



Bijdrage tot de kennis der serumbehandeling van diphtherie

<https://hdl.handle.net/1874/287178>

Aug. 1928. 1927

4 20 1928

**BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER
SERUMBEHANDELING VAN
DIPHtherIE**

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

R. FRANSSEN

ht

**BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER
SERUMBEHANDELING VAN
DIPHThERIE**

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK UTRECHT



3969 3787

Diss. Utrecht 1927

**BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER SERUM-
BEHANDELING VAN DIPHTHERIE**

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD
VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKS-
UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN
RECTOR MAGNIFICUS Dr. A. NOORDTZIJ, HOOG-
LEERAAR IN DE FACULTEIT DER GODGELEERDHEID,
VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSI-
TEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT
DER GENEESKUNDE, TE VERDEDIGEN OP D I N S D A G
15 M A A R T 1927, DES NAMIDDAGS TE VIER UUR,
DOOR RENÉ FRANSSEN, ARTS, GEBOREN TE
NIJMEGEN

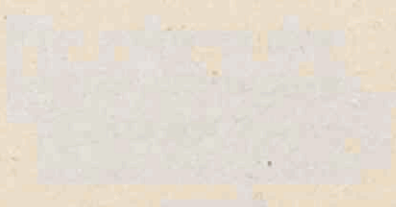
**BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.**

H. J. SMITS — UTRECHT — MCMXXVII

THE NEW YORK PUBLIC LIBRARY
ASTOR LENOX TILDEN FOUNDATION

THE NEW YORK PUBLIC LIBRARY
ASTOR LENOX TILDEN FOUNDATION
155 E. 42ND ST. NEW YORK 17, N.Y.
This book is loaned to you by the
New York Public Library
Astor Lenox Tilden Foundation
155 E. 42ND ST. NEW YORK 17, N.Y.
It is to be returned to the
New York Public Library
Astor Lenox Tilden Foundation
155 E. 42ND ST. NEW YORK 17, N.Y.

1955



NEW YORK PUBLIC LIBRARY

Jeunes gens, jeunes gens, dites vous d'abord: „Qu'ai je fait pour mon instruction?" Puis à mesure que vous avancerez: „Qu'ai je fait pour mon pays?" jusqu'au moment ou vous aurez peut-être cet immense bonheur de penser que vous avez contribué en quelque chose au progrès et au bien de l'humanité.

PASTEUR.

AAN MIJNE MOEDER

Bij het beëindigen mijner studie is het mij een behoefte U, Hoogleraren, Privaatdocenten en Lectoren der Philosophische- en Medische Faculteit der Utrechtsche Universiteit, benevens U, Klinische Hoogleraren der Gemeente-Universiteit van Amsterdam, te danken voor hetgeen Gij tot mijne vorming van medicus hebt bijgedragen.

Hooggeleerde Aldershoff, Hooggeschatte Promotor, U ben ik bijzonderen dank verschuldigd voor het voorrecht onder Uw leiding te hebben mogen werken. Ondanks Uw drukke werkzaamheden was het U nooit te veel om mij met Uw raad en critiek terzijde te staan. Gij kunt ervan verzekerd zijn, dat de tijd, in het Rijks Serologisch Instituut doorgebracht, mij steeds in waardevolle en aangename herinnering zal blijven.

Zeergeleerde Pondman en Collega Timmerman, U beiden dank ik voor de belangstelling en de raadgevingen, die ik bij mijn werk Uwerzijds mocht ontvangen.

Het personeel van het R. I. S. verdient zeker ook mijne erkentelijkheid voor de van hen ondervonden hulp.

INHOUD

	Blz.
Inleiding	1
Hoofdstuk I. Over de genezende werking van gezuiverd en ongezuiverd diphtherieserum	11
„ II. Over de voorbehoedende werking van gezuiverd en ongezuiverd diphtherieserum	21
„ III. Over de uitscheiding van gezuiverde en ongezuiverde diphtheriesera	23
„ IV. Over de genezende- en voorbehoedende werking van normaal antitoxinevrij paarde- serum	35
Slotsom	46
Résumé	48
Literatuuropgave	59
Tabellen	61

INLEIDING

In de laatste decenniën streven de verschillende serum-instituten in de meeste landen er naar diphtherie- en tetanusserum met hoogen titer te bereiden. Immers, hoe meer A.E. (antitoxine-eenheden) het serum per c.c. bezit, des te geringer kan ook de hoeveelheid zijn, die men moet inspuiten om de benoodigde hoeveelheid antitoxine toe te voeren. Door inspuiting van eene groote hoeveelheid vreemd serum het inspuiten van geringe hoeveelheden, vandaar dan ook wordt vaker „serumziekte” te voorschijn geroepen, dan bij de verklaarbare neiging, om het antitoxine-gehalte van het serum zoo hoog mogelijk op te voeren, teneinde de verschillende verschijnselen van primaire serumziekte en anaphylaxie zooveel mogelijk te beperken.

Dit kan worden bereikt door uit het serum de overtollige, niet antitoxinedragende eiwitten te verwijderen, waaraan desgewenscht concentratie van het serum kan worden verbonden. Is men de meening toegedaan, dat de genezende en voorbehoedende werking van het serum uitsluitend afhankelijk is van de hoeveelheid ingespoten antitoxine, dan verdient zeer zeker deze handelwijze aanbeveling. **Spronck** (1)¹⁾ zegt, dat dit juist zou zijn, als men van een homoloog serum gebruik maakte; aangezien echter bij menschen heterologe sera worden gebruikt, is, behalve de hoeveelheid antitoxine, ook de hoeveelheid vreemd eiwit als bijkomstige aspecifieke prikkel van belang.

Tijdens den oorlog rees de vraag, of men geen tetanusserum zou kunnen gebruiken, dat per c.c. minder dan 4 A.E.

¹⁾ Cijfers verwijzen naar de literatuurlijst.

bevat, hetgeen zeer veel in de hooge kosten zou schelen, die aan de bereiding van een vierwaardig tetanusserum verbonden zijn. In den oorlog werd het uitbreken van tetanus, dank zij de prophylactische inspuiting van 20 A.E., nagenoeg geheel voorkomen. Door een tekort aan tetanusserum van 4 A.E. per c.c. werd door de Duitsche regeering toen ook het gebruik van serum met 2 A.E. toegestaan, werd dus tijdelijk afgeweken van de wettelijk voorgeschreven minimum-titer, die in sommige landen voor enkele sera bestaat, en die in Duitschland voor tetanusserum minstens 4 A.E. per c.c., en voor diphtherieserum minstens 350 A.E. per c.c. moet bedragen.

F. Hamburger (2) heeft erop gewezen, dat af en toe na serumbehandeling bij tetanus, en in zeldzame gevallen ook bij diphtherie, die aanvankelijk met goed gevolg schenen te verlopen, op den vijfden tot den zevenden dag na de seruminjectie een exacerbatie der verschijnselen optreedt. Hij vond, dat, indien men hooge doses serum bij reeds uitgebroken klinische verschijnselen van tetanus toedient, in sommige gevallen de symptomen zich niet verder uitbreiden, de toestand dus eenige dagen stationnair blijft, totdat op den 5en tot op den 7en dag plotseling een verergering van den toestand optreedt, gevolgd door den dood. In zulke gevallen gelukte het echter af en toe, door herhaalde injectie van groote hoeveelheden antitoxine, den patiënt alsnog te redden. Hamburger kon hierbij twee verschijnselen opmerken:

1e. een stationnair blijven van den toestand na inspuiting van een groote hoeveelheid antitoxine bij reeds uitgebroken klinische verschijnselen, en

2e. een plotselinge verergering op den 5den tot den 7den dag na de injectie.

Hij verklaart dit uit hetgeen hij reeds vroeger gevonden had (3), dat n.l. de uitscheiding van het antitoxine parallel gaat met die van het vreemde eiwit, aangezien het antitoxine daaraan stevig is gebonden. Het vreemde eiwit, dus

ook het antitoxine, zou dus gewoonlijk 4—6 dagen in dezelfde hoeveelheid in het bloed aanwezig zijn, om dan op den vijfden tot zevenden dag plotseling belangrijk te verminderen, hetgeen dus de acute verergering van den toestand op deze tijdstippen zou kunnen verklaren. **Hamburger** raadde dan ook aan, om op den 5den, 6den en 7den dag na de eerste injectie wederom serum in te spuiten, in het geheel dus nog drie injecties, om op deze wijze de geregeld op den 5den tot 7den dag optredende vermindering van het antitoxine te verhinderen, en aldus een exacerbatie der klinische verschijnselen te voorkomen. Hij stelde voor, om den patiënt de eerste antitoxinehoeveelheid te geven tegelijk met een groote hoeveelheid normaal paardeserum, opdat de afweerkrachten van het organisme niet toereikend zouden zijn een groot gedeelte ervan te vernietigen, zoodat dan ook meer antitoxine in het lichaam achterblijft. **Hamburger** heeft ook experimenteel aangetoond, dat groote serumdoses gewoonlijk langer en in grootere hoeveelheden in het bloed blijven, dan dat bij kleinere doses het geval is, en hij zegt:

„Sollten sie sich als richtig erweisen, dann würde sich als eine andere praktische Folge ergeben, dasz man gerade Antitoxin mit niedrigem Titer zu dieser Behandlungs-Methode verwerten kann, ja soll“.

Spronck heeft eenige experimenten genomen, waaruit bleek, dat de opvatting van **Hamburger** de juiste zou zijn. Het langer in het bloed blijven circuleeren van paarde-eiwit bij het eene dan bij het andere individu, zou dus afhangen van de productie van antistoffen, die natuurlijk individueel verschillend is, en vervolgens van de hoeveelheid ingespoten paardeserum.

Om dit aan te toonen, deed **Spronck** nu het volgende experiment (4): Hij spoot twee nagenoeg even groote geiten in met 80 eenheden tetanusantitoxine, en wel zoodanig, dat de eene geit de 80 A.E. in 20 c.c. serum kreeg, de andere evenwel in 40 c.c. serum. Na 10 dagen vond **Spronck**

het serum van beide dieren in gelijke mate giftneutraliseerend werken; na 17, 24, en 31 dagen evenwel vond hij, dat steeds het serum van de tweede geit meer antitoxine bevatte, dan dat van de eerste geit, na 24 dagen zelfs tweemaal zooveel.

De volgende proef van **Spronck** (1) bewees nog meer de opvatting van **Hamburger**: Twee geiten werden resp. ingespoten met 80 A.E. in 20 c.c. paardeserum, en met 40 A.E. in 40 c.c. paardeserum. Na verloop van tien dagen, bleek, dat de eerste geit minder antitoxine in zijn bloed had dan de tweede geit, hoewel de eerste toch een tweemaal zoo groote hoeveelheid antitoxine-eenheden gekregen had dan de tweede. Klaarblijkelijk vernietigde dus elke geit dezelfde hoeveelheid paardeserum, met als gevolg, dat, aangezien de eene maal meer A.E. aan 1 c.c. serum gebonden was dan den anderen keer, er ook meer A.E. vernietigd werden. **Spronck** besluit nu uit deze proeven, dat het bij de voorbehoeding van tetanus eerder aanbeveling zou verdienen 10 c.c. van een tweevoudig serum te injecteeren, inplaats van 5 c.c. van een viervoudig serum. Zelfs zou hij in sommige gevallen aanbevelen, 20 c.c. van een éénwaardig serum in te spuiten.

Verder zegt **Spronck**, dat het gebruik van diphtherieserum met hoogen titer niet aan de verwachtingen heeft beantwoord, die men zich aanvankelijk ervan had voorgesteld; de resultaten in landen, waar men diphtherieserum van 200 A.E. per c.c. gebruikt, zijn ook in geen geval slechter te noemen, dan die in landen, waar men patiënten met diphtherieserum met hoogen titer behandelt.

Spronck raadt dan ook aan, om bij de behandeling van diphtherie, sera met lagen titer te gebruiken. Met het grootere gevaar van primaire serumziekte en misschien ook van anaphylaxie houdt **Spronck** dus blijkbaar geen rekening.

Zooals zoo juist is vermeld, heeft **Hamburger** beweerd, dat het tetanus-antitoxine den 5den tot 7den dag na de injectie een kritische vermindering ondergaat.

Hempl en Reymann (5) vonden dit niet in overeenstemming met de wijze, waarop de andere antitoxinen uit het bloed verdwijnen. Ze hebben toen hierover twee experimenten genomen, en vonden, dat het tetanus-antitoxine op precies gelijke wijze uit het bloed verdwijnt als de andere toegediende antitoxinen, dus in een kurve, die steeds meer de abscis-as nadert, zonder de kritische dalingen te vertoonen, die **Hamburger** aangaf. Ook vonden zij geen uitgesproken verschil in de uitscheiding tusschen sera met hoogen, of met lagen titer.

Marx, Berghaus, Brüstlein, Neufeld en Händel hebben geconstateerd, dat er een evenredigheid bestaat tusschen den antitoxischen titer van verschillende sera, en hunne uitwerking op de geïsoleerde toxine-injectie.

Kolle (6) heeft aangetoond, dat het vermogen tot neutraliseeren van toxine door een diphtherieserum, en de immuniseerende en curatieve werking ervan, 3 factoren zijn, die in nauwe betrekking tot elkaar staan, en wel dusdanig, dat de immuniseerende- en de curatieve werking van een serum recht evenredig is met zijn gehalte aan antitoxine-eenheden.

Kraus en Baecher vonden, dat men dieren na verloop van 8, 10 en 12 uur nog kan redden met zeer groote doses antitoxine, hetgeen voor de sera met hoogen titer zou pleiten. Verder hebben zij door experimenten aangetoond, dat het neutraliseeren van toxine in het organisme niet precies aan den titer van het serum beantwoordt.

Verder hebben verschillende onderzoekers, **Roux en Martin, Cruveillier, Marx, Kraus en Schwoner, Kolle en Schlossberger**, geconstateerd, dat men des te meer serum noodig heeft, hoe later men na de toxine-injectie ingrijpt.

Ook **Abt** (7) vraagt zich af, of alleen het aantal A.E. per c.c. van belang is, of wel de hoeveelheid ingespoten serum; in het laatste geval zou men dan serum met lagen titer moeten gebruiken.

Door hun experimenten hebben verder **Roux, Cruveillier,**

Kraus e.a. gevonden, dat de mortaliteit onafhankelijk is van de toegevoerde hoeveelheid antitoxine, en heeft **Reiche** dit-zelfde ook voor den mensch kunnen aantoonen bij een epidemie in Hamburg. Er zou dus volgens deze onderzoekers geen evenredigheid bestaan tusschen het antitoxine-gehalte van een serum, en zijn genezende en beschuttende werking.

Cruveillier (8) besluit eveneens uit zijn proeven, dat de werking van een serum niet uitsluitend afhankelijk is van zijn antitoxine-gehalte.

Verder is aan **Brokman** en **Sparrow** (9) gebleken, dat heterologe sera een ietwat minder goed resultaat gaven dan homologe sera, terwijl zij bovendien konden waarnemen, dat een serum met lagen titer beter door het organisme werd benut, dan dit met een serum met hoogen titer het geval was. Om den invloed van het vreemde eiwit uit te schakelen, mengden ze het in te spuiten serum van hoogen titer met normaal antitoxinevrij serum, en bleek hun, dat dit in het geheel geen invloed had. **Brokman** en **Sparrow** besluiten nu uit deze proeven, dat het noodzakelijk is, deze onderzoekingen op den mensch te vervolgen, om na te gaan, of de neiging om serum met hoogen titer te verkrijgen, niet sterk moet worden beperkt.

Sato (10) stelde zich de taak, om na te gaan, of dezelfde antitoxine hoeveelheid verschil in werking vertoont, al naarmate ze met meer of minder hoeveelheden serum wordt ingespoten. Hij spoot daartoe verschillende hoeveelheden serum in, die echter dezelfde hoeveelheid antitoxine bevatten. **Sato** gebruikte daarvoor het serum óf onverdund, óf, indien verdunnen noodzakelijk was, gebruikte hij daartoe normaal paardeserum, dat geen antitoxine bevatte, ten-einde de eiwitconcentratie niet te beïnvloeden. Bij zijne proeven, op caviae genomen, werd de werking van het serum nagegaan tegenover een diphtherie-infectie, door middel van inspuiting met levende diphtheriebacillen teweegebracht. Voor deze besmetting diende een bepaalde 48 uur

oude bouillon-cultuur, die na schudden gefiltreerd werd door steriel filtreerpapier; uit voorproeven was gebleken, dat 0.3 c.c. ervan een cavia van 200—300 Gram in $\pm 2\frac{1}{2}$ dag doodde. Als infectiedosis gebruikte hij nu voor zijne proeven, óf de dosis van 0.5 c.c., óf die van 0.7 c.c.

