld, een anatoxine te bereiden, dat arm was aan aspecifieke eiwitten en dan ook onverdund een krachtige onvatbaarmakende werking zou paren aan het voordeel geen ongewenschte reactie te geven. Met behulp van ammoniumsulfaat werden de verschillende eiwitten uit toxine van elkaar gescheiden en nagegaan aan welk eiwit de toxiciteit gebonden was. De pseudoglobulinegroep bleek de meest toxische eigenschappen te bezitten. Nu moest worden nagegaan of de antigeenwerking van anatoxine eveneens gebonden was aan de, eventueel in het anatoxine aanwezige, pseudoglobulinegroep. Met behulp van ammoniumsulfaat werd deze groep uit anatoxine neergeslagen, afgefiltreerd en weer opgelost in water. Nu werd van deze oplossing de onvatbaarmakende werking onderzocht. Uit de desbetreffende proeven bleek, dat deze (op drievoudige sterkte gebrachte) pseudoglobulineoplossing bevredigende immuniseerende eigenschappen heeft. (De oplossing bleek bij een gelijk pseudoglobulinegehalte als van het oorspronkelijke anatoxine, slechts zwakke onvatbaarmakende werking te bezitten).

In aansluiting hieraan werd nu nog langs geheel anderen weg gestreefd naar het verkrijgen zoowel van een eiwitarm toxine als van een eiwitarm anatoxine. Als uitgangspunt hiertoe diende het feit, dat in mengsels van antitoxine en toxine (resp. antitoxine en anatoxine) onder bepaalde omstandigheden samengebracht, een vlokkig neerslag ontstaat, bestaande uit een verbinding van antitoxine en toxine (resp. antitoxine en anatoxine). Dezerzijds werd nu de mogelijkheid verondersteld, dat deze verbinding omkeerbaar zou zijn. In dat geval zou vernietiging op de een of andere wijze van de antitoxine-component tengevolge hebben, dat een *eiwitarm* toxine, resp. anatoxine, verkregen werd. Als voorbereidend onderzoek werd de uitvlokkingsreactie van Ramon nader bestudeerd en van verschillende toxinen en anatoxinen het uit-

vlokkend vermogen bepaald. Daarbij bleek, dat het uitvlokkend vermogen van een toxine als regel des te grooter is naarmate de d.l.m. kleiner is. Van belang is verder, dat een toxine en het daarvan bereide anatoxine hetzelfde uitvlokkend vermogen bezitten. De temperatuur, waarbij de uitvlokkingsreactie het scherpst optreedt, is 37° C. De reactie verloopt sneller bij hoogere temperatuur en tot 50° is het verloop nog goed te volgen. Boven 50° verliest zij echter haar waarde, omdat dan onregelmatigheden in de uitvlokkingsreactie optreden.

Om een juiste waarneming van het mengsel, waarin het eerst de uitvlokkingsreactie ontstaat, mogelijk te maken, bleek het noodzakelijk het verloop der reactie voortdurend te volgen.

Bovendien werden nog de navolgende bijzonderheden over de uitvlokkingsreactie gevonden. Zij verloopt met behulp van twee maal verdund antitoxisch serum op dezelfde wijze als met onverdund. In alle opzichten werd bevestigd de vondst van Ramon, dat met behulp van deze reactie de sterkte van een willekeurig antitoxisch serum te bepalen is, indien men over een toxine van bekend uitvlokkend vermogen beschikt. Zoo ook, dat men door middel van een toxine, waarvan de limes flocculationis (Lf.) bekend is, met behulp van een willekeurig serum, de Lf. van elk ander toxine bepalen kan.