Sato besluit nu uit zijne proeven het volgende, n.l. dat hij een gelijke werking heeft gezien zoowel van de sera met hoogen, als van die met lagen titer; dat voor de therapeutische werking slechts de hoeveelheid antitoxine van belang is, en dat de grootere serumhoeveelheden geen aantoonbare voordeelen bieden. Ook de gunstige *genezende* werking van normaal paardeserum heeft Sato in zijn experimenten op caviae niet kunnen aantoonen. Over de *voorbehoedende* werking van normaal paardeserum zijn door hem geen proeven genomen.

Beslissend is dus slechts het antitoxinegehalte, en niet de serumhoeveelheid. Sato raadt dan ook aan, om voor de behandeling van diphtherie bij den mensch, sera met hoogen titer te gebruiken.

Alvorens deze korte inleiding te besluiten, leek het mij niet ongewenscht, nog een enkel woord over de „serum-ziekte” te zeggen, waaronder de verschillende verschijnselen gerekend worden, die kunnen optreden na het inspuiten van vreemd eiwit. De serumziekte nu kan af en toe optreden, kan lokaal, doch ook algemeen zijn (11). Lokaal ziet men op de plaats van injectie roodheid en zwelling, die zeer vroeg optreden, en na 24—36 uur weer verdwenen zijn; algemeene serumziekte treedt op onder het beeld van erythema multiforme en urticaria, hetgeen met koorts en pijn in de gewrichten gepaard kan gaan. Soms is het beeld veront-rustender, treden er verstikkingsverschijnselen en adem-nood op, verder oedemen en lymphklierzwellingen. Deze symptomen verdwijnen dikwijls echter even snel als ze gekomen zijn. Deze algemeene verschijnselen van serumziekte kunnen optreden 10—12 dagen na de injectie; bij patiënten die reeds eerder met een zelfde serumsoort zijn ingespoten,

en dus overgevoelig zijn geworden, treden de verschijnselen reeds na 6—7 dagen op, terwijl bij hen tevens het gevaar bestaat van een anaphylactische shock. Hoewel er in de heele literatuur slechts een zeer gering aantal gevallen van shock zijn beschreven, is het gevaar ervoor toch niet geheel en al uit te sluiten. Het organisme heeft dus ongeveer 10—12 dagen noodig om de anti-stoffen tegen het vreemde eiwit te bereiden, waarna de binding van beide de verschijnselen van de serumziekte te voorschijn roept. Ter voorkoming van anaphylactische verschijnselen bij reïnjectie is het doeltreffendste, óf om de methode door **Besredka** aangegeven te volgen, óf om serum, van een andere diersoort afkomstig, te gebruiken, zoogenaamd „anallergisch serum”.

De methode van **Besredka** berust op het inspuiten, vóór de reïnjectie van de groote gevaarlijke dosis, van een kleine hoeveelheid (0. 1 c.c.) van het heterologe serum, waardoor dan ongeveer een half uur later de reïnjectie geheel zonder gevaar zou verlopen.

Een analoge methode is door **Friedberger** en **Mita** aangegeven, om n.l. de reïnjectie zeer langzaam uit te voeren, waardoor hetzelfde resultaat wordt bereikt.

Gelukkig zijn er niet veel gevallen van serumziekte zoo ernstig als hierboven staat beschreven. Het woord „serumziekte” is toch een verzamelnaam voor alle verschijnselen, die na een seruminjectie kunnen optreden, en er wordt eveneens toegerekend een gering lokaal exantheem op de plaats van inspuiting, en eenige locale urticaria, kleine na-deelen die toch ruimschoots opwegen tegen het voordeel, dat de serumtherapie den patiënt geboden heeft.

Een statistiek over het voorkomen van serumexantheem gedurende de laatste 10 jaar uit de kinderkliniek van Düsseldorf van **Gierthmüller** (12) leert ons, dat van de 2772 kinderen, die met diphtherieserum werden behandeld, 10.2% een serumexantheem kregen.

Van hoe groot belang de persoonlijke beoordeeling van den clinicus is, blijkt wel, als men deze statistiek vergelijkt

met de volgende, van patiënten uit het Wilhelmina Gasthuis te Amsterdam, mij welwillend door Dr. Herderschee verstrekt. Van de 200 patiënten met 20—60 c.c. *ongezuiverd* diphtherieserum ingespoten, waren slechts 38 vrij gebleven van serumziekte = 19%. De overige 162, dus 81%, werden serumziek; ze kregen allen serum-exantheem, meestal urticaria; bovendien werd bij die 162 opgemerkt:

28 maal temperatuursverhooging;

9 maal gewrichtspijnen;

1 maal erythema iris; terwijl

1 na de intraveneuze injectie een shock kreeg.

Bij de met *door uitzouten gezuiverd serum* behandelde patiënten, werd echter in 156 gevallen: 74 maal geen, en 82 maal wel exantheem waargenomen = 53%, bovendien één keer gewrichtspijn; bij de 159 met *electro-osmotisch gezuiverd serum* behandelde patiënten: 90 maal geen, en 69 maal wel exantheem = 43%; ook hier één keer gewrichtspijn. Bij géén van beiden werd de zeer langdurige, hevige urticaria waargenomen van vroeger, toen het ongezuiverde serum werd gebruikt.

Uit het bovenstaande blijkt duidelijk, van hoe groot praktisch belang het zou zijn, indien de gezuiverde antitoxische sera gelijkwaardig bleken aan de ongezuiverde sera, wat hun genezende en voorbehoedende werking betreft. Door het toch zooveel mogelijk verwijderen van de vreemde eiwitlichamen uit het serum, zou de kans op serumziekte en anaphylaxie tot een minimum kunnen worden beperkt.

We zullen nu trachten om in de volgende hoofdstukken de gezuiverde- en ongezuiverde sera met elkaar te vergelijken, wat hun therapeutische- en prophylactische werking aangaat, en zullen tevens in het laatste hoofdstuk de genezende en voorbehoedende werking onderzoeken van het normale antitoxinevrij paardeserum, omdat, zooals uit de inleiding wel reeds is gebleken, de meeningen over dit onderwerp nog erg zijn verdeeld.

We mogen natuurlijk niet van het diphtherieserum ver-

wachten, dat het tot alles in staat is, en elke diphtheriepatiënt kan genezen. Want zooals **Cruveillier** (13) reeds gevonden heeft, helpt het antitoxine na eenigen tijd niet meer. Eveneens heeft **Herderschee** (14) aangetoond, dat, indien de diphtherie-patiënten bij inkomst in de kliniek direct met specifiek serum werden ingespoten, de letalitet = 0 was, terwijl het percentage van het aantal sterfgevallen steeg, al naarmate men den 2den, 3den of 4den ziektedag met de serumbehandeling aanving.

Kleinschmidt zegt dan ook zeer terecht van het antitoxische diphtherieserum: (15)

„Ihrer Wirksamkeit sind Grenzen gezogen, sobald eine feste Verankerung des Toxins an grösseren Zellcomplexen stattgefunden hat. Es ist kein Heilmittel im engeren Sinne, sondern ein Schutzmittel“.

HOOFDSTUK I.

Over de genezende werking van gezuiverd- en ongezuiverd diphtherieserum.

De taak, die wij ons in dit hoofdstuk hebben gesteld, was na te gaan, of in dierproeven een verschil in genezende werking tusschen gezuiverd- en ongezuiverd diphtherieserum is aan te toonen. Zoo ja, om verder uit te maken, of in alle gevallen een der beide serumsoorten de voorkeur verdient, of dat, al naar omstandigheden, het gebruik van een der beide is aangewezen.

De proeven werden genomen op caviae van een lichaams-gewicht van 400—600 Gram.

Voor de besmetting diende een 48 uur oude diphtherie-bouilloncultuur van een stam uit Leiden, die ook steeds geregeld om de 2—3 dagen op een verschen voedingsbodem van Löffler werd overgeënt. In tegenstelling met de proeven van Sato (9) werd de 48 uur oude bouilloncultuur niet gefiltreerd, daar mij gebleken was, dat zelfs een dosis van 2 c.c. van de door papier gefiltreerde bouilloncultuur, slechts in staat was een lokaal infiltraat te voorschijn te roepen en een cavia pas na 11 dagen deed sterven.

Uit voorproeven is nu gebleken, dat 0.5 c.c. van de ongefiltreerde 48 uur oude bouilloncultuur in staat is, een cavia van ongeveer 400 Gram in 2 dagen te dooden, terwijl 0.7 c.c. een cavia in 1 dag deed sterven.

Als infectiedosis hebben we nu voor de proeven de dosis van 0.5 c.c. genomen, voor eenige experimenten de dosis van 0.7 c.c.

In alle proeven is gebruik gemaakt van de door het R.S.I. in den handel gebrachte sera. In de eerstvolgende proef-

reeksen is ongezuiverd natief serum gebruikt dat 300 A.E. per c.c., en gezuiverd serum, dat 1200 A.E. per c.c. bevat. Er werd steeds in gelijke volumina vloeistof ingespoten, en wel zóó, dat 2 c.c. van de in te spuiten vloeistof 200 A.E. bevatten. Daartoe werd het ongezuiverde serum met normaal paardeserum verdund, het gezuiverde serum daarentegen met een physiologische keukenzoutoplossing, en wel steeds zóódanig, dat in beide gevallen 200 A.E. in een totaal volume van 2 c.c. aanwezig waren.

In onze proeven hebben we dus 3 factoren in de hand:

- 1e. de dosis van infectie;
- 2e. den tijdsduur, gelegen tusschen uur van infectie en het oogenblik van serumtoediening;
- 3e. de hoeveelheid in te spuiten serum. Als 4e factor kan men ook aannemen de individueele dispositie van een levend organisme tegenover een optredende infectie, maar hiertegenover staan wij machteloos. Alleen door een zeer groot aantal proefdieren te nemen, zou men dezen laatsten factor kunnen uitschakelen.

In de *eerste proefreeks* (zie tabel I) hebben wij 4 caviae met de dosis van 0.5 c.c. onderhuids besmet, en 6 uur daarna twee caviae ingespoten met 200 A.E. ongezuiverd serum, de andere twee met 200 A.E. gezuiverd serum. Een verschil in werking tusschen beide sera is hier niet waar te nemen.

In een *tweede proefreeks* (zie tabel II) hebben wij op dezelfde wijze gehandeld, alleen hier den tijdsduur tusschen infectie en serumtoediening van 6 op 10 uur gebracht.

Het blijkt, dat een der caviae, die met gezuiverd serum behandeld is, na twee dagen is gestorven, terwijl de overige er het leven afbrengen, behoudens een lokaal infiltraat. Dit zou iets in het voordeel van het ongezuiverde serum pleiten.

De *derde proefreeks* (tabel III) was gelijk aan de voorgaande, doch hier is eerst na 12 uur het serum ingespoten.

Hier zien wij, dat alle proefdieren sterven, en wel op

den tweeden en derden dag. Het gezuiverde serum schijnt hier bij een der dieren het ziekteverloop ietwat vertraagd te hebben, doch mag men bij het betrekkelijk gering aantal caviae, dat gebruikt werd, hieruit nog geen gevolgtrekking maken, daar toch, zooals reeds eerder gezegd is, de individuele dispositie een belangrijke factor is.

Aangezien wij 12 uur na de infectie de dieren met 200 A.E. zoowel van gezuiverd- als van ongezuiverd serum niet meer konden redden, hebben wij in de *vierde proefreeks* (tabel IV) nagegaan, of zeer groote doses serum daartoe nog wel in staat zouden blijken te zijn. Hiertoe spoten we de caviae, die op dezelfde wijze geïnfecteerd waren als in de vorige proefreeksen, 12 uur na de infectie in met 900 A.E., in een totaal volume van 3 c.c. Van het ongezuiverde serum werden 3 c.c. genomen, die ieder 300 A.E. per c.c. bevatten; van het gezuiverde werd serum gebruikt, dat een sterkte had van 600 A.E. per c.c., en dit werd verdund met gelijke hoeveelheden physiologische keukenzoutoplossing, zoodat 3 c.c. hiervan 900 A.E. bevatten.

We zien hier, dat we 12 uur na het tijdstip van infectie, zelfs met hooge doses serum, niet meer in staat zijn, de caviae te redden. Wel zou deze proefreeks een weinig voor het ongezuiverde serum kunnen pleiten, daar na 7 dagen een der met ongezuiverd serum behandelde caviae pas stierf; bij de sectie werd, behalve eenige diphtherische verschijnselen, een uitgebreide distomatosis gevonden.

Uit de bovenvermelde proeven blijkt dus duidelijk, dat de factor tijd de voornaamste is. Na 10 uur zijn de dieren nog te redden, na 12 uur echter niet meer, niettegenstaande de groote dosis serum, die werd ingespoten,

De tijd, dien men dus laat verlopen, alvorens met de serumtherapie aan te vangen, is niet meer in te halen, al spuit men nog zoo groote hoeveelheden in.

In de volgende proefreeksen hebben wij de infectiedosis verhoogd, en de dieren met 0.7 c.c. van de ongefiltreerde 48 uur oude bouilloncultuur besmet, een dosis, die, zooals

reeds is gezegd, een cavia in één dag doodt.

In de *vijfde proefreeks* (tabel V) hebben we nu 6 uur na de infectie 900 A.E. ingespoten, in een totaal volume van 3 c.c., evenals in de vierde proefreeks is vermeld.

We zagen hier geen verschil in werking tusschen het gezuiverde- en het ongezuiverde serum; alle proefdieren bleven in leven.

Om te zien of wij bij inspuiten van een kleinere hoeveelheid A.E. wellicht verschil tusschen de beide sera zouden kunnen waarnemen, hebben wij in de *zesde proefreeks*, die analoog is met de vorige, 200 A.E. inplaats van 900 A.E. ingespoten. Ook hier bleven alle dieren in leven, zooals men ook uit tabel VI kan zien.

In de *zevende proefreeks* (tabel VII) hebben we de caviae, na infectie met 0.7 c.c. van dezelfde 48 uur oude bouillon-cultuur, ingespoten met 200 A.E., 10 uur na het tijdstip van infectie.

We zien hier, dat de beide dieren, die met gezuiverd serum zijn behandeld, sterven, dat een der met ongezuiverd serum behandelde caviae in leven blijft, terwijl zijn lotgenoot bezwijkt. Bij deze laatste werd evenwel bij de sectie, behalve verschijnselen van diptherie, ook distomatosis gevonden.

Vervolgens hebben wij nagegaan, of met een grootere hoeveelheid antitoxine de dieren gered hadden kunnen worden, die in de vorige proefreeks waren gestorven. Daartoe hebben we in de *achtste proefreeks* (tabel VIII), welke overigens geheel analoog is met de zevende, 900 A.E. ingespoten, inplaats van 200 A.E.

Merkwaardig is hier, dat de beide met gezuiverd serum behandelde dieren sterven, terwijl de twee met ongezuiverd serum ingespoten caviae er het leven afbrengen. Deze proefreeks zou dus in het voordeel van het ongezuiverde serum uitgevallen zijn.

Aldus werkende, rees het bezwaar, dat, daar het toch wellicht gaat om kleine hoeveelheden antitoxine, die den

doorslag kunnen geven van het eventueele therapeutische succes, we toch niet absoluut nauwkeurig wisten, hoeveel A.E. we inspotten, daar de door het R.S.I. in den handel gebrachte sera, *minstens* het opgegeven aantal A.E. per c.c. bevatten, en het er in sommige gevallen niet onbelangrijk boven is. We hebben nu het gezuiverde serum, waarmede verder gewerkt is, nauwkeurig getitreerd, en gevonden, dat dit 520 A.E. per c.c. sterk was, terwijl de aangegeven sterkte 500 A.E. bedroeg. Het ongezuiverde serum had een aangegeven sterkte van 300 A.E. per c.c., en bleek bij juiste titratie 340 A.E. per c.c. te bevatten.

Deze titraties geschieden steeds op dezelfde wijze. Van het te titreeren serum worden verschillende verdunnigen gemaakt, zóó, dat 1 c.c. ervan 1 A.E. bevat. Hieraan wordt toegevoegd de L† van het Toxine No. 26, die 0.26 c.c. bedraagt. (De L† is die toxinedosis, welke, met 1 A.E. gemengd, nog juist 1 d.l.m. overlaat, zoodat een cavia van 250 Gram in 4 dagen er aan bezwijkt). Daar steeds voor de titratie in een totaal volume van 4 c.c. wordt ingespoten, wordt aan bovengenoemd mengsel nog 2.74 c.c. physiologische keukenzoutoplossing toegevoegd.

Van deze nu precies getitreerde sera hebben wij oplossingen gemaakt, zoodat 1 c.c. ervan 200 A.E. bevat. Ook hier is het ongezuiverde serum met normaal paardeserum, en het gezuiverde serum met physiologische keukenzoutoplossing verdund. Er werd dus weer in gelijke volumina ingespoten.