Wat nu de pogingen betreft om uit het vlokkig neerslag, verkregen bij de uitvlokkingsreactie, weer toxine vrij te maken, het navolgende. Dit neerslag werd met behulp van zoutzuur opgelost en de aldus verkregen oplossing na 24 uur geneutraliseerd (ten opzichte van phenolphthaleïne). Bij nadere proeven bleek, dat in de *zure* oplossing vrij antitoxine aanwezig was. De binding tusschen het toxine en het antitoxine was dus opgeheven, terwijl het toxine, door de werking van het toegevoegde zuur, zijn giftigheid en tevens zijn antitoxinebindende eigenschappen verloren had. In de na 24 uur geneutraliseerde oplossing bleek een overmaat van toxine aanwezig te zijn. Daaruit volgde dus, dat het door het zuur

geinactiveerde toxine zijn giftigheid geheel of gedeeltelijk teruggekregen had, terwijl tegelijkertijd het antitoxine door het zuur gedeeltelijk vernietigd was.

Verondersteld werd nu, dat zuur op een oplossing van het neerslag, bestaande uit anatoxine en antitoxine, op overeenkomstige wijze inwerken zou. Dan zou een oplossing worden verkregen, die veel overeenkomst heeft met T.A., wat betreft de verhouding antigeen-antitoxine. In dit „A.A.” („Ananti”) zou dan naast elkaar aanwezig zijn: vrij antigeen en antigeen, gebonden aan antitoxine. Dat dit inderdaad het geval is, bleek uit de goede immuniseerende werking van dit ananti. Bij geen enkel dier trad na de immuniseerende injecties een plaatselijke reactie op. Na zes weken vertoonden alle dieren een negatieve reactie van Schick.

De gevolgtrekking is dus gewettigd, dat het mogelijk is, ter voorbehoedende onvatbaarmaking tegen diphtherie, de beschikking te krijgen over een entstof, die aan krachtige immuniseerende werking een volstreekte onschadelijkheid — in den zin van toxiciteit — paart en bovendien door de afwezigheid van aspecifieke eiwitten tot geenerlei ongewenschte reactie bij de inspuiting aanleiding geeft.

LITERATUUR.

1. Deutsche Med. Wochenschrift 1913 No. 19.
2. Ned. Tijdschrift v. Geneesk. 1924 II No. 14.
3. " " " " 1925 II No. 1.
4. Deutsche Med. Wochenschrift 1913 No. 20.
5. Verh. des 30sten Kongr. f. inn. med. Wiesbaden 1913.
6. Kongr. f. inn. Med. 1914.
7. Berl. Klin. Wochenschrift 1914 No. 29.
8. Ten Bokkel Huinink. Proefschrift 1919.
9. Ned. Tijdschrift v. Geneesk. 1922 No. 7.
10. " " " " 1923 No. 14.
11. Centr. f. Bakt. 1923 Orig. 'Abl. 1. p. 143.
12. J. of Immunology Vol. VIII No. 6 en IX No. 1.
13. " " " " Vol. IV No. 1.
14. Am. J. of public Health Jan. 1923.
15. Deutsche Med. Wochenschrift 1924 No. 8.
16. Centr. f. Bact. 1820 blz. 572.
17. Journal of Hygiene 20. 176.
18. Brit. J. of exp. Path 1923 Vol. IV.
19. Ann. de l'Inst. Pasteur 1823 blz. 1001.
20. " " " " T XXIII blz. 155. T XXXIV
blz. 596.
21. Med. Klinik 1920 No. XVI.
22. Bull. et Mém. de la Soc. Med. des Hôpitaux de Paris
T XLVII No. 16, 17, 18.
23. Am. J. of Dis. of Children 1924 No. 4.
24. La Presse Med. 1924 No. 78.
25. Comptes rendus des séances de la Soc. de Biol. 1926 No. 2.
26. Z. f. Hyg. und Inf. Krankh. 105 Band 1 Heft 1.

TABEL I

Anatoxine N°.	Cavia N°.	1e injectie	reactie	2e injectie	reactie	3e injectie	reactie	Schick			dlm		
								datum	o	v	datum	aantal	reactie
48 I 0.3 form. 36 dagen 37°	1	28/10	—	4/11	±	11/11	+	25/11	—	—	28/11	40	±
	2	"	—	"	±	"	+	"	—	—	"	"	+
	3	"	—	"	±	"	+	"	±	—	"	"	±
	4	"	—	"	±	"	+	"	—	—	"	"	±
48 II 0.4 form. 29 dagen 37°	1	28/10	—	4/11	—	11/11	—	25/11	±	—	28/11	40	—
	2	"	—	"	—	"	—	"	±	±	"	"	+
	3	"	—	"	—	"	—	"	—	—	"	"	+
	4	"	—	"	—	"	—	"	—	—	"	"	—
48 III 0.5 form. 11 dagen 37°	1	6/10	—	13/10	—	20/10	—	15/10	paralytisch		19/10	7	+
	2	"	—	"	—	"	—	3/11	—	—	5/11	40	+
	3	"	—	"	—	"	—	"	+	+	"	20	+
	4	"	—	"	—	"	—	"	+	+	"	40	+
48 IV 0.6 form. 9 dagen 37°	1	6/10	—	13/10	—	20/10	±	3/11	—	—	5/11	20	+
	2	"	—	"	—	"	—	"	—	—	"	40	+
	3	"	—	"	—	"	—	"	—	—	"	20	+
	4	"	—	"	—	"	—	"	—	—	"	40	+

7

ziek

7/11

+

TABEL II

Anatoxine N°.	Cavia N°.	1e injectie	reactie	2e injectie	reactie	3e injectie	reactie	Schick			dlm		
								datum	o	v	datum	aantal	reactie
48 0a — 58° 56 uur	1	29/9	—	6/10	—	—	—	26/10	—	—	29/10	20	—
	2	"	—	"	—	13/10	—	"	+	—	"	40	+
	3	"	—	"	—	"	—	"	+	—	"	20	+
	4	"	—	"	—	"	—	"	+	—	"	40	+
48 Ia 0.3 form. 58° 3 dagen	1	28/9	—	5/10	—	—	—	26/10	—	—	29/10	20	—
	2	"	—	"	—	12/10	—	"	+	—	"	40	—
	3	"	—	"	—	"	—	"	+	+	"	20	—
	4	"	—	"	—	"	—	"	—	—	"	40	—
48 IIIa 0.5 form. 58° 3 dagen	1	28/9	—	5/10	—	—	—	26/10	—	—	29/10	20	—
	2	"	—	"	—	12/10	—	"	+	+	"	40	—
	3	"	—	"	—	"	—	"	—	—	"	20	—
	4	"	—	"	—	"	—	"	—	—	"	40	—
48 IVa 0.6 form. 58° 56 uur	1	28/9	—	5/10	—	—	—	26/10	+	—	29/10	20	—
	2	"	—	"	—	12/10	—	"	+	—	"	40	—
	3	"	—	"	—	"	—	"	+	—	"	20	—
	4	"	—	"	—	"	—	"	+	—	"	40	—
48 b — 50° 56 uur	1	28/10	—	4/11	—	—	—	25/11	+	—			—
	2	"	—	"	—	11/11	±	"	+	—			—
	3	"	—	"	±	"	—	"	+	—			—
	4	"	—	"	—	"	—	"	+	—	28/11	40	—

29/11

TABEL III

Anatoxine N°.	Gavia N°.	1e injectie	reactie	2e injectie	reactie	3e injectie	reactie	Schick			dlm		
								datum	o	v	datum	aantal	reactie
50 I	1	17/11	—	24/11	—	1/12	—	14/12	—	—	17/12	20	+ + necrose
	2	"	—	"	—	"	—	"	±	—	"	40	+
50 II	3	"	—	"	—	"	—	"	±	—	"	20	+ + necrose
	4	"	—	"	—	"	—	"	±	—	"	40	+
50 III	5	"	—	"	—	"	—	"	±	—	"	20	+ necrose
	6	"	—	"	—	"	—	"	+	—	"	40	+
50 IV	7	"	—	"	—	"	—	"	±	±	"	20	+ necrose
	8	"	—	"	—	"	—	"	±	±	"	40	—
50 a I	9	"	—	"	—	"	—	"	+	—	"	20	+
	10	"	—	"	—	"	—	"	+	—	"	40	+
50 a II	11	"	—	"	—	"	—	"	+	—	"	20	+
	12	"	—	"	—	"	—	"	±	—	"	40	—
50 a III	13	"	—	"	—	"	—	"	+	—	"	20	+
	14	"	—	"	—	"	—	"	+	—	"	40	+
50 a IV	15	23/11	—	30/11	—	7/12	—	20/11	+	—	24/12	20	+
	16	"	—	"	—	"	—	"	5/12	+	intercurrent	"	+