Met deze nieuwe seraverdunningen zijn de tweede, derde, vierde, zevende en achtste proefreeks herhaald (zie tabel IIa, IIIa, IVa, VIIa en VIIIa), en zien we nu het volgende. Tusschen de eerste acht beschreven proefreeksen en de nu volgende waren 8 maanden verlopen. In dien tijd werd geregeld om de 2 à 3 dagen de diphtheriestam (Leiden) op een verschen voedingsbodem van Löffler overgeënt, waardoor, zooals blijken zal, de virulentie van deze cultuur veel en veel sterker geworden is.

Het duidelijkst blijkt dit uit *proefreeks IIa*, alwaar alle caviae na één dag reeds sterven.

In *proefreeks IIIa*, krijgen we een vrijwel analoog resultaat als in de derde proefreeks, doch ook hier blijkt de grootere virulentie van de cultuur, daar de proefdieren alle eerder sterven, dan in het 8 maanden vooraf genomen experiment.

Een vrijwel gelijk resultaat krijgen we in *proefreeks IVa*, d.w.z., een eerder bezwijken van de caviae aan de hun toegebrachte infectie, dan in de vierde proefreeks, doch wij kunnen hier geen betere werking van het gezuiverde dan van het ongezuiverde serum waarnemen.

In *proefreeks VIIa* zien wij, dat een der met ongezuiverd serum behandelde dieren de hem toegebrachte infectie doorstaat, terwijl zijn lotgenoot, benevens de twee met gezuiverd serum ingespoten caviae, sterven.

Dit resultaat komt dus vrijwel overeen met dat, verkregen uit de zevende proefreeks, doch hier zijn natuurlijk evenmin als bij de andere experimenten, individueele factoren uit te sluiten. Het beste blijkt dit, als men proefreeks IIa en VIIa met elkaar vergelijkt; in beide gevallen werd 10 uur na de infectie een gelijke hoeveelheid serum ingespoten, n.l. 200 A.E., en zien we, dat bij een geringe infectiedosis (0.5 c.c.) alle proefdieren na 24 uur sterven, terwijl bij een veel sterkere infectie (0.7 c.c.) twee dieren langer in leven blijven, n.l. resp. 2 en 3 dagen, terwijl één zelfs de infectie geheel doorstaat.

In *proefreeks VIIIa* zien wij alle proefdieren sterven, en wel één den eersten dag, en de twee overige den tweeden dag. Wel merkwaardig is het verschil in resultaat tusschen proefreeks VIII en VIIIa, daar er slechts 14 dagen tusschen verlopen zijn. Wellicht is dus het in leven blijven van de twee met ongezuiverd serum behandelde dieren in proefreeks VIII aan hunne individueele dispositie toe te schrijven; het zou toch voorbarig zijn, om uit deze twee proefreeksen een conclusie te trekken, ten voordeele van het ongezuiverde serum.

Aangezien uit de voorgaande experimenten bleek, dat door het herhaalde overenten de cultuur veel virulenter geworden was, hebben we deze opnieuw getitreerd, en bleek nu, dat een dosis van 0.2 c.c. van een 48 uur oude diphtherie bouilloncultuur (Leiden) een cavia van c.a. 500 Gram in zeven dagen doodde, terwijl een dosis van 0.3 c.c. een cavia van gelijk gewicht in twee dagen deed sterven. De dosis van 0.3 c.c. zou dus even sterk zijn als die van 0.5 c.c. acht maanden geleden.

Om dit na te gaan, hebben we in een *negende proefreeks* (tabel IX) 8 caviae geïnfecteerd met 0.3 c.c. van een 48 uur oude bouilloncultuur, en deze dieren 10 uur later 900 A.E. ingespoten, en wel, 4 caviae met ongezuiverd, de andere 4 met gezuiverd serum. Was deze dosis van infectie gelijk aan die in de tweede proefreeks, dan zouden we een analoog resultaat verwachten. We zien echter, dat zeven dieren den tweeden dag sterven, terwijl één der met ongezuiverd serum behandelde caviae, de infectie doorstaat.

Uit deze proef kunnen we dus besluiten, dat, door het geregeld overenten van dezen diphtheriestam om de 2 à 3 dagen op een verschen voedingsbodem van Löffler, niet alleen de virulentie van de cultuur veel sterker geworden is, hetgeen hieruit blijkt, dat een veel geringere dosis van de cultuur noodig is om een cavia in twee dagen te doden, dan voor acht maanden het geval was, doch dat ook blijkbaar de aviditeit van het toxine voor de specifieke lichaamszellen zooveel sterker geworden is, dat zelfs zeer groote doses serum, 10 uur na het oogenblik van infectie, de dieren niet meer kunnen redden, hetgeen toch wel gelukte, toen die cultuur nog jong was en nog niet herhaaldelijk was overgeënt.

Door het virulenter worden van de cultuur is dus de tijdsduur, dien men kan laten verlopen, alvorens met de serumtherapie aan te vangen, wil men de dieren nog redden, veel kleiner geworden, en van 10 op 6 uur gekomen.

Zooals reeds gezegd is, kunnen we de dieren nog redden,

indien 6 uur na het oogenblik van infectie met de serumtoediening begonnen wordt. In de volgende proeven hebben we nu nagegaan, hoeveel antitoxine-eenheden noodig zijn, om de caviae, 6 uur nadat ze geïnfecteerd zijn, met 0.5 c.c. van dezelfde 48 uur oude bouilloncultuur van den Leidschen stam nog te redden.

Daartoe namen we hetzelfde ongezuiverde diphtherieserum, dat bij de voorgaande proeven ook gebruikt is, 340 A.E. per c.c. bevattende, en verdunden dit met een physiologische keukenzoutoplossing dusdanig, dat we verdunningen verkregen, waarvan 1 c.c. resp. 50 A.E., 25 A.E. en 15 A.E. bevatte.

Op analoge wijze maakten we gelijke verdunningen van dezelfde sterkte, uitgaande van het reeds door ons gebruikte gezuiverde serum, dat 520 A.E. per c.c. bevat.

In tabel X zien we nu het volgende: De infectiedosis was bij alle caviae gelijk, n.l. 0.5 c.c., en het blijkt, dat 6 uur na de infectie, 25 A.E., evengoed als 50 A.E., de proefdieren kunnen redden, zoowel wat het gezuiverde- als het ongezuiverde serum aangaat. Behoudens een gering infiltraat op de plaats van inspuiting, reageerden de caviae nagenoeg niet op de hun toegebrachte infectie.

Anders is het evenwel, indien we de caviae 6 uur na de infectie, 1 c.c. inspuiten, die 15 A.E. bevat. Beide dieren krijgen hier een heel groot hard infiltraat, dat bij het met gezuiverd serum behandelde dier in nekrose overgaat. De cavia, die we 15 A.E. van het ongezuiverde serum inspoten, sterft den zevenden dag, terwijl de met gezuiverd serum ingespoten cavia er het leven afbrengt, doch na verloop van twee weken paralytisch geworden is.

Met deze 15 A.E. hebben we dus de grensdosis bereikt, waarbij het met deze cultuur onder deze omstandigheden mogelijk is, het proefdier al of niet te redden, waarbij echter steeds de individueele dispositie van het proefdier een rol zal blijven spelen.

Merkwaardig is wel, dat, terwijl 15 antitoxine-eenheden

een cavia nog kunnen redden, na een infectie van 0.5 c.c. van een 48 uur oude bouilloncultuur, indien deze 6 uur na de infectie worden ingespoten, een dosis van zelfs 900 A.E. dit niet meer kan, indien men 4 uur langer wacht, alvorens het reddende antitoxine toe te dienen, niettegenstaande in het laatste geval de infectiedosis 0.3 c.c. bedroeg. In dien korten tijdsduur is het toxine dus zoo vast verankerd aan de specifieke cellen van het organisme, dat zelfs 900 A.E. er machteloos tegenover staan.

We hebben verder nagegaan, hoeveel antitoxine-eenheden noodig zijn, om een cavia te redden van 0.5 c.c. van een 48 uur oude bouilloncultuur, indien het antitoxine op het oogenblik van de infectie wordt toegediend. De verschillende verdunningen werden weer met physiologische keukenzoutoplossing verkregen, en we gingen weer uit, wat het ongezuiverde serum betreft, van het serum, dat 340 A.E. per c.c. sterk was, en wat het gezuiverde serum aangaat van het serum, dat 520 A.E. per c.c. bevatte. De cultuur en het serum werden steeds gescheiden ingespoten, en wel zóó, dat b.v. de cultuurdosis rechts en het serum links van de cavia onderhuids werd geïnjecteerd.

Spoten we op het oogenblik van infectie 1 c.c. in, die resp. 10 A.E. en 5 A.E. bevatte, dan doorstonden de proefdieren deze infectie heel gemakkelijk, behoudens een meer of minder sterk plaatselijk infiltraat. Injiceerden we tegelijkertijd 1 c.c. die $2\frac{1}{2}$ A.E. sterk was, dan werden de dieren erg ziek; was het infiltraat veel grooter, zoo trad zelfs nekrose op, maar bleven de dieren in leven. Spuiten we echter tegelijkertijd 1 c.c. in, die slechts 1 A.E. bevat, dan zien we beide dieren sterven, en wel de met ongezuiverd serum behandeld cavia na twee dagen, en de met gezuiverd serum ingespotene na een week. (tabel XI).

De grensdosis, die nog juist in staat kan zijn de dieren te redden, is dus hier $2\frac{1}{2}$ A.E., waarbij weer de individueele dispositie een rol zal spelen, en het deze laatste factor zal zijn, die het al of niet in leven blijven van het proefdier kan

beïnvloeden. Verschil in werking tusschen het gezuiverde en het ongezuiverde serum, kunnen we in deze proeven feitelijk niet aantoonen; we zouden dit eigenlijk ook niet mogen aannemen, daar in deze sterke verdunningen met een physiologische keukenzoutoplossing de factor van het vreemde eiwit wel practisch tot nul zal zijn gereduceerd. We hebben toch in het laatste experiment in beide gevallen met door keukenzoutoplossing verdund serum gewerkt; wat het gezuiverde serum betreft, 1 c.c. serum op 519 c.c., en wat het ongezuiverde serum aangaat, 1 c.c. serum op 339 c.c. van een physiologische keukenzoutoplossing.

Uit de in dit hoofdstuk beschreven proeven kunnen we het volgende besluiten:

1e. We zien een vrijwel gelijke werking van het gezuiverde als van het ongezuiverde serum; voor de therapeutische werking is slechts de hoeveelheid antitoxine van belang en niet de grootere hoeveelheid vreemd eiwit.

Voor therapeutische doeleinden zal dus bij diphtherie, ook bij den mensch, het gebruik van gezuiverd serum aan te bevelen zijn, daar toch op deze wijze de verschijnselen van „Serumziekte” niet onbelangrijk beperkt zullen worden.

2e. De Serum-therapie moet zoo vroeg mogelijk worden ingesteld, daar de tijd dien men laat verloopen, niet meer is in te halen, zelfs niet met zeer groote hoeveelheden antitoxine.

3e. Hoe virulenter de cultuur, d.w.z. hoe grooter de productie van toxine, des te kleiner is de tijdsduur, dien men tot zijn beschikking heeft, om het dier te redden. Zelfs groote hoeveelheden antitoxine zullen dan niet meer baten, daar te veel cellen, gewichtig voor het leven, door het toxine blijvend zijn beschadigd.

HOOFDSTUK II

Over de voorbehoedende werking van gezuiverd en ongezuiverd diphtherie-serum.

Vier caviae, van 400—600 Gram lichaamsgewicht, werden ingespoten met 200 A.E. aanwezig in een volume van 2 c.c. We gebruikten ongezuiverd serum, dat een titer had van 300 A. E. per c.c., waarvan, met behulp van normaal paardeserum een dusdanige verdunning werd gemaakt, dat de toe te dienen 200 A. E. in 2 c.c. aanwezig waren. Van het gezuiverde serum, dat 1200 A. E. per c.c. sterk was, hebben we een even sterke verdunning gemaakt, doch thans met behulp van physiologische keukenzoutoplossing. Van de vier dieren zijn er twee met 200 A. E. van de verdunning van ongezuiverd serum onderhuids ingespoten, de beide andere met 200 A.E. van de verdunning van gezuiverd serum. Na zeven dagen zijn twee dieren, van elke groep één, ingespoten met 0.5 c.c. van de 48 uur oude diphtheriecultuur, een hoeveelheid waardoor een cavia na twee dagen sterft.

We zien (tabel XII), dat deze beide dieren, zeven dagen na de serum-inspuiting geïnfecteerd, de besmetting heel goed doorstaan, en dat het op de inspuitingsplaats optredende infiltraat zeer gering is.

Veertien dagen na de inspuiting van 200 A.E. sterven echter de beide andere dieren, door infectie met 0.5 c.c. cultuur, na twee dagen; het hun voor twee weken ingespoten antitoxische serum oefende dus in het geheel geen beschuttende werking meer uit, gaf zelfs geen vertraging van het ziekteproces.

Dit komt overeen met wat we omtrent de uitscheiding van gezuiverd en ongezuiverd serum bij de cavia hebben gevonden, zooals in het volgende hoofdstuk zal worden beschreven. Na 14 dagen konden we in beide gevallen in het bloed per c.c. minder aantoonen dan $2/125$ A.E. Stel-

len we de bloedhoeveelheid van een cavia op ± 30 c.c., dan zou het dier na 14 dagen minder dan 0.48 A.E. in het organisme hebben, te weinig om de hem toegebrachte infectie te doorstaan. Uit de proeven, in het eerste hoofdstuk beschreven, is toch gebleken, dat minstens 1 A.E., ja meestal zelfs $2\frac{1}{2}$ A.E. noodig zijn, om het dier tegen de infectie van 0.5 c.c. te beschermen.

De prophylactische werking van gezuiverd zoowel als van ongezuiverd diphtherieserum houdt dus nauw verband met hare uitscheiding.

We hebben deze proef een weinig gewijzigd herhaald. Daartoe hebben we vier caviae geïnfecteerd met 0.5 c.c. van een door papier gefiltreerde 48 uur oude diphtheriecultuur (Leidsche stam); hebben deze dieren dus heel licht besmet (2 c.c. van deze gefiltreerde cultuur doodt immers een cavia pas na elf dagen). Na verloop van 10 uur zijn de caviae ingespoten met 200 A.E. ongezuiverd serum, waarbij de serumverduunning is gebruikt, zooals hierboven reeds is beschreven. Na 6, 9, 11 en 13 dagen hebben we telkens een der dieren opnieuw geïnfecteerd, doch nu met een dosis van 0.5 c.c. van de ongefiltreerde 48 uur oude bouilloncultuur. We zien dan, dat de cavia, die 13 dagen na de voorbehandeling (infectie + serum) is geïnfecteerd, na vijf dagen sterft. De overige dieren vertoonden, óf in het geheel geen, óf een gering, óf een matig infiltraat, al naar gelang ze 6, 9 of 11 dagen na de voorbehandeling werden besmet, zooals ook uit tabel XIII te zien is.

We krijgen bij deze beide proeven dus een nagenoeg gelijk resultaat, en het blijkt dus, dat 14 dagen nadat een cavia 200 A.E. is toegediend, het dier de infectiedosis van 0.5 c.c. niet meer kan doorstaan, hetgeen dus overeenstemt met wat over de uitscheiding der sera hierboven reeds is vermeld.

Bij deze laatste proef kunnen we de caviae ook beschouwen als kinderen, die licht zijn geïnfecteerd en een dosis serum hebben gekregen. Op bovenvermelde wijze hebben

we eenigszins kunnen nagaan, hoelang de passieve immuniteit, onder deze omstandigheden, blijft nawerken.

Uit deze proeven hebben we geen verschil in voorbehoedende werking tusschen gezuiverd- en ongezuiverd-diphtherieserum kunnen aantonen.

Hetgeen we hieruit kunnen besluiten, zal in het vierde hoofdstuk worden uiteengezet, waarin o.a. ook de prophylactische werking van normaal antitoxinevrij paardeserum is nagegaan.

HOOFDSTUK III.

Over de uitscheiding van gezuiverde en ongezuiverde diphtheriesera.

Dit hoofdstuk is gewijd aan de vraag of na inspuiting van verschillende gezuiverde en ongezuiverde sera verschillen zijn waar te nemen, wat betreft de tijd van uitscheiding en het gehalte aan antitoxine in het bloed, tijdens dien uitscheidingstijd. Het is toch zoowel voor de voorbehoedende, als voor de genezende werking van antitoxisch serum van groote beteekenis, of, en hoe lang, in bloed- en lichaamsvochten nog een gehalte aan antitoxine van eenige beteekenis aanwezig is. Aangezien het wel steeds om het aantonen van betrekkelijk geringe hoeveelheden antitoxine gaat, hebben we voor het aantonen daarvan gebruik gemaakt van de intracutane methode van **Römer**, waarmee de nekrotiseerende werking van uiterst kleine hoeveelheden diphtherietoxine, zelfs tot 1/500 d.l.m., nog is aan te toonen, terwijl deze methode tevens het groote voordeel heeft, dat dezelfde cavia voor verscheidene titreeringen is te gebruiken.