TABEL IV

Anatoxine N ^o .	Cavia N ^o .	1e injectie	reactie	2e injectie	reactie	3e injectie	reactie	Schick datum	Schick o	Schick v	dlm		
											datum	saantal	reactie
48 III a	1	22/12	—	29/12	—		—	19/1	+	±	22/1	+	
	2	"	—	"	—		—	"	+	—	"	+	
	3	"	—	"	—	5/1	—	"	+	—	"	+	
	4	"	—	"	—	"	—	"	+	±	"	+	
48 III a II	1	"	—	"	—		—	"	+	—	"	+	
	2	"	—	"	—		—	"	+	—	"	+	
	3	"	—	"	—	5/1	—	"	+	—	"	+	
	4	"	—	"	—	"	—	"	+	—	"	+	

TABEL V

Anatoxine N ^o .	Cavia N ^o .	1e injectie	reactie	2e injectie	reactie	3e injectie	reactie	Schick			dlm		
								datum	o	Δ	datum	antal	reactie
47 1:10	1	17/10	—	24/10	—	—	—	14/11	+	—	17/11	20	+
	2	"	—	"	—	31/10	—	"	+	—	—	—	—
	3	"	—	"	—	"	—	"	+	—	17/11	20	+
	4	"	—	"	—	"	—	"	+	—	—	—	—
43 I 1:10	1	15/8	—	22/8	—	30/8	—	—	—	—	7/9	20	+
	2	"	—	"	—	"	—	—	—	—	14/9	"	—
	3	"	—	"	—	"	—	—	—	—	7/9	"	—
	4	"	—	"	—	2/9	—	—	—	—	7/9	"	—
	5	18/8	—	25/8	—	"	—	—	—	—	10/9	"	—
	6	"	—	"	—	"	—	—	—	—	10/9	"	—
	7	"	—	"	—	"	—	—	—	—	10/9	"	—
Parijs 1:10	1	15/8	—	22/8	—	30/8	—	—	—	—	7/9	20	—
	2	"	—	"	—	"	—	—	—	—	14/9	40	+
	3	"	—	"	—	"	—	—	—	—	7/9	20	—
	4	"	—	"	—	2/9	—	—	—	—	14/9	40	+
	5	18/8	—	25/8	—	"	—	—	—	—	10/9	20	—
	6	"	—	"	—	"	—	—	—	—	"	"	—
	7	"	—	"	—	"	—	—	—	—	"	"	—
	8	14/9	—	21/9	—	"	—	—	—	—	5/10	40	+
	9	"	—	"	—	28/9	—	—	—	—	12/10	"	+
	10	"	—	"	—	"	—	—	—	—	5/10	"	+
	11	"	—	"	—	"	—	—	—	—	12/0	"	—

e/11 paralytisch

TABEL V (Vervolg)

43 II 1:10	1	14/9	—	21/9	—				5/10 12/10	40	✓
	2	"	—	"	—	28/9			5/10 12/10	"	—
	3	"	—	"	—	"			5/10 12/10	"	—
	4	"	—	"	—	"			5/10 12/10	"	—
43 II 1:20	1	17/10	—	24/10	—		14/11	+	17/11	20	✓
	2	"	—	"	—		"	+	"	"	+
	4	"	—	"	—	31/10	"	+	"	"	+
	4	"	—	"	—	"	"	+	"	"	+
43 II 1:30	1	17/10	—	24/10	—		14/11	+	17/11	20	✓
	2	"	—	"	—		"	+	17/11	20	+
	3	"	—	"	—	31/10	"	+	17/11		
	4	"	—	"	—	"	"	+	17/11		
48 1:15	1	17/10	—	24/10	—		14/11	±	17/11	20	✓
	2	"	—	"	—		"	±	17/11	20	+
	3	"	—	"	—	31/10	"	±	17/11		
	4	"	—	"	—	"	"	±	17/11		

TABEL VI

Pseudo-globulinen uit anatoxine N°. 45 II	Gavia N°.	1e injectie	reactie	2e injectie	reactie	3e injectie	reactie	Schick			dlm		
								datum	0	±	datum	aanstal	reactie
3 × geconcentreerd.	1	3/11	—	10/11	—	17/11	—	30/11		28/11	±	3/12	intercurrent
	2	"	—	"	—	"	—	"		19/11	±	40	intercurrent
	3	"	—	"	—	"	—	"	±		±	"	+
	4	"	—	"	—	"	—	"	±		±	"	+
	5	14/12	—	21/12	—	"	—	11/1	±		±	14/1	+
	6	"	—	"	—	28/12	—	"	+		±	"	+
	7	"	—	"	—	"	—	"	+		±	"	+
	8	"	—	"	—	"	—	"	—		—	"	+
	9	"	—	"	—	"	—	"	—		—	"	—
zelfde concentratie	1	3/11	—	10/11	—		—	30/11	±	±	±	3/12	+
	2	"	—	"	—	17/11	—	"	±	±	±	"	+
	3	"	—	"	—	"	—	"	—	—	—	"	—
	4	"	—	"	—	"	—	"	±	±	±	"	+

TABEL VII

Anatoxine N°.	Cavia N°.	1e injectie	reactie	2e injectie	reactie	3e injectie	reactie	dlm		
								datum	aantal	reactie
43 I licht toxisch	1	11/8	-	18/8	+	28/8	+			
	2	"	-	"	+	"	+			
	3	"	+	"	+		+			
	4	"	+	"	+		+			
	5	18/8	+							
	6	"	+	25/8	+					
	7	"	+	"	+					
43 I 1:10 licht toxisch	1	15/8	-	22/8	-	30/8	-	7/9	20	+
	2	"	-	"	-	"	-	14/9	40	-
	3	"	-	"	±			7/9	20	-
	4	"	-	"	±	2/9	±	7/9	"	-
	5	18/8	-	25/8	±	"	±	10/9	"	-
	6	"	-	"	±	"	±	10/9	"	-
	7	"	-	"	±	"	±	10/9	"	-
43 II atoxisch	1	28/8	-	5/9	-			17/9	40	-
	2	"	-	"	-			23/9	"	+
	3	"	-					12/9	"	+
	4	"	-					23/9	"	+
	5	"	-	"	-			17/9	"	+
	6	"	-	"	-			23/9	"	-

TABEL VIII

Per Os.	Gavia No.	1e gift	reactie	2e gift	reactie	3e gift	reactie	Schick			dlm		
								datum	o	v	datum	aantal	reactie
Toxine N ^o . 26 1:5	1	27/10	—	3/11	—		—	24/11	+	—	28/11	40	†
	2	"	—	"	—	10/11	—	"	+	—	"	—	
	3	"	—	"	—	"	—	"	—	—	"	40	++
	4	"											28/10 †
T. A. U.	5	"	—	"	—		—	"	+	—	"	—	
	6	"	—	"	—	"	—	"	+	—	"	40	†
Anatoxine 43 II 1:10	7	"	—	"	—		—	"	+	—	"	—	
	8	"	—	"	—		—	"	+	—	"	—	
	9	"	—	"	—	"	—	"	+	—	"	—	
	10	"	—	"	—	"	—	"	+	—	"	40	†