De cavia wordt aan de zijken van den buik onthaard; als hoeveelheid der te onderzoeken mengsels van toxine

en antitoxine werd steeds 0,1 c.c. genomen. Bevat het mengsel vrij, niet door antitoxine gebonden toxine, dan ontstaat op de plaats van inspuiting een kleine kwaddel, die geruimen tijd zichtbaar blijft. Binnen 24 uur ontwikkelt zich de reactie als roodheid en infiltratie, en is deze reactie na 48 uur nog duidelijker. Op den 3den—4den dag ontstaat op de plaats van inspuiting een meer of minder sterke nekrose, die onder korstvorming geneest.

Römer (16) kon door middel van de intracutane inspuiting van diphtherietoxine nog 1/500 van de subcutane d.l.m. aantoonen.

Om geringe hoeveelheden antitoxine aan te toonen, gebruikte **Römer** (17) diphtherietoxine „Ballon 7", waarvan de geringste intracutaan werkzame dosis 0.00001 c.c. bedroeg. Hij spoot steeds een totaal volume van 0,1 c.c. in, en wel zóódanig, dat de betreffende toxinedosis in 0,05 c.c., en de daaraan beantwoordende antitoxinedosis eveneens in 0,05 c.c. aanwezig was. Van de toxine- en antitoxineverduunningen nam hij dan gelijke deelen, in den regel 1 c.c. toxineverduunning + 1 c.c. antitoxineverduunning, liet dit mengsel gedurende 2 uur bij 37° staan, daarna nog 22 uur in de ijskast, en vervolgens weer gedurende 15 minuten bij 37°. Hij koos dezen langen bindingstijd, omdat hij meende, dat bij deze sterke verduunningen de binding tusschen toxine en antitoxine minder snel tot stand zou komen.

Römer bepaalde eerst de antitoxine-hoeveelheid, die noodig was, om het 20-voudige minimum, in casu 0,0002 c.c. toxine te neutraliseeren, en vond, dat 1/2000 A.E. in zóóverre de werking van het toxine ophief, dat er nog juist een spoor locaaleffect te bespeuren was, dat dus in het mengsel één vrije dosis necroticans minima (d.n.m.) aanwezig was, in welk geval wij in den vervolge van neutraliseeren van het mengsel zullen spreken. Hem bleek reeds, dat men gelijktijdig meerdere reacties op hetzelfde dier kan uitvoeren, telkens met gelijk resultaat.

Daarna zocht **Römer** naar de antitoxinedosis, die de werking van 0,00001 c.c. diphtherietoxine „Ballon 7" neutraliseert, en bleek dit 1/40.000 A.E. te zijn, terwijl 1/100.000 A.E. reeds eene beïnvloeding van het diphtherietoxine tengevolge had.

Het bleek, dat de neutraliseerende werking ook in deze kleine hoeveelheden de wet der multiple proporties volgt, immers:

0,0002 c.c. van dit diphtherietoxine wordt geneutraliseerd door 1/2.000 A.E., en

0,00001 c.c. van dit diphtherietoxine wordt geneutraliseerd door 1/40.000 A.E.

In de hieronder te beschrijven proeven hebben we de reactie van **Römer** als volgt toegepast:

We zijn uitgegaan van een standaardtoxine, dat in het R.S.I. voorhanden was, het Toxine No. 26. Dit testtoxine heeft een d.l.m. van 4 m. Gr. In 0,0001 c.c. = 1/10 m. Gr. van dit toxine, is dus aanwezig 1/40 d.l.m. De caviae werden vooraf voorzichtig geschoren, en steeds werden volumina van 0,1 c.c. intracutaan ingespoten. Daartoe werd een huidplooï opgenomen en een dunne canule nagenoeg horizontaal zóóver ingebracht, dat de opening juist onder de huidoppervlakte verdwenen is. Bij het nu langzaam inspuiten ziet men een kleine erwtgrootte kwaddel ontstaan, die niet weggestreken wordt.

Vooraf hebben we de geringste hoeveelheid van het testtoxine, aanwezig in een volume van 0,1 c.c. die nog juist een geringe reactie gaf, bepaald, n.l. roodheid van de huid op de plaats van injectie, gepaard gaande met een geringe schilfering, het gevolg van een zeer oppervlakkige nekrose. Na 24 uur werd de reactie steeds beoordeeld, in gevallen waarbij dit na dien tijd nog twijfelachtig was, wederom na 48 uur.

Het bleek nu, dat de geringste dosis van dit Toxine No. 26, die, aanwezig in een volume van 0,1 c.c. vloeistof, nog juist reactie gaf, 0,00002 bedroeg.

We hebben dit gevonden, door van dit testgif verschillende verdunningen te maken, en 0.1 c.c. ervan, zoowel verwarmd als onverwarmd, in de huid bij een cavia in te spuiten. Het bleek hierbij, dat het verwarmde toxine in het geheel geen reactie gaf, zoodat men kan aannemen, dat de verkregen reactie uitsluitend van de toxinewerking afhankelijk is, en niet van bijkomende aspecifieke eiwitlichamen.

Van deze „dosis necroticans minima” (d.n.m.) hebben we de 10-voudige dosis genomen, dus 0.0002 c.c. toxine, en dit gemengd met verschillende antitoxine-verdunningen, om op deze wijze die hoeveelheid antitoxine te vinden, welke in zooverre de 0,0002 toxine zal neutraliseeren, dat nog juist de vereischte reactie der d.n.m. zal optreden. Er werd voor gezorgd, dat de toxine- en antitoxinemengsels steeds in gelijke volumina aanwezig waren, en wel zoo, dat 0,1 c.c. van het mengsel toxine- antitoxine steeds een toxinehoeveelheid van 0,0002 c.c. bevatte. We namen steeds 1 c.c. van het Toxine No. 26 op 250 c.c. water, zoodat hiervan dus 0,05 c.c., een hoeveelheid toxine bevatte van 0,0002. Van deze toxine-verdunning namen we vervolgens 1 c.c., voegden er een gelijk volume van de antitoxineverdunningen aan toe, en lieten dit minstens een half uur op kamertemperatuur staan, alvorens 0,1 c.c. van dit mengsel intracutaan bij een cavia in te spuiten. Wij achten den langen bindings-tijd door Römer aangegeven overbodig, en hebben hem dus daarin niet gevolgd.

We vonden, dat deze 10-voudige d.n.m., dus 0,0002 c.c. toxine, door een antitoxineverdunning die 1/1250 A.E. bevat, juist zoover wordt geneutraliseerd, dat er nog even nekrose optreedt, dus één d.n.m. toxine is vrij gebleven. Met deze reactie werkende, zooals hierboven staat beschreven, zijn we dus in staat 1/1250 A.E. per 0,05 c.c. aan te toonen, of wel 2/125 A.E. per c.c., hetgeen meer dan voldoende was voor het door ons beoogde doel.

Nog blijft te vermelden, dat van het op antitoxinegehalte te onderzoeken serum steeds 0,1 of 0,2 c.c. werd genomen,

en hiervan dusdanige verdunningen werden gemaakt, dat in 0,05 c.c. een antitoxinehoeveelheid van $2/125$ A.E. per c.c. aanwezig zou zijn, indien het bloedserum werkelijk de veronderstelde hoeveelheid antitoxine per c.c. zou bevatten. Hiervan namen we dan 1 c.c., mengden dit met 1 c.c. van de hierboven beschreven toxineverdunning, en spoten na eenige uren 0,1 c.c. van dit mengsel in de huid bij een cavia in.

Voor elke titratie werd de toxineverdunning opnieuw versch bereid, daar bleek, dat door het bewaren van deze sterke toxineverdunningen in de ijskast, na eenigen tijd een niet onbelangrijk toxineverlies ontstond.

Geit.

We zijn begonnen, met de uitscheiding na te gaan van zuiverd en ongezuiverd diphtherieserum bij de geit, het dier, waarmede ook **Spronck** werkte. Daarvoor hebben we twee geiten genomen, nagenoeg gelijk van leeftijd en gewicht. Het bloed werd verkregen door punctie van een oorvena. Vooraf werd onderzocht, of de geiten wellicht reeds een weinig antitoxine in het bloed hadden, en konden we door middel van de reactie van **Römer** aantoonen, dat dit veel minder was dan $2/125$ A.E. per c.c., zoodat we beide geiten practisch als antitoxinevrij konden beschouwen.

De eerste geit (geit A) hebben we subcutaan ingespoten met 3.000 A.E. van een *ongezuiverd* diphtherieserum equinum. Hiervoor zijn we uitgegaan van een serum, dat precies getriteerd 340 A.E. per c.c. sterk was, en hebben we een dusdanige verdunning gemaakt met normaal paardeserum, dat 1 c.c. ervan 200 A.E. bevatte, en spoten hiervan bij geit A. 15 c.c. in.

De tweede geit (geit B) hebben we eveneens 3.000 A.E. ingespoten, doch van een *gezuiverd* diphtherieserum equinum, dat precies 520 A.E. per c.c. sterk was, en waarvan door middel van physiologische keukenzoutoplossing een

dusdanige verdunning was gemaakt, dat 1 c.c. ervan eveneens 200 A.E. bevatte.

Na 6, 12 en 20 dagen hebben we van beide geiten bloed genomen, en onderzocht hoeveel antitoxine er nog in 1 c.c. bloedserum aantoonbaar was. Het bleek, dat we bij

Tabel A.

geit A. na 6 dagen $\pm 0,75$ A.E. per c.c. konden aantonen,
 „ 12 „ $\pm 0,25$ A.E. „ c.c.,
 „ 20 „ $< 2/125$ A.E. „ c.c.

We vonden echter bij

geit B. na 6 dagen $\pm 0,25$ A.E. per c.c.,
 „ 12 „ $\pm 2/125$ A.E. „ c.c.,
 „ 20 „ $< 2/125$ A.E. „ c.c.

Deze proef leerde ons, dat na 3 weken zoowel het gezuiverde, als het ongezuiverde serum practisch geheel is uitgescheiden, doch dat in dit tijdsverloop veel grootere antitoxinehoeveelheden in geit A. aanwezig waren, dan dit bij geit B. het geval was.

Caviae.

Vervolgens hebben we de uitscheiding van gezuiverde- en ongezuiverde diphtheriesera nagegaan bij caviae. We namen hiervoor dieren, alle ongeveer van gelijk gewicht, van 300—400 Gram.

Wat de ongezuiverde sera betreft, hebben we de uitscheiding onderzocht van ongezuiverd diphtherieserum, verkregen van het paard en van het schaap. We spoten 200 A.E. in, die in het *ongezuiverde diphtherieserum equinum* in een verdunning van 1 c.c. aanwezig was, aangezien hiervoor dezelfde serumverdunning werd gebruikt als bij geit A, en waarvan de bereiding aldaar ook reeds is beschreven.

Van het *ongezuiverde diphtherieserum ovinum* gebruikten we serum, waarvan de titer na juiste titratie, 100 A.E. per c.c. bleek te zijn, zoodat we hiervan dus 2 c.c. injecteerden.

Na 5, 10 en 14 dagen werd van de proefdieren door middel van hartpunctie bloed verkregen, en het serum hiervan, volgens Römer op zijn antitoxine-gehalte onderzocht hetgeen bleek te zijn:

Tabel B. ongezuiverd.1e. van het *ongezuiverde paardeserum*:

na	5	dagen	$\pm$	0,5	A.E.	per	c.c.
"	10	"	$\pm$	0,05	A.E.	"	c.c.
"	14	"	$<$	2/125	A.E.	"	c.c.

2e. van het *ongezuiverde schapeserum*:

na	5	dagen	$\pm$	0,5	A.E.	per	c.c.
"	10	"	$\pm$	0,05	A.E.	"	c.c.
"	14	"	$<$	2/125	A.E.	"	c.c.

We krijgen dus met ongezuiverd diphtherieserum hetzelfde resultaat, onverschillig of het afkomstig is van paarden of van schapen.

Daarna is nagegaan de uitscheiding van twee gezuiverde diphtheriesera, en wel van een door uitzouten gezuiverd serum, zooals ze in het R.S.I. worden bereid, en van een electro-osmotisch gezuiverd serum, afkomstig van de „Elektro-Osmose Gesellschaft" te Berlijn.

Ruppel zegt, dat het antitoxine hoofdzakelijk gebonden is aan de pseudoglobulinefractie van het serum, en weinig aan de euglobuline. Door de eiwitten van sera langs electro-osmotischen of liever electrodialytischen weg te scheiden, kan hij sera verkrijgen, die, in verhouding tot hun gering eiwitgehalte, een hoogen antitoxinetiter bezitten, kan dus het serum in sterke mate worden gezuiverd. Op dezelfde wijze was ook het door ons uit Berlijn verkregen serum gereinigd.

Van het door uitzouten gezuiverde serum hebben we de oplossing gebruikt, zooals bij *geit B.* reeds is beschreven, en hebben we de cavia hiervan 1 c.c., die dus 200 A.E. bevat, ingespoten.

Het electro-osmotisch gezuiverde serum dat ons ten dienste stond, had een aangegeven titer van 600 A.E. Bij juiste titratie bleek dit serum echter 620 A.E. te bevatten. Hier van is nu met physiologische keukenzoutoplossing een dusdanige verdunning gemaakt, dat 1 c.c. ervan 200 A.E. bevat, en hebben we dit eveneens bij een cavia ingespoten.

Na 5, 10 en 14 dagen hebben we bij deze dieren hartpunctie gedaan, en het aldus verkregen bloed volgens Römer op zijn antitoxinegehalte onderzocht.

Tabel C. gezuiverd.

We vonden, dat van het door uitzouten gezuiverde serum:

Na 5 dagen $\pm$ 1,5 A.E. per c.c. aanwezig was.

„ 10 „ $\pm$ 0.5 A.E. „ c.c.

„ 14 „ $<$ 2/125 A.E. „ c.c.

en van het electro-osmotisch gezuiverd serum:

Na 5 dagen $\pm$ 1,5 A.E. per c.c.

„ 10 „ $\pm$ 0,2 A.E. „ c.c.

„ 14 „ $<<$ 2/125 A.E. „ c.c.

Van een groot verschil van deze twee preparaten valt uit deze proeven weinig te bespeuren; wel is het resultaat iets ten gunste van het door uitzouten gezuiverde serum te beschouwen.

Merkwaardig is evenwel de vergelijking van de uitscheiding van gezuiverd- en ongezuiverd serum bij geit en cavia (zie tabel A. B en C). Bij de geit toch is gevonden, dat in het verloop van de drie weken, — den tijdsduur, waarin zoowel het gezuiverde- als het ongezuiverde serum wordt uitgescheiden — belangrijk meer ongezuiverd antitoxisch serum in het bloed is aan te toonen, dan dat dit met het gezuiverde het geval is. Na 6 dagen kon 3 maal zooveel ongezuiverd antitoxisch serum worden aangetoond dan gezuiverd, na 12 dagen ongeveer 15 maal, terwijl in beide gevallen na 20 dagen evenveel aantoonbaar was, n.l. 2/125 A.E. per c.c.

Bij de cavia is het echter juist andersom. Daar vinden wij, dat tijdens de 14 dagen, gedurende welke de uitscheiding plaats vindt, er meer gezuiverd dan ongezuiverd serum in het bloed is aan te toonen, en wel na 5 dagen 3 maal, na 10 dagen 10 maal zooveel, terwijl wederom in beide gevallen, doch nu na verloop van 14 dagen, er geen aantoonbaar verschil in het antitoxinegehalte van het serum van de proefdieren is te vinden.

Dit is in zooverre te verklaren, dat men toch mag aannemen, dat er een grootere biologische verwantschap bestaat tusschen een paard en een geit, dan tusschen een paard en een marmot. Het ongezuiverde paardeserum zal dus bij de geit niet direct een zoo grooten prikkel geven, tot het vormen van antistoffen, om het vreemde eiwit uit de circulatie te verwijderen, als dit bij de cavia wel het geval zal zijn.

Reeds **v. Behring** (18) heeft erop gewezen, dat homoloog antitoxisch serum langer in het organisme blijft dan heteroloog. Hij trok zijn conclusie uit het feit, dat bij een kind, ingespoten met diphtherieserum, afkomstig van het paard, na 20 dagen geen antitoxine meer in het bloed was aan te toonen, terwijl bij een ander kind, waarbij homoloog antitoxisch serum was geïnjiceerd, na 31 dagen pas het bloed vrij van antitoxine werd gevonden, dus op een tijdstip, waarop het paarde-antitoxine reeds lang uit het lichaam verdwenen was.

Hetgeen door **Glenny en Hopkins** (19) is gepubliceerd, schijnt althans wat de verhouding konijn-cavia betreft, tegenstrijdig met de hierboven vermelde opvatting; zij vonden toch, dat konijnen antitoxisch diphtherieserum, afkomstig van geit, cavia of mensch eerder uitscheiden, dan dat hetwelk van paard of koe verkregen was.

Waar het verschil in gedrag, ten opzichte van de uitscheiding van antitoxisch serum, bij verschillende proefdieren als geit en cavia zoo duidelijk uit deze proeven spreekt, was het noodig, de hierboven vermelde uitkomsten te toetsen bij den mensch. Het is toch van overwegend belang, te weten, welk preparaat juist bij den mensch de beste beschutting zal geven tegen diphtherie.

Mensch.

Madsen (20) heeft reeds aangetoond, dat het serum na subcutane toediening langzaam wordt geresorbeerd. Hij spoot een man van 90 K.G. subcutaan in met 20 c.c. serum, dat 450 A.E. per c.c. bevatte, dus totaal 9.000 A.E. en nam

van tijd tot tijd bloed uit de vena mediana cubiti. Na $4\frac{3}{4}$ uur kon hij in het bloed per c.c. 0,1 A.E. aantoonen, na 3 dagen was het maximum bereikt, n.l. 1.13 A.E. per c.c., terwijl daarna het antitoxinegehalte van het bloed geleidelijk afnam, en na 20 dagen nog slechts 0.1 A.E. per c.c. bedroeg.

We hebben nu drie jonge gezonde menschen eene onderhuidsche inspuiting met diphtherieserum gegeven, bevattend ± 3000 A.E., en wel den eersten een antitoxisch ongezuiverd serum verkregen van het paard, den tweeden een antitoxisch door uitzouten gezuiverd serum eveneens van het paard, en den derden het antitoxisch door electro-osmose gezuiverde serum.

Het *ongezuiverde serum* had een sterkte van precies 340 A.E. per c.c., hiervan is 10 c.c. ingespoten, dus totaal 3400 A.E.

Het door *uitzouten gezuiverde serum* was 520 A.E. per c.c. sterk, zoodat hiervan 6 c.c., totaal dus 3120 A.E., zijn ingespoten.

Het *electro-osmotisch gezuiverde serum* had een titer van 620 A.E. per c.c., hiervan zijn 5 c.c. ingespoten, samen dus 3100 A.E. bevattende.

Het benoodigde bloed is verkregen óf door venapunctie, óf door middel van een snapper uit den vingertop. Het antitoxine gehalte van het bloedserum bleek te zijn:

Tabel D.

1e. van het *ongezuiverde paardeserum*:

na 7 dagen $\pm 0,075$ A.E. per c.c.

" 15 " $\pm 0,05$ A.E. " c.c.

2e. van het *door uitzouten gezuiverd serum*:

na 7 dagen $\pm 0,5$ A.E. per c.c.

" 14 " $\pm 0,3$ A.E. " c.c.

" 26 " $\pm 0,05$ A.E. " c.c.

3e. van het *electro-osmotisch gezuiverd serum*:

na 6 dagen $\pm 0,5$ A.E. per c.c.

" 14 " $\pm 0,2$ A.E. " c.c.

" 24 " $2/125$ A.E. " c.c.

Hier zien we een treffend verschil tusschen het ongezuiverde serum aan den eenen, en de beide gezuiverde sera aan den anderen kant. De gezuiverde preparaten blijven toch langer en in grootere hoeveelheden in het lichaam dan dit met het ongezuiverde serum het geval is. Verder blijkt ook, dat er een niet onbelangrijk verschil bestaat tusschen het door uitzouten en het door electro-osmose gezuiverde serum; na 14 dagen konden we toch 0,1 A.E. per c.c. meer van het door uitzouten gezuiverde, dan van het electro-osmotisch gezuiverde serum in het bloed aantoonen, terwijl na 24 dagen het verschil nog grooter was geworden, zelfs meer dan 3 maal.

Ter aanvulling van hetgeen wij gevonden hebben, is de mededeeling van **Passini** (21) die zegt, dat hij bij mensch en dier na inspuiting van ongezuiverd serum na 11—12 dagen geen antitoxine in het bloed meer kon aantoonen.

Bornstein (21) heeft de uitscheiding van ongezuiverd serum bij honden en caviae nagegaan en vond, dat na 24 uur nog maar de helft, na 15—18 dagen in het geheel geen antitoxine meer was aan te toonen. Een gelijkloidend resultaat kreeg **E. Müller** (21) met diphtherieserum bij den mensch.

Bij gebruik van gezuiverd serum is het ons dus gelukt, om bij den mensch in het bloed, na 26 dagen, nog zooveel antitoxine aan te toonen, als voldoende is om hem voor diphtherie te beschutten. Volgens **v. Behring** (18) zou immers een mensch met 0,01 A.E. per c.c. bloed nog voldoende beschermd zijn tegenover diphtherie.

Uit de in dit hoofdstuk vermelde proeven kunnen we dus besluiten:

1e. *dat de factor van de biologische verwantschap tusschen de diersoort, waarvan het serum afkomstig is, en de diersoort, waarbij men het serum zal inspuiten, wat de uitscheiding betreft, zeer groot kan zijn.*

2e. *dat de resultaten uit dierproeven verkregen, niet zonder meer voor den mensch gelden.*

3e. *dat het aanbeveling verdient, om, indien men bij den*

mensch voorbehoedend serum wil inspuiten, daartoe een der gezuiverde preparaten te gebruiken, zoo mogelijk het door uitzouten gezuiverde serum, daar gebleken is, dat de met dit laatste verkregen passieve immuniteit, na 26 dagen nog ruimschoots voldoende is, om den mensch tegen de gevolgen van een diphtherie-infectie te beschutten.

Het zal niet gemakkelijk zijn, om een antwoord te vinden op de vraag, waarom een ingespoten hoeveelheid serum reeds na zoo betrekkelijk korten tijd uit het lichaam verdwenen is.

Een gedeelte van het ingespoten antitoxine zal met het vreemde eiwit waaraan het gebonden is door de verschillende excretieorganen uitgescheiden worden. **Vagedes**, ook **v. Behring** en **Kitashima** (21) hebben gevonden, dat men bij mensch en dier, die men antitoxine heeft ingespoten, zeer spoedig daarna in urine en darminhoud antitoxine kan aantoonen. De hoeveelheid antitoxine daarin aanwezig, is evenwel niet zoo groot, dat men alleen daardoor het vlugge verdwijnen van het antitoxine uit het lichaam kan verklaren.

Een andere verklaring zou zijn om aan te nemen, dat het overige van een andere diersoort afkomstige met antitoxine beladen en als antigeen werkend vreemd eiwit direct na de inspuiting aan bepaalde receptoren der cellen wordt gebonden, en dat er zoo vrije receptoren tegenover dit vreemde eiwit, waaraan het antitoxine gebonden is, ontstaan, en nu het antitoxine met het vreemde eiwit wordt vernietigd. Voor deze opvatting pleiten de proeven van **v. Behring**, en die van **Ransom** en **Kitashima** (21). Spoten ze paarden homolog tetanusantitoxine in, dus antitoxisch paardeserum, dat geen antigeenprikkel geeft, dan was het antitoxine zeer lang, tot ± 80 dagen toe, aantoonbaar, vrijwel evenlang als bij een paard, dat actief is geïmmuniseerd, vrij antitoxine in de lichaamsvochten wordt gevonden.

Inutsschen hebben de proeven van **Jörgensen** en **Madsen** (21), evenals de proeven van **Schütze** aangetoond, dat dit zóó langdurig verblijven van homologe sera in het organisme

niet voor alle diersoorten en voor alle sera opgaat. We mogen dus niet de bevindingen van **v. Behring** en zijne medewerkers, wat het tetanusantitoxine bij paarden betreft, zonder meer geldend verklaren voor alle antitoxinen en voor alle diersoorten, in het bijzonder voor den mensch.

Kraus en **Eisenberg**, evenals **Kraus** en **Joachim**, konden daarentegen door uitscheidingsproeven aantoonen, dat in het bijzonder bij diphtherieantitoxine (meestal van het paard afkomstig) het vlugge verdwijnen ervan uit de bloedbaan niet berust op een verankerd worden van eiwit, waaraan het antitoxine is gebonden, door specifieke tegenlichamen.

We kunnen ons dus op het oogenblik nog gevoegelijk aansluiten bij hetgeen **Wassermann** (21) zegt:

„Wir müssen daher sagen, das diese Frage nach den Ursachen und den Wegen des Raschen Verschwindens der Antitoxine aus der Blutbahn nach Seruminjektion noch nicht endgültig geklärt ist“.

HOOFDSTUK IV.

Over de genezende en voorbehoedende werking van normaal antitoxinevrij paardeserum.

In 1918, een jaar na den dood van **v. Behring**, wiens levenswerk o.a. is geweest het invoeren van de behandeling van diphtherie met antitoxisch serum, kwam **Bingel** ¹⁾ met eene mededeeling, dat hij in een tijdsverloop van vier jaar, 471 diphtheriepatiënten had behandeld met specifiek serum, en 466 met normaal paardeserum, zonder een noemenswaard verschil in resultaat te bespeuren. Een analoge uitkomst was reeds in 1895 door **Bertin** medegedeeld, zonder dat daarop verder acht was geslagen.

¹⁾ De oorspronkelijke publicatie van **Bingel** heb ik tot mijn spijt niet in handen kunnen krijgen, zoodat ik mij met de door **Kleinschmidt** e.a. uitgebrachte critiek moest vergenoegen.

Bingel had bij de 471 patienten die met specifiek serum waren behandeld, 47 sterfgevallen = 10%, bij de met normaal paardeserum behandelde patienten 49 dooden = 10.5% waargenomen; eveneens vond hij een nagenoeg even groot aantal sterfgevallen bij diegenen, welke in de eerste 30 uur na het aanvangen van de behandeling overleden, en bij hen, waarvan de doodsoorzaak niet direct door de diphtherie veroorzaakt was, n.l. 6% bij de met antitoxisch serum, en 5, 4% bij de met normaal paardeserum behandelde patienten (22).

Zijn handelwijze was overigens juist. Om den anderen spoot hij zijne patienten in met antitoxisch- en met normaal paardeserum, zonder op den meer of minder ernstigen graad van de ziekte, of op de eventueele complicaties, acht te slaan. Ook wisten de behandelende artsen niet, of zij antitoxisch dan wel normaal paardeserum inspotten, en hadden zij slechts de taak om objectief het ziektebeloop te boeken.

Deze mededeeling van **Bingel** heeft veel beroering veroorzaakt en de gelederen van de twijfelaars aan de specifieke antitoxische serumtherapie versterkt.

Het is echter gebleken, dat het normale paardeserum, dat **Bingel** gebruikte, niet geheel antitoxinevrij was. Hij geeft toch zelf aan, dat hij in het normale paardeserum hoogstens 1—3 A.E. per c.c. kon aantoonen, te weinig volgens hem om van invloed te zijn, en hij spoot van dit serum dan 14—16 c.c. in. In sommige gevallen zullen er dus ongeveer 48 A.E. mede ingespoten zijn, en daar uit onze proeven gebleken is, dat bij vroegtijdig inspuiten betrekkelijk weinig antitoxine noodig is om het organisme te redden, kan dit zeker een invloed hebben uitgeoefend om het therapeutische succes ten gunste van het z.g.n. practisch antitoxinevrij paardeserum te doen uitvallen.

E. Herzfeld (23) heeft er reeds op gewezen, dat klaarblijkelijk toevallig veel meer zware gevallen met antitoxisch serum, dan met normaal paardeserum werden behan-

deld, zooals zou blijken uit het feit, dat bij patienten van de eerste groep herhaaldelijk tracheotomie moest worden verricht, en bij deze ook meer verlammingen en hartcomplicaties optraden.

Verder heeft **Bingel** in zware en in laat onder behandeling gekomen gevallen antitoxine-doses gebruikt, welke door de meesten ontoereikend worden geacht.

E. Hertzfeld vond evenwel, dat men bij gebruik van normaal paardeserum:

- 1e. een langer bestaan blijven van het beslag;
- 2e. meer verlammingen;
- 3e. meer hartdood;
- 4e. in meer gevallen voortschrijden van het proces;
- 5e. meer secundaire larynx-diphtherie zag optreden;

en komt zij tot de slotsom, dat er tegen het gebruik van normaal serum bij diphtherie ernstig moet worden gewaarschuwd.

Karger (24) waarschuwt eveneens tegen het gebruik van normaal serum. Bij een kind, waarbij hij voor een rhinitis simplex (?) 70 c.c. normaal paardeserum had ingespoten, ontwikkelde zich toch na eenige dagen diphtherie.

Bovendien zijn uit de „Leipziger Medizinische Klinik” gevallen meegedeeld, die duidelijk de superioriteit van het specifieke antitoxische serum aantoonen (22). Het betreft hier de letaliteit van de zware gevallen, gepaard gaande met oedeem van het weeke verhemelte en van de hals:

Letaliteit bij	norm. p.s.	antitoxisch p.s.
kinderen van 1—5	jaar 100 %	50 %
„ „ 5—15	„ 62,5 %	22,2 %

Feer (25) heeft voorzichtig de handelwijze van **Bingel** gevolgd. Hij spoot daartoe intramusculair, soms intrave-neus, 65 zware gevallen in met antitoxisch serum, en 57 lichte gevallen met normaal paardeserum. Respectievelijk spoot hij 12—15 c.c. antitoxisch serum (4.000 A.E.), of 13 c.c. normaal paardeserum in. De met normaal paardeserum behandelde patienten kwamen gemiddeld 0.8 dag eer-

der onder behandeling. Terwijl bij de met antitoxisch serum behandelde zware gevallen de membranen zich na gemiddeld 3,3 dag afstootten, was dat daarentegen bij de met normaal paardeserum behandelde lichte gevallen pas na 5,7 dag het geval. Feer kreeg als resultaat, dat hij bij de met normaal paardeserum behandelde patienten één laryndiphtherie zag ontstaan, dus een zich naar beneden uitbreiden van het proces, terwijl hij bovendien in 6 gevallen later nog antitoxisch serum heeft moeten inspuiten, teneinde de patienten te redden. Bij de met antitoxisch serum behandelde patiënten had geen uitbreiding van het proces plaats, en komt hij dus tot een resultaat, dat geheel en al ten gunste van het diphtherieserum, en ten ongunste van het normale paardeserum uitvalt.

Ook Czerny (26) heeft vermeld, dat hij op grond van zijne klinische indrukken, de voorkeur blijft geven aan het specifieke antitoxische serum.

Friedberger (27) heeft in proeven trachten na te gaan, of hij, indien hij caviae met een diphtheriecultuur besmette, deze nog kon redden door antitoxisch of normaal paardeserum intraveneus in te spuiten (het normale paardeserum bevatte minder dan 1 A.E. per c.c.). Uit zijne proeven blijkt, dat slechts aan het antitoxische serum eene genezende werking mag worden toegeschreven. Verder schijnt het normale paardeserum zelfs een remmende werking op het antitoxine uit te oefenen, daar sommige caviae, welke behalve het antitoxische serum nog normaal paardeserum hadden bekomen, te gronde gingen, terwijl de dieren, welke slechts antitoxine hadden gekregen, in leven bleven.

Ratnoff (28) heeft eveneens nagegaan,

- 1e. of normaal serum alléén een beschuttende werking heeft tegenover diphtherie;
- 2e. of de specifieke antitoxinewerking van het immuunserum eene versterking ondervindt door gelijktijdige toediening van normaal serum. Dit laatste op die wijze, dat, als anders de cavia niettegenstaande de

toegevoerde antitoxinehoeveelheid zou sterven, het dier nu, door toevoeging aan het antitoxische serum van normaal paarde- of caviaserum, zou blijven leven.

Het resultaat was, dat van eene beschuttende werking van normaal paarde- of caviaserum alléén, in het geheel niets werd gevonden. Evenmin kon van eene versterking van de genezende werking van immuunserum door normaal serum iets worden waargenomen.

Ook Sato (10) heeft in een zijner proefreeksen de genezende werking van normaal paardeserum nagegaan. Hij zag eveneens geen resultaat van het normale paardeserum, en de met normaal serum behandelde proefdieren stierven tegelijkertijd en onder dezelfde verschijnselen als het contrôledier.

Schoening (29) heeft nu de beschuttende werking van normaal paardeserum ten opzichte van meerdere, voor de cavia doodelijke doses diphtherietoxine, nagegaan en vond dat:

- 1e. ongeveer 30 % der paarden een geringe hoeveelheid diphtherieantitoxine in het bloed hebben, voldoende om een cavia tegen 2 d.l.m. te beschutten;
- 2e. dit antitoxinegehalte van het bloed der paarden waarschijnlijk het gevolg is van infectie van wondjes met diphtheriebacillen, welke in de omgeving van paarden aanwezig kunnen zijn;
- 3e. de reactie van Schick bij 6 paarden, die geen antitoxine in het bloed hadden, positief was, bij 4 paarden daarentegen in wier bloed wel antitoxine werd aangetoond, negatief.