TABEL IX

N°. van het toxine of anatoxine	dlm van het toxine in mgr.	Temperatuur waarbij de re- actie geschiedde	Sterkte van het serum in A.E.	Hoeveelheid van het serum	
				in c.c.	in A.E.
45		37°	220	0.2	44
45	45	"	"	0.3	66
48	48	"	"	—	—
48	48	"	"	0.3	66
43	43	50°	"	0.6	132
43	43	"	"	0.6	132
49	49	"	"	0.3	66
49	49	"	"	0.3	66
51	51	"	"	0.25	55
52	52	"	"	0.45	99
26	26	"	"	0.6	132
26	26	37°	"	0.6	132
26	26	50°	"	0.6	132
26	26	55°	"	0.6	132

TABEL X

	Gavia No.	1e injectie	reactie	2e injectie	reactie	3e injectie	reactie	Schick			Schiek			dlm		
								datum	o	v	datum	o	v	datum	aantal	reactie
AA I	1	4/1	—	11/1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	25/1	† leverbot	
	2	"	—	"	—	18/1	—	—	—	—	—	18/2	40	25/1	† leverbot	
	3	"	—	"	—	"	—	—	—	—	—	"	"	21/2	† leverbot	
	4	"	—	"	—	"	—	—	—	—	—	"	"	21/2	† ?	
AA II	5	"	—	"	—	—	—	1/2	+	—	—	15/2	—	22/1	† intercurrent	
	6	"	—	"	—	18/1	—	"	+	—	—	"	40	+	+	
	7	"	—	"	—	"	—	"	+	—	—	"	"	21/2	† leverbot	
	8	"	—	"	—	"	—	"	+	—	—	"	"	22/1	† leverbot	
AA III	9	"	—	"	—	—	—	1/2	+	—	—	15/2	—	40	±	
	10	"	—	"	—	18/1	—	"	+	—	—	"	"	"	±	
	11	"	—	"	—	"	—	"	+	—	—	"	"	21/2	† leverbot	
	12	"	—	"	—	"	—	"	+	—	—	"	"	21/2	† leverbot	

INHOUD.

	Blz.
HOOFDSTUK I. Geschiedkundig overzicht	9
„ II. Wordt bij de bereiding van anatoxine de toxische werking weggenomen door formaline of door verwarmen?	31
„ III. Werken verdunningen van anatoxine voldoende immuniseerend?	39
„ IV. Is het mogelijk, anatoxine te bereiden, arm aan eiwitten, waardoor de aspecifieke reactie wordt verminderd, maar de antigeenwerking blijft behouden? . . .	43
„ V. Heeft zwak toxisch anatoxine een betere immuniseerende werking dan geheel atoxische anatoxine?	46
„ VI. Wordt de onvatbaarmakende werking van een anatoxine bepaald door de oorspronkelijke giftigheid van het toxine; staat zij dus in rechtstreeksch verband met de d.l.m.?	49
„ VII. Is immuniseeren per os mogelijk? . . .	51
„ VIII. Proeven omtrent de uitvlokkingsreactie van Ramon	52
„ IX. Proeven ter verkrijging van een eiwit-arm anatoxine, bereid uit het neerslag van Ramon	59
„ Samenvatting	65
„ Literatuuropgave	70
„ Tabellen	71

STELLINGEN.

I.

Serumbehandeling belemmert het ontstaan van actieve immuniteit.

II.

Met behulp van de reactie van Ramon is de sterkte (d.l.m.) van een toxine niet te bepalen.

III.

De encephalitis, die ontstaat na enting tegen pokken, berust niet op een neurotroop worden van het vaccinevirus.

IV.

De toediening door den mond van een waterige suspensie van adsorbeerende kool (carbo adsorbens) in voldoende hoeveelheden, verdient als eerste hulp bij vele vergiftigingen de voorrang en de voorkeur.

V.

Voor het stellen van de bacteriologische diagnose diphtherie, is virulentieonderzoek onmisbaar.



VI.

Bij keuring van beroepschauffeurs is het noodig, dat hun kleurenzin getoetst wordt.

VII.

Door sterilisatie van erfelijk belaste individuen neemt het aantal minderwaardigen slechts langzaam af.

VIII.

Bij de procedure met betrekking tot het onderzoek naar het vaderschap, heeft serologisch bloedonderzoek weinig waarde.