In overeenstemming hiermede is ook hetgeen aan een der medewerkers van het R.S.I. in de „Wellome Physiological Research Laboratories" is medegedeeld. Doordat in Londen de paarden door de toename van het aantal auto's verdrongen werden, moest men daar de versche serumpaarden van het platteland betrekken, en werd gevonden, dat onder

plattelandspaarden er in verhouding meer voorkomen die geen antitoxine in het bloed hebben, dan dit onder de stadspaarden het geval was; dat de eerstgenoemde paarden dus minder met den diphtheriebacil in aanraking waren geweest dan de paarden uit de stad. Voor paarden geldt dus blijkbaar hetzelfde als voor kinderen, daar toch algemeen bekend is, dat stadskinderen vaker een positieve reactie van Schick hebben dan buitenkinderen.

Hieruit blijkt wel voldoende, dat het van groot belang is te weten, dat het gebruikte paardeserum werkelijk antitoxinevrij is.

Toch schijnt het, dat verschillende onderzoekers een min of meer gunstige werking van het werkelijk antitoxinevrij paardeserum hebben kunnen aantoonen.

Kolle en Schloszberger (22) vonden, dat zeer groote doses normaal paardeserum in staat waren den weerstand der proefdieren te verhoogen, mits deze met levende bacteriën werden besmet. Bij gebruik van kleine doses van een virulente cultuur, of van een grootere dosis van een minder virulente cultuur, zagen ze soms, of het ziekteproces minder acuut verlopen, of den dood later optreden, of ook wel genezing.

Meyer (22) kon eveneens een zeker succes van het normale paardeserum waarnemen, doch alleen indien hij dit tegelijkertijd met de besmettende cultuur toediende.

Sato (22) heeft dit ook op konijnen nagegaan, die tracheaal waren besmet, en vond, dat tot zekere hoogte het normale paardeserum eene genezende werking had. Besmette hij de dieren met groote hoeveelheden bacteriën, en begon hij geruimen tijd nadien met de serumtherapie, dan kon hij het overwicht van het specifieke serum bewijzen, en wel geheel in overeenstemming met zijne antitoxinehoeveelheid.

Volgens **Kleinschmidt** (22) zou de werking van het normale paardeserum geheel op rekening moeten worden gezet van de werking der specifieke proteïnelichamen,

Dit zou overeenkomen met hetgeen Issaëff (30) vermeldt: Hij spoot n.l. dieren in met nucleïnezuur, bloedserum, bouillon, urine en physiologische keukenzoutoplossing en vond, dat de dieren een niet-specifieke beschutting vertoonden, zoolang als de door de inspuiting met deze stoffen verkregen celreactie duurde.

„Offenbar vermag also das normale Serum in seiner Eigenschaft als unspezifisch Resistenzsteigerndes Mittel einen Heileffekt dann und solange zu bewirken, als durch die allgemeinen Abwehrkräfte des Organismus noch die Infektion erfolgreich bekämpft werden kann und die Neutralisierung des Toxins durch ein spezifisches Antitoxin nicht Vorbedingung für den lebensrettenden Eingriff ist. Ist die Infektion aber schwerer, so nützt die Stärkung seiner natürlichen Abwehrkräfte allein dem Körper nicht mehr; es bedarf zur Heilung des spezifischen Antitoxins". (Kleinschmidt 22).

We hebben nu getracht na te gaan, of door dierproeven een genezende- en beschuttende werking van het normale paardeserum te verwachten is.

In Hoofdstuk I is vermeld, dat caviae, welke geïnfecteerd waren met 0,5 c.c. van een 48 uur oude bouilloncultuur (Leidsche stam), gered konden worden, indien ze tegelijkertijd werden ingespoten met minstens $2\frac{1}{2}$ A.E., aanwezig in een volume van 1 c.c. Zooals aldaar reeds is beschreven, werden deze serumverduunningen verkregen met behulp van physiologische keukenzoutoplossing.

We hebben nu 7 caviae, van om en nabij 400 Gram lichaamsgewicht, met deze dosis van 0,5 c.c. van de 48 uur oude bouilloncultuur besmet, waarna we tegelijkertijd twee van deze dieren hebben ingespoten met 1 c.c. die $2\frac{1}{2}$ A.E. bevatte, twee andere dieren met 1 c.c. van een physiologische keukenzoutoplossing, en nog twee caviae met 1 c.c. normaal paardeserum, terwijl het overgebleven proefdier voor controle diende (zie tabel XIV).

Nog dient te worden vermeld, dat het normale paarde-

serum, dat in deze en in de volgende proeven is gebruikt, vooraf volgens Römer is onderzocht op zijn antitoxinegehalte, waarbij gebleken was, dat, mocht het al antitoxine bevatten, dit in ieder geval minder bedroeg dan $2/125$ A.E. per c.c.

We hebben dus twee der dieren ook met 1 c.c. physiologische keukenzoutoplossing ingespoten, om de mogelijke, ons evenwel niet waarschijnlijk toelijkende werking ervan geheel te kunnen uitsluiten; daar hier toch zulke sterke serumverduunningen werden gebruikt, leek het niet ongewenscht den invloed van de physiologische NaCl-oplossing te bepalen.

We kregen als resultaat, dat de twee met physiologisch keukenzout ingespoten caviae, tegelijk met het contrôledier, na twee dagen stierven; een der dieren ingespoten met $2\frac{1}{2}$ A.E. stierf na drie dagen, terwijl zijn lotgenoot, evenals de beide met normaal paardeserum behandelde dieren, bleven leven. Merkwaardig is wel, dat de cavia, welke met $2\frac{1}{2}$ A.E. was ingespoten, een sterk infiltraat en nekrose kreeg, terwijl de beide met normaal paardeserum ingespoten dieren slechts weinig lokaal reageerden en ook in het geheel geen zieken indruk hebben gemaakt.

Dit komt nog beter uit in de volgende proef, welke overigens gelijk is aan de voorgaande, behalve dat hier serumverduunningen zijn gebruikt, waarvan 1 c.c. 5 A.E. bevatte, (zie tabel XV).

Wie zien hier in de eerste plaats, dat de cultuur virulenter is dan bij de voorgaande proef; hier sterft toch het contrôledier reeds na 1 dag, hoewel de besmettende dosis van de cultuur in beide gevallen 0.5 c.c. bedroeg. In de tweede plaats blijkt hier, evenals in de vorige proef, dat een physiologische keukenzoutoplossing in het geheel geen gunstigen invloed uitoefent, daar beide caviae tegelijk met het contrôledier na 1 dag sterven. Verder zien we de beide met 5 A.E. ingespoten dieren na drie dagen sterven; de gebruikte geringe antitoxinedosis bleek dus bij deze virulente bouil-

loncultuur niet toereikend om de proefdieren te redden, ze kon hoogstens het ziektebeloop ietwat vertragen.

Merkwaardig is echter ook hier de werking van het normale paardeserum; beide dieren bleven toch in leven, kregen slechts een gering lokaal infiltraat, hoewel de cultuur dezen keer veel virulenter was dan bij de vorige proef.

We hebben deze proef nog eens herhaald, doch thans 15 A.E., aanwezig in een volume van 1 c.c., ingespoten (zie **tabel XVI**). Hier zien we alle dieren in leven blijven, de toegevoerde antitoxinedosis bleek hier dus voldoende, om de caviae vor de infectie van 0.5 c.c. te beschermen. Opmerkelijk is echter, dat het locale infiltraat bij het met normaal paardeserum behandelde dier veel kleiner is dan bij de caviae, waarbij 15 A.E. ingespoten zijn.

Uit deze proeven blijkt dus dat het normale paardeserum bij de cavia een gunstiger invloed uitoefent dan kleine doses antitoxine, mits tegelijkertijd met de diphtheriebesmetting toegediend.

In de volgende proeven is de genezende werking van normaal paardeserum nagegaan, indien 6 uur na de infectie met de behandeling begonnen wordt.

We hebben nu, 6 uur na de infectie met 0,5 c.c. van de 48 uur oude bouilloncultuur, 4 caviae ingespoten met 1 c.c. die 25 A.E. bevat, een verdunning, welke met behulp van physiologische keukenzoutoplossing is verkregen, 4 andere dieren met 1 c.c. normaal paardeserum.

Uit **tabel XVII** blijkt, dat een der met normaal paardeserum behandelde dieren, evenals het contrôledier, na 1 dag sterft; de 4 met 25 A.E. ingespoten caviae sterven allen na twee dagen, eveneens een ander der met normaal paardeserum behandelde dieren, terwijl de beide overige resp. na 3 en 4 dagen sterven. De 25 A.E. bleken hier dus niet toereikend om de caviae voor deze virulente cultuur te redden, terwijl evenmin van het normale paardeserum eenige genezende werking was te bespeuren.

Deze proef is herhaald, doch thans spoten we 35 A.E. in, aanwezig in een volume van 1 c.c. (**tabel XVIII**).

We zien hier de beide dieren, welke met normaal paardeserum zijn ingespoten na twee dagen sterven, tegelijk met het contrôledier. Een der met 35 A.E. ingespoten caviae sterft na 6 dagen, terwijl de overige er het leven afbrengt, behoudens een groot lokaal infiltraat. Het normale paardeserum blijkt hier dus geheel geen genezende werking te hebben uitgeoefend.

In een volgende proef hebben we nogmaals drie caviae geïnfecteerd, steeds met dezelfde dosis van 0,5 c.c. van de 48 uur oude bouilloncultuur, en 6 uur later één dier ingespoten met 1 c.c. van een serumverdunding, welke 50 A.E. bevatte, het andere met 1 c.c. normaal paardeserum, terwijl het overblijvende dier voor contrôle diende (**tabel XIX**).

Het blijkt, dat het contrôledier na twee dagen sterft, terwijl de beide andere dieren in leven blijven. Wel merkwaardig is, dat hier het normale paardeserum wèl in staat is geweest, het proefdier te redden; de heele buik van het dier is echter een hard infiltraat, dat sterk nekrotisch geworden is, terwijl de met 50 A.E. ingespoten cavia slechts een matig infiltraat vertoonde.

Voor al deze proeven zijn we uitgegaan van een gezuiverd antitoxisch diphtherieresum, dat 520 A.E. per c.c. sterk was, juist om de tegenstelling tusschen antitoxine en normaal paardeserum zoo groot mogelijk te doen zijn.

Het blijkt dus uit deze proeven, dat aan het normale paardeserum in het algemeen geen genezende werking mag worden toegekend, indien het serum pas eenigen tijd na de infectie wordt ingespoten. Onder omstandigheden kan het echter mogelijk zijn, dat het normale paardeserum een cavia kan redden, zelfs indien het eenigen tijd later wordt toegediend, maar blijkt dan duidelijk uit het ziektebeloop, dat het verre achter staat bij het specifieke antitoxische serum.

We hebben nu verder onderzocht of het normale paardeserum ook een voorbehoedende werking bezit tegenover een later optredende infectie bij de cavia.

Daartoe zijn caviae, alle ongeveer van 400 Gram

lichaamsgewicht, onderhuids ingespoten met 2 c.c. normaal paardeserum, en hebben we deze dieren achtereenvolgens op verschillende dagen besmet met 0,5 c.c. van een 48 uur oude diphtherie-bouilloncultuur (tabel XX).

Het resultaat is wel verrassend, want het blijkt toch, dat de proefdieren een niet specifieke beschutting hebben gekregen, die meer dan 10 dagen blijft aanhouden, daar de cavia, welke 13 dagen na de voorbehoedende inspuiting met 2 c.c. normaal paardeserum is geïnfecteerd, de hem toegebrachte infectie pas niet meer kan doorstaan, en na 4 dagen sterft. De dieren, die de eerste vier dagen na de serum-inspuiting werden geïnfecteerd, kregen in het geheel geen lokaal infiltraat; de cavia, welke 6 dagen later werd besmet, kreeg een zeer geringe plaatselijke reactie, terwijl we deze locale reactie steeds grooter zagen worden bij die proefdieren, welke we 8 en 10 dagen na de toediening van normaal paardeserum besmetten. We zien dus een geleidelijke vermeerdering van de gevoeligheid van het organisme voor de hem toegebrachte infectie optreden.

Uit onze onderzoeken hebben we nu het volgende over de werking van normaal antitoxinevrij paardeserum kunnen vinden.

- 1e. *Therapeutisch heeft het een gunstiger werking dan kleine hoeveelheden antitoxine, mits het serum tegelijkertijd met de besmettende cultuur wordt ingespoten;*
- 2e. *Spuut men het normale paardeserum eenige uren na het oogenblik van infectie in, dan mag men niet op een genezende werking ervan rekenen, ofschoon de mogelijkheid niet is uitgesloten, dat het proefdier in lever blijft; echter staat in het laatste geval de werking van het normale paardeserum verre achter bij die van het specifieke antitoxische serum.*
- 3e. *Voorbehoedend heeft het normale paardeserum zeer zeker een gunstigen invloed van vrij langen duur op het proefdier tegenover een later toegebrachte besmetting met een bouilloncultuur.*

In Hoofdstuk II hebben we gevonden, dat 200 A.E., zowel van een gezuiverde als van een ongezuiverde serumverduunning, een cavia een immuniteit geeft tegenover een infectie van 0,5 c.c. van een 48 uur oude bouilloncultuur, die na 14 dagen verdwenen is. Een vrijwel gelijke, ja zelfs betere uitkomst, is verkregen door de voorbehoedende inspuiting van 2 c.c. normaal antitoxinevrij paardeserum.

Met het oog op de gevaren van primaire serumziekte en anaphylaxie, die aan de inspuiting van normaal paardeserum verbonden zijn, en aangezien we, wat de voorbehoedende werking van antitoxisch serum betreft, geen verschil tusschen gezuiverd en ongezuiverd serum hebben kunnen aantoonen, is dus het gebruik van gezuiverd antitoxisch diphtherieserum in die gevallen aangewezen, waar men een passieve immuniteit wil veroorzaken.

SLOTSOM.

Het is gebleken, dat door herhaald overenten van een diphtheriestam op een verschen voedingsbodem niet alleen de virulentie van de cultuur toeneemt, en dat de bindings-tijd van het toxine aan de daarvoor gevoelige cellen van het lichaam kleiner wordt, doch dat daardoor ook de tijd, waarbinnen het organisme door specifiek antitoxisch serum nog te redden is, steeds meer wordt beperkt. Is die tijdsduur evenwel verstreken, dan helpen zelfs groote doses antitoxine niet meer en gaat het organisme onherroepelijk te gronde.

We kunnen niet genoeg den nadruk leggen op het feit, dat men zoo spoedig mogelijk het antitoxische serum moet inspuiten.

Verder blijkt ook, dat normaal paardeserum, mits tegelijkertijd met de besmettende bouillon toegediend, een beter resultaat geeft dan een geringe dosis antitoxine, dat dus de

aspecifieke prikkel van het vreemde eiwit, binnen zekere grenzen, sterker is dan de specifieke prikkel van het antitoxine. We worden echter bij onze patiënten geroepen, als de ziekte zich reeds geopenbaard heeft, op een tijdstip dus, waarop de incubatietijd al voorbij is en er reeds een binding van toxine met bepaalde cellen van het lichaam heeft plaats gevonden. In dat stadium mogen we geen genezende werking van het normale paardeserum verwachten, en kan uitsluitend en alleen het specifieke antitoxine het organisme van den dood redden, door meerdere schade te voorkomen door binding van het nog vrij in het lichaam aanwezige toxine, of misschien ook door reeds aan de daarvoor gevoelige cellen gebonden toxine, los te maken.

Uit de proeven over de genezende en voorbehoedende werking van antitoxisch serum, is geen verschil aan te toonen tusschen gezuiverd en ongezuiverd serum. De therapeutische werking is slechts afhankelijk van de ingespoten hoeveelheid antitoxine en niet van de meer of minder groote hoeveelheid vreemd eiwit. Hier verdient dus het gebruik van een gezuiverd preparaat de voorkeur.

Bij de uitscheiding van antitoxisch serum bij den mensch blijkt eveneens duidelijk de superioriteit van het gezuiverde serum; we vonden toch een langer durende passieve immuniteit, en gedurende dien tijd in het bloed een grootere hoeveelheid antitoxine bij gebruik van gezuiverd- dan van ongezuiverd serum. Van de beide gezuiverde preparaten, die wij onderzochten, gaf het door uitzouten verkregen serum betere uitkomsten dan het electro-osmotisch gezuiverde.

Zoowel voor genezende- als voor voorbehoedende doeleinden is het dus aangewezen, het gezuiverde antitoxische diphtherie-serum te gebruiken, daar het even goede, zoo niet betere resultaten geeft dan het ongezuiverde serum, terwijl bovendien door het inspuiten van gezuiverde preparaten, de kans op primaire serumziekte en anaphylaxie aanzienlijk zal worden beperkt.

RÉSUMÉ.

I.

Nous avons tâché de découvrir s'il y a une différence dans l'effet thérapeutique entre les sérums antitoxiques diphthériques purifiés, et non-purifiés.

Nos expériences ont été faites sur des cobayes d'un poids de 400 à 600 grammes.

Comme mode d'infection nous avons employé une culture en bouillon de diphthérie de 48 heures. Nous avons aussi réinoculé tous les 2—3 jours cette même diphthérie sur un nouveau milieu de Löffler. Par des expériences préliminaires il s'est trouvé, que la dose de 0.5 c.c. de cette culture en bouillon de 48 heures non filtrée, injectée sous la peau d'un cobaye de 400 gr., le tue en deux jours, tandis que la dose de 0.7 c.c. le fait mourir en un jour. Pour nos expériences nous avons employé la dose d'infection de 0,5 c.c. ou de 0,7 c.c.

Les sérums dont nous nous sommes servis, proviennent de l'Institut Sérologique de l'Etat. Les sérums non-purifiés avaient une valeur de 300 U. par c.c. dont nous avons fait une dilution avec du sérum normal de cheval, de sorte que 1 c.c. contenait 100 U.

Le sérum purifié avait une valeur de 1200 U. dont nous avons fait une même dilution, mais cette fois-ci avec de l'eau physiologique.

De ces deux dilutions de sérum nous avons toujours injecté la même quantité, soit 2 c.c. contenant 200 U.

Pour l'injection de 900 U, il a été pris 3 c.c. d'un sérum non-purifié d'une valeur de 300 U. par c.c.; le sérum purifié employé dans ce cas, avait une valeur de 600 U, dont

nous avons fait une telle dilution avec de l' eau physiologique, que 3 c.c. contenait également 900 U.

Dans les premières expériences, dont on peut voir le résultat dans les tableaux I, II et III, nous avons injecté chaque fois deux cobayes avec la dilution de sérum non-purifié, et les deux autres avec la dilution de sérum purifié, contenant 200 U, 6, 10 et 12 heures après l' infection de 0.5 c.c. Il résulte qu' il est impossible de sauver les cobayes avec 200 U, 12 heures après l' infection. De même 900 U. sont incapables de les sauver 12 heures après l' infection de 0,5 c.c., comme on peut le lire dans le tableau IV.

Dans les expériences suivantes nous avons employé la dose d'infection de 0.7 c.c. de la culture en bouillon de 48 heures. Comme le tableau V l'indique, deux cobayes ont été infectés, 6 heures après l' infection, avec 900 U. de sérum non-purifié, les deux autres avec 900 U. de sérum purifié. Tous les cobayes survivent.

Il paraît dans le tableau VI que 200 U. donnent le même résultat, aussi bien du sérum purifié que non-purifié.

Ensuite les cobayes ont été injectés avec 200 U., 10 heures après l'infection de 0.7 c.c. Le tableau VII montre que les 2 cobayes injectés avec le sérum purifié meurent; un des cobayes traités avec le sérum non-purifié meurt également; cependant nous avons trouvé, en faisant la section, outre des symptômes de diphthérie, une distomatose.

En injectant les animaux avec 900 U. au lieu de 200 U., nous constatons également dans le tableau VIII, que les deux cobayes traités avec le sérum purifié meurent, tandis que les deux autres, injectés avec le sérum non-purifié, survivent.

Les sérums employés dans les expériences suivantes, ont d' abord été examinés quand à leur valeur exacte; nous avons trouvé que le sérum non-purifié avait une valeur exacte de 340 U. par c.c., tandis que le sérum purifié contenait précisément 520 U. par c.c. De ces deux sérums nous avons fait de telles dilutions, que 200 U. se trouvent dans

un volume de 1 c.c. Ici aussi le sérum purifié était dilué avec de l'eau physiologique, tandis que le sérum non-purifié l'était avec du sérum normal de cheval.

Cependant, entre les expériences relatées ci-dessus et les expériences suivantes, il y a un intervalle de huit mois. Pendant ce temps, la diphtérie avec laquelle nous avons travaillé, était régulièrement réinoculée tous les 2—3 jours, et nous pouvons constater, que la virulence de notre culture est devenue beaucoup plus forte.

Avec ces nouvelles dilutions de sérum nous avons refait quelques expériences, dont on peut voir le résultat dans les tableaux IIa, IIIa, IVa, VIIa et VIIIa. La première des choses que nous voyons c'est, que les cobayes ne peuvent plus être sauvés 10 heures après l'infection. Ensuite la plus grande virulence de la culture se montre dans le fait que les animaux meurent tous plus vite que dans les expériences, faites 8 mois auparavant; sans cela nous avons obtenu à peu près le même résultat que dans nos premières expériences. En faisant des expériences sur des animaux, il nous faut toujours savoir que nous ne possédons pas le facteur de la disposition individuelle de l'organisme, et il nous faudra bien tenir compte de ce fait-là.

En examinant de nouveau notre culture en bouillon de 48 heures, il paraît que la dose de 0,3 c.c. tue à présent un cobaye en 2 jours, tandis qu'il nous fallait, 8 mois auparavant, 0,5 c.c. de cette culture en bouillon de 48 heures, pour obtenir le même résultat.

Dans l'expérience suivante 8 cobayes ont été injectés avec la dose de 0.3 c.c., puis, 10 heures après, nous en avons injecté 4 avec 900 U. d'une dilution de sérum purifié, les 4 autres avec 900 U. d'une dilution de sérum non-purifié. Il paraît dans le tableau IX que 7 cobayes meurent le second jour, tandis que le huitième, traité avec le sérum non-purifié, survit.

Il résulte donc de cette expérience, que si la virulence d'une culture devient plus grande, la production des toxines

augmente de même, de sorte que des grandes quantités d'antitoxine ne permettent plus de sauver l'animal 10 heures après l'infection, tandis que c'était bien encore possible 8 mois auparavant, lorsque la culture était moins virulente.

Puis nous avons cherché la quantité d'unités antitoxiques, nécessaire à sauver un cobaye, 6 heures après l'infection de 0,5 c.c. d'une culture en bouillon de 48 heures. Nous avons fait différentes dilutions dont 1 c.c. contenait 50, 25 ou 15 U.

Le sérum non-purifié que nous avons employé avait une valeur exacte de 340 U. par c.c., dont les dilutions indiquées ci-dessus ont été faites avec de l'eau physiologique. Les mêmes dilutions ont été faites d'un sérum purifié, contenant 520 U. par c.c., aussi avec de l'eau physiologique.

Il paraît dans le tableau X, que 15 U. d'un sérum purifié peuvent encore sauver l'animal tandis que 15 U. d'un sérum non-purifié font mourir un des cobayes après 7 jours. Naturellement qu'on ne peut tirer aucune conclusion définitive de cette expérience en faveur du sérum purifié ou non-purifié.

Nous avons aussi cherché la quantité d'unités antitoxiques nécessaire à sauver un cobaye d'une infection de 0,5 c.c., si la dilution de sérum est injectée en même temps que la dose de la culture en bouillon. Les dilutions ont été faites de même avec de l'eau physiologique.

Dans le tableau XI on peut voir que $2\frac{1}{2}$ U. suffisent à sauver les cobayes, tandis qu'une dilution contenant 1 U. fait mourir les animaux 2 et 7 jours après.

Les conclusions de ces expériences sont les suivantes:

- 1e. *L'effet thérapeutique ne dépend que de la quantité d'unités antitoxiques que nous injectons et non de la quantité d'albumine aspécifique.*
- 2e. *Il est préférable d'employer un sérum purifié puisqu'il a le même effet thérapeutique, afin d'épargner aux malades, autant que possible, les conséquences d'une injection de sérum hétérologue.*

- 3e. *Il faut injecter le sérum antitoxique aussi vite que possible, car après un certain laps de temps l'organisme ne peut plus être sauvé, même avec de grandes doses d'antitoxine.*

II.

Afin d'examiner l'effet prophylactique des sérums purifiés et non-purifiés nous avons fait les expériences suivantes.

Les mêmes dilutions que nous avons décrites ci-dessus ont été employées, c. à d., que 100 U. se trouvaient dans un volume de 1 c.c. Quatre cobayes d'un poids d'environ 400 G. ont reçu une injection sous-cutanée de 200 U., soit deux de la dilution de sérum purifié, les deux autres de la dilution de sérum non-purifié. Sept jours après un cobaye de chaque groupe a été injecté avec 0,5 c.c. de la culture en bouillon de 48 heures non-filtrée; les deux survécurent; 15 jours après les deux autres ont été injectés de la même manière, et comme on peut le voir dans le tableau XII les deux meurent deux jours plus tard.

Nous avons un peu modifié l'expérience précédente. Quatre cobayes ont été infectés avec 0,5 c.c. d'une culture en bouillon de 48 heures filtrée par du papier; 10 heures plus tard ils ont été injectés avec 200 U. de la dilution de sérum non-purifié (2 c.c. de cette même culture de 48 heures filtrée tue un cobaye après 11 jours). Nous avons réinjecté ces animaux après 6, 9, 11 et 13 jours, mais cette fois-ci avec 0,5 c.c. de la culture en bouillon non filtrée.

Comme le tableau XIII le fait voir, le cobaye réinfecté 13 jours après le premier traitement, meurt au bout de 5 jours. Nous avons donc obtenu un résultat à peu près analogue à notre première expérience.

On peut aussi considérer ces cobayes comme des enfants légèrement infectés et traités avec du sérum, de sorte que ce mode de travail nous a permis de vérifier, dans ces circonstances, la durée de l'immunité passive.

III.

Nous avons examiné ensuite l'excrétion de différents sérums purifiés et non-purifiés chez plusieurs animaux et chez l'homme.

Chèvre.

Deux chèvres ont été injectées avec 3000 U. d'un sérum antidiphthérique équin purifié et non-purifié. Le sérum purifié avait une valeur exacte de 520 U. par c.c. dont nous avons fait une telle dilution avec de l'eau physiologique, que 1 c.c. contenait 200 U. Le sérum non-purifié avait une valeur exacte de 340 U. par c.c. dont nous avons fait une même dilution avec du sérum normal de cheval. Chaque chèvre a donc été injectée sous la peau avec 15 c.c. d'une de ces dilutions.

Quant au *sérum antidiphthérique équin non-purifié* nous avons pu trouver dans le sang:

après 6 jours $\pm 0,75$ U. par c.c.

" 12 " $\pm 0,25$ U. " c.c.

" 20 " $< 2/125$ U. " c.c.

Quant au *sérum antidiphthérique purifié*:

après 6 jours $\pm 0,25$ U. par c.c.

" 12 " $\pm 2/125$ U. " c.c.

" 20 " $< 2/125$ U. " c.c.

Cobaye.

Les cobayes injectés avaient un poids de 300 à 400 Grammes. Nous avons examiné l'excrétion de sérum antidiphthérique non-purifié du cheval et du mouton. La dilution de sérum non-purifié équin est la même que celle indiquée ci-dessus et nous avons injecté le cobaye avec 200 U. qui se trouvent dans 1 c.c. de cette dilution. Le sérum ovin non-purifié avait une valeur exacte de 100 U. par c.c.; les 200 U. injectées étaient donc dans un volume de 2 c.c.

Du *sérum équin non-purifié* nous avons pu constater qu' il se trouvait dans le sang:

après 5 jours $\pm 0,5$ U. par c.c.

après 10 jours $\pm 0,05$ U. par c.c.

" 14 " $< 2/125$ U. " c.c.

Du sérum non-purifié ovin:

après 5 jours $\pm 0,5$ U. par c.c.

" 10 " $\pm 0,05$ U. " c.c.

" 14 " $< 2/125$ U. " c.c.

On a donc obtenu le même résultat avec le sérum provenant du cheval ou du mouton.

Nous avons ensuite examiné l'excrétion de sérums purifiés par moyen de sulphate de soude et par électro-osmose. La dilution de sérum purifié par moyen de sulphate de soude est la même que celle employée pour la chèvre. Nous en avons donc injecté 1. c.c. = 200 U. Le sérum purifié par électro-osmose, provenant du „Elektro-Osmose Gesellschaft" à Berlin, avait une valeur exacte de 620 U. dont nous avons fait une dilution avec de l'eau physiologique, de sorte que 1 c.c. contenait 200 U. que nous avons injecté sous la peau d'un cobaye.

Il résulte que du sérum purifié par sulphate de soude se trouvait dans le sang:

après 5 jours $\pm 1,5$ U, par c.c.

" 10 " $\pm 0,5$ U, " c.c.

" 14 " $< 2/125$ U, " c.c.

et du sérum purifié par électro-osmose:

après 5 jours $\pm 1,5$ U, par c.c.

" 10 " $\pm 0,2$ U, " c.c.

" 14 " $<< 2/125$ U, " c.c.

Il est remarquable de constater que chez la chèvre le sérum non-purifié est retenu en plus grande quantité que chez le cobaye, ce qui pourrait peut être s'expliquer par le fait que la parentée biologique entre le cheval et la chèvre est plus grande que celle entre le cheval et le cobaye.

Homme.

Nous avons fait une injection sous-cutanée de ± 3000 U. à trois jeunes gens, soit d'un sérum antidiphthérique équin non-purifié, soit d'un sérum purifié par moyen de sulphate

de soude, soit d'un sérum purifié par électro-osmose.

Le sérum non-purifié dont nous avons injecté 10 c.c. avait une valeur exacte de 340 U. par c.c., total 3.400 U.

Le sérum purifié par moyen de sulphate de soude avait une valeur de 520 U., nous en avons donc injecté 6 c.c. = 3120 U.

La valeur du sérum purifié par électro-osmose était de 620 U. par c.c., de celui-ci 5 c.c. ont été injectés = 3100 U.

Nous avons pu trouver dans le sang:

1. du sérum équin non-purifié:

après 7 jours $\pm$ 0,075 U, par c.c.

" 15 " $\pm$ 0,05 U, " c.c.

2e. du sérum purifié par sulphate de soude:

après 7 jours $\pm$ 0,5 U, par c.c.

" 14 " $\pm$ 0,3 U, " c.c.

" 26 " $\pm$ 0,05 U, " c.c.

3e. du sérum purifié par électro-osmose:

après 6 jours $\pm$ 0,5 U, par c.c.

" 14 " $\pm$ 0,2 U, " c.c.

" 24 " $\frac{2}{125}$ U, " c.c.

On peut constater par ceci que les sérums purifiés sont retenus plus longtemps et en plus grandes quantités dans l'organisme que les sérums non-purifiés. De même il est clair que le sérum purifié par moyen de sulphate de soude donne un meilleur résultat que le sérum purifié par électro-osmose.

Nous pouvons donc conclure par ces expériences:

- 1e. *que le résultat des expériences faites sur les animaux ne s'appliquent pas toujours à l'homme;*
- 2e. *que si l'on veut faire chez l'homme une injection prophylactique, il est préférable de se servir d'un des sérums purifiés, si possible d'un serum purifié par sulphate de soude, puisqu' il se trouve qu' avec ce dernier nous avons encore après 26 jours une immunité passive plus que suffisante.*

IV.

Nous nous sommes efforcés de trouver si, dans certaines circonstances, le sérum normal de cheval a un effet thérapeutique et prophylactique.

Les dilutions de sérum employées proviennent toutes d'un sérum purifié d'une valeur de 520 U. par c.c., dilué avec de l'eau physiologique, afin d'obtenir le plus grand contraste que possible entre l'antitoxine et le sérum normal de cheval.

Sept cobayes d'environ 400 Gr. ont été infectés avec 0.5 c.c. d'une culture en bouillon de 48 heures, ensuite deux de ces animaux ont été injectés avec 1 c.c. contenant $2\frac{1}{2}$ U., deux autres avec 1 c.c. d'eau physiologique et deux avec 1 c.c. de sérum normal de cheval, tandis que le dernier servait de contrôle.

Nous devons faire remarquer que le sérum normal de cheval employé dans ces expériences contenait beaucoup moins de $2/125$ U. par c.c.

Le résultat obtenu est que les deux cobayes injectés avec de l'eau physiologique meurent deux jours après en même temps que celui qui servait de contrôle; un des animaux injectés avec $2\frac{1}{2}$ U meurt trois jours après, tandis que les trois autres cobayes survivent (tableau XIV).

L'expérience suivante est analogue à la précédente, seulement deux des cobayes ont été injectés avec 1 c.c. contenant 5 U. au lieu de $2\frac{1}{2}$ U.

Le tableau XV montre que la culture est de beaucoup plus virulente que dans l'expérience précédente, puisque le cobaye de contrôle meurt déjà un jour après, ainsi que les deux animaux injectés avec de l'eau physiologique. Dans ce cas les 5 U. n'ont pas suffi à sauver les cobayes, tandis que le sérum normal de cheval les ont facilement préservé de la mort.

Nous avons répété cette expérience, mais en injectant cette fois-ci 15 U. dans un volume de 1 c.c.; tous les co-

bayes ont survécu (tableau XVI). Ce qui nous a frappé dans ces expériences, c'est que l'infiltration locale chez les cobayes injectés avec le sérum normal de cheval, était de beaucoup plus petite que chez les animaux injectés avec ces quelques unités d'antitoxine.

Ensuite l'effet thérapeutique du sérum normal de cheval a été examiné si on l'injecte 6 heures après l'infection d'une culture en bouillon.

Nous avons injecté 8 cobayes avec 0,5 c.c. d'une culture en bouillon de 48 heures, ensuite quatre de ces animaux ont été injectés avec 1 c.c. contenant 25 U., les quatre autres avec 1 c.c. de sérum normal de cheval. Le tableau XVII montre que tous les cobayes meurent.

Cette expérience a été refaite, mais cette fois-ci 35 U. ont été injectés, dans un volume de 1 c.c. On peut voir dans le tableau XVIII, que les deux cobayes, injectés avec le sérum normal de cheval 6 heures après l'infection, meurent 2 jours après; un des animaux injectés avec 35 U. meurt après 6 jours, tandis que l'autre survit.

Dans une expérience suivante 1 c.c. contenant 50 U. a été injecté 6 heures après l'infection de la culture en bouillon. Comme le tableau XIX l'indique les deux cobayes survivent, tandis que l'animal de contrôle meurt après deux jours. Il paraît donc ici que le sérum normal de cheval a pu sauver le cobaye 6 heures après l'infection.

Notre recherche suivante a eu pour but de voir si le sérum normal de cheval a aussi un effet prophylactique chez le cobaye. Pour cela plusieurs cobayes ont été injectés sous la peau avec 2 c.c. de sérum normal de cheval et nous avons infecté ces animaux, à tour de rôle, à différents jours d'intervalle, avec 0.5 c.c. de la culture en bouillon de 48 heures (tableau XX).

Le résultat est étonnant, car il paraît que les cobayes ont reçu une défense non-spécifique qui dure plus de dix jours.

Nous pouvons conclure des expériences décrites ci-dessus:

- 1e. *que le sérum normal de cheval a un plus grand effet thérapeutique que de petites quantités d'antitoxine, pourvu que le sérum soit injecté en même temps que la culture infectante;*
- 2e. *que si l'on injecte le sérum normal de cheval quelques heures après le moment de l'infection, la possibilité n'est pas exclue que le cobaye survive, mais on ne peut pas compter qu' en général, dans ces circonstances, le sérum normal de cheval sauvera les animaux; il nous faut pour cela le sérum antitoxique spécifique.*
- 3e. *qu' une injection prophylactique de sérum normal de cheval donne au cobaye une défense d'assez longue durée, envers une infection d'une culture en bouillon de diphthérie.*

Dans nos expériences sur l' effet thérapeutique et prophylactique de sérum antidiphthérique, il n' a pas été trouvé une différence d'action entre le sérum purifié et non-purifié.

En examinant l'excrétion de différents sérums antidiphthériques chez l'homme, nous avons pu constater la supériorité du sérum purifié et surtout du serum purifié par moyen de sulphate de soude.

Il est donc indiqué pour l' usage thérapeutique et prophylactique de se servir d' un des sérums antidiphthériques purifiés' afin d' éviter autant que possible aux malades les dangers de la maladie de sérum et de l'anaphylaxie, puisqu' il donne le même et peut-être un meilleur résultat que le sérum non-purifié.

LITERATUUR

1. Wiener Klin. Wochenschrift. 1917 No. 11 blz. 332.
2. Wiener Klin. Wochenschrift. 1916 No. 2 blz. 37.
3. Wiener Klin. Wochenschrift. 1904 en 1905.
4. Kon. Academie van Wetenschappen. Verslagen der Wis- en Nat. afd. 1916. Deel XXV, blz. 730.
5. Wiener Klin. Wochenschrift. 1916 No. 8. Ref.
6. Arbeiten aus dem Staatsinstitut für experimentelle Therapie und dem Georg Speyer Hause zum Frankfurt a.M.
7. Bulletin de l' Institut Pasteur 1922.
8. Annales de l' Institut Pasteur 1904, blz. 47.
9. Comptes rendus des séances de la Société de Biologie. 1925 No. 24. Tome XCIII.
10. Z. f. Imm.forsch. und exp. Therapie. I Teil Originale 1922 Band 35 blz. 344.
11. Ascoli. Grundriss der Serologie.
12. Münch. Med. Woch. 1926, blz. 1899, Ref.
13. Annales de l' Institut Pasteur 1905, blz. 249.
14. Verslagen en mededeelingen betr. de Volksgezondheid 1922 blz. 933.
15. Wolff-Eisner. Handbuch der exp. Therapie, Serum- und Chemotherapie. 1926. blz. 171.
15. Zeitschr. f. Imm. f. 1909 Bd. 3. Heft 2. blz. 208.
17. Zeitschr. f. Imm. f. 1909 Bd. 3. Heft 4. blz. 344.
18. Deutsche Med. Woch. 1913, No. 19.
19. The Journal of Hygiene Vol. XXII No. 1 Oct. 31, 1923.
20. Dieudonné und Weichhard. Imm Schutzimpf. und Serumtherapie. 1925, blz. 158.
21. Kolle und Wassermann. Handbuch der Pathogenen Mikro-organismen. 1913, blz. 288—289.

22. Wolff-Eisner. 1926. blz. 187.
 23. Münch Med. Woch. 1919, No. 34, blz. 954.
 24. Deutsche Med. Woch. 1919, blz. 597.
 25. Münch Med. Woch. 1919, blz. 343.
 26. Berliner Klin. Woch. 1918, blz. 1137.
 27. Berliner Klin. Woch. 1919, blz. 151.
 28. Klin. Woch. 1923 I blz. 440.
 29. Bulletin de l' Institut Pasteur 1923, blz. 205.
 30. Dieudonné und Weichhard 1925, blz. 102.
-

$\pm$ = geringe plaatselijke reactie.
 $+$ = klein lokaal infiltraat.
 $++$ = " "
 $+++$ = groot " "
 n = nekrose.
 $n.n.$ = sterke nekrose.
 $\dagger$ = dood.

Voor onderstaande proeven was de infectie-dosis 0,5 c.c. van de 48 uur oude diphtherie bouillon cultuur.

TABEL I

Cavia No	WIJZE VAN BEHANDELING	AANTAL DAGEN NA DE BEHANDELING									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Cultuur + 6 uur later 200 A.E. ongez. serum	—	+	+	+	+	+	$\pm$	$\pm$	—	—
2	idem	$\pm$	+	+	+	+	+	$\pm$	$\pm$	—	—
3	Cultuur + 6 uur later 200 A.E. gez. serum	$\pm$	+	+	+	+	+	$\pm$	$\pm$	—	—
4	idem	—	+	+	+	+	+	$\pm$	$\pm$	—	—

TABEL II

Cavia No	WIJZE VAN BEHANDELING	AANTAL DAGEN NA DE BEHANDELING									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Cultuur + 10 uur later 200 A.E. ongez. serum	+	+	++	++	++	++	+	+	$\pm$	$\pm$
2	idem	+	+	++	++	++	++	+	+	+	+
3	Cultuur + 10 uur later 200 A.E. gez. serum	+	+	++	++	++	++	+	+	+	$\pm$
4	idem	+	$\dagger$								

TABEL III

Cavia No.	WIJZE VAN BEHANDELING	AANTAL DAGEN NA DE BEHANDELING									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Cultuur + 12 uur later 200 A.E. ongez. serum	+	++	†							
2	idem	+	++	++	†						
3	Cultuur + 12 uur later 200 A.E. gez. serum	+	++	++	++	++	++	++	++	†	
4	idem	+	++	†							

TABEL IV

Cavia No.	WIJZE VAN BEHANDELING	AANTAL DAGEN NA DE BEHANDELING								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Cultuur + 12 uur later 900 A.E. ongez. serum	+	++	†						
2	idem	+	++	++	++	++	++	† distom.		
3	Cultuur + 12 uur later 900 A.E. gez. serum	+	++	†						
4	idem	+	++	++	†					

Voor de volgende proeven was de infectiedosis 0.7 c.c. van de 48 uur oude diphtherie bouillon cultuur.

TABEL V

Cavia No.	WIJZE VAN BEHANDELING	AANTAL DAGEN NA DE BEHANDELING									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Cultuur + 6 uur later 900 A.E. ongez. serum	±	+	+	+	±	±	—	—	—	—
2	idem	±	+	+	+	±	±	—	—	—	—
3	Cultuur + 6 uur later 900 A.E. gez. serum	±	+	+	+	±	±	—	—	—	—
4	idem	±	+	+	+	±	±	—	—	—	—

TABEL VI

Cavia No.	WIJZE VAN BEHANDELING	AANTAL DAGEN NA DE BEHANDELING									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Cultuur + 6 uur later 200 A.E. ongez. serum	±	+	+	+	+	±	—	—	—	—
2	idem	+	+	+	+	±	±	±	—	—	—
3	Cultuur + 6 uur later 200 A.E. gez. serum	+	+	+	+	±	±	—	—	—	—
4	idem	±	+	+	+	+	±	±	—	—	—

TABEL VII

Cavia No	WIJZE VAN BEHANDELING	AANTAL DAGEN NA DE BEHANDELING									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Cultuur + 10 uur later 200 A.E. ongez. serum	+	+	† distom							
2	idem	+	++	++	++	++	++	+	+	+	±
3	Cultuur + 10 uur later 200 A.E. gez. serum	+	†								
4	idem	+	++	†							

TABEL VIII

[illegible]

Voor de volgende proeven was de infectiedosis **0.5 c.c.** van een 48 uur oude diphtherie bouilloncultuur.

TABEL IIa

Cavia No.	WIJZE VAN BEHANDELING	AANTAL DAGEN NA DE BEHANDELING								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Cultuur + 10 uur later 200 A.E. ongez. serum	†								
2	idem	†								
3	Cultuur + 10 uur later 200 A.E. gez. serum	†								
4	idem	†								

TABEL IIIa

Cavia No.	WIJZE VAN BEHANDELING	AANTAL DAGEN NA DE BEHANDELING								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Cultuur + 12 uur later 200 A.E. ongez. serum	+	†							
2	idem	+	†							
3	Cultuur + 12 uur later 200 A.E. gez. serum	+	++	++	++	++	†			
4	idem	+	†							

TABEL IVa

Cavia No.	WIJZE VAN BEHANDELING	AANTAL DAGEN NA DE BEHANDELING							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1	Cultuur + 12 uur later 900 A.E. ongez. serum	+	†						
2	idem	+	++	†					
3	Cultuur + 12 uur later 900 A.E. gez. serum	+	†						
4	idem	+	†						

In beide volgende tabellen was de infectiedosis **0.7 c.c.** van de
48 uur oude diphtherie bouilloncultuur

TABEL VIIa

Cavia No.	WIJZE VAN BEHANDELING	AANTAL DAGEN NA DE BEHANDELING									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Cultuur + 10 uur later 200 A.E. ongez. serum	+	†								
2	idem	+	++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+
3	Cultuur + 10 uur later 200 A.E. gez. serum	†									
4	idem	+	++	†							

TABEL VIIIa

Cavia No.	WIJZE VAN BEHANDELING	AANTAL DAGEN NA DE BEHANDELING								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Cultuur + 10 uur later 900 A.E. ongez. serum	+	†							
2	idem	+	†							
3	Cultuur + 10 uur later 900 A.E. gez. serum	†								
4	idem	+	†							

In de volgende tabel bedroeg de infectiedosis 0.3 c.c. van de
48 uur oude diphtherie bouilloncultuur

TABEL IX

Cavia No.	WIJZE VAN BEHANDELING	AANTAL DAGEN NA DE BEHANDELING									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Cultuur + 10 uur later 900 A.E. ongez. serum	+	†								
2	idem	+	++	++	++	++	++	+	+	+	+
3	idem	+	†								
4	idem	+	†								
5	Cultuur + 10 uur later 900 A.E. gez. serum	+	†								
6	idem	+	†								
7	idem	+	†								
8	idem	+	†								

Voor alle volgende proeven was de infectiedosis 0.5 c.c. van een
48 uur oude diphtherie bouilloncultuur

TABEL X

Cavia No.	WIJZE VAN BEHANDELING	AANTAL DAGEN NA DE BEHANDELING									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Cultuur + 6 uur later 50 A.E. ongez. serum	+	+	+	+	+	±	±	—	—	—
2	Cultuur + 6 uur later 50 A.E. gez. serum	+	+	+	+	+	±	±	—	—	—
3	Cultuur + 6 uur later 25 A.E. ongez. serum	+	+	+	+	+	±	±	±	—	—
4	Cultuur + 6 uur later 25 A.E. gez. serum	+	+	+	+	±	±	±	—	—	—
5	Cultuur + 6 uur later 15 A.E. ongez. serum	+	++	++	+++	+++	+++	†			
6	Cultuur + 6 uur later 15 A.E. gez. serum	+	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++

TABEL XI

Cavia No.	WIJZE VAN BEHANDELING	AANTAL DAGEN NA DE BEHANDELING									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Cultuur + tegelijkertijd 10 A.E. ongez. serum	+	+	+	+	±	—	—	—		
2	Cultuur + tegelijkertijd 10 A.E. gez. serum	+	+	+	±	±	—	—	—	—	—
3	Cultuur + tegelijkertijd 5 A.E. ongez. serum	+	+	+	+	+	±	±	±	—	—
4	Cultuur + tegelijkertijd 5 A.E. gez. serum	+	+	+	+	+	+	+	±	—	—
5	Cultuur + tegelijkertijd 2½ A.E. ongez. serum	+	++	++	+++	+++ n	+++ n	+++ n	+++ n	+++ n	++
6	Cultuur + tegelijkertijd 2½ A.E. gez. serum	+	++	++	+++	+++ n	+++ n	+++ n	+++ n	+++ n	++
7	Cultuur + tegelijkertijd 1 A.E. ongez. serum	+	†								
8	Cultuur + tegelijkertijd 1 A.E. gez. serum	+	++	+++	+++	+++	+++ n	†			

TABEL XII

Cavia No.	INGESPOTEN HOEVEELHEID SERUM	Aantal dagen tot de infectie	Aantal dagen nà de infectie									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	200 A.E. ongez. serum	7	±	+	+	±	±	—	—	—	—	—
2	idem	14	+	†								
3	200 A.E. gez. serum	7	±	+	+	+	±	—	—	—	—	—
4	idem	14	+	†								

TABEL XIII

Cavia No.	WIJZE VAN BEHANDELING	Aantal dagen tot de reïnfectie	Aantal dagen nà de reïnfectie									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.5 c.c. gefiltr. cult. + 6 uur later 200 A.E. ongez. serum	6	±	±	±	—	—	—	—	—	—	—
2	idem	9	±	+	+	±	±	—	—	—	—	—
3	idem	11	+	+	++	++	++	+	+	+	±	±
4	idem	13	+	++	++	++	†					

TABEL XIV

[illegible]

TABEL XV

[illegible]

TABEL XX

Cavia No	WIJZE VAN BEHANDELING	Aantal dagen tot de infectie	Aantal dagen na de infectie									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	2 c.c. norm. paardeserum	1	±	±	±	—	—	—	—	—	—	—
2		Contrôle	+	†								
3	idem	2	±	±	±	—	—	—	—	—	—	—
4	idem	3	±	±	±	±	—	—	—	—	—	—
5		Contrôle	+	†								
6	idem	4	±	±	±	—	—	—	—	—	—	—
7	idem	6	±	+	+	±	±	±	—	—	—	—
8	idem	8	+	+	+	+	+	±	±	—	—	—
9		Contrôle	++	†								
10	idem	10	+	+	++	++	+	+	+	+	±	±
11	idem	13	+	++	++	†						
12	idem	15	++	++	†							
13		Contrôle	†									
14	idem		++	†								
15		Contrôle	++	†								

STELLINGEN

I.

Bij diphtherie verdient het gebruik van gezuiverd antitoxisch serum de voorkeur boven dat van ongezuiverd.

II.

De slotsom van Bingel, dat normaal antitoxinevrij paardeserum bij diphtherie dezelfde waarde zou hebben als specifiek antitoxisch serum, is in hare algemeenheid onjuist.

III.

Ter bereiking van akinesie bij oogoperaties, verdient de methode van v. Heuven de voorkeur boven die van v. Lint-Rochat.

IV.

Voor locaalanaesthesie verdient het gebruik van het mengsel „tutocaïne, eucupine en adrenaline” aanbeveling.

V

De tijd, die verloopt vanaf het oogenblik waarop het rijpe ei uit de gebarsten follikel te voorschijn treedt en het oogenblik van bevruchting, moet worden beschouwd als te behooren bij den leeftijd van het nieuwe organisme.

VI

Het voor het publiek verkrijgbaar stellen van Synthaline dient voorloopig sterk te worden afgekeurd.

VII.

Iodeering van het drinkwater, ter voorkoming van op verschillende plaatsen van ons land inheemsch kropgezwel, verdient geen aanbeveling.

VIII.

Een arts, die ter dekking van een kwakzalver toezicht houdt op diens onbevoegd uitoefenen van de Geneeskunst, maakt zich schuldig aan „handelingen die het vertrouwen in den stand der geneeskundigen ondermijnen" (in den zin van art. 1 van het gewijzigd ontwerp van wet, houdende nadere voorschriften ten aanzien van de uitoefening der Geneeskunst).

U
1