



Onderzoekingen over de bereiding en toepassing van gezuiverd anatoxine voor actieve onvatbaarmaking tegen diphtherie

<https://hdl.handle.net/1874/311441>

A. g. 192, 1932

Onderzoekingen over de bereiding en toepassing van gezuiverd anatoxine voor actieve onvatbaarmaking tegen diphtherie

J. P. VAN WAASBERGEN

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

ONDERZOEKINGEN OVER DE BEREIDING EN
TOEPASSING VAN GEZUIVERD ANATOXINE
VOOR ACTIEVE ONVATBAARMAKING TEGEN
DIPHThERIE

**ONDERZOEKINGEN OVER DE BEREIDING EN TOEPASSING
VAN GEZUIVERD ANATOXINE VOOR ACTIEVE ONVAT-
BAARMAKING TEGEN DIPHTHERIE**

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE

AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT
OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS
DR. L. S. ORNSTEIN, HOOGLEERAAR IN DE FACUL-
TEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE, VOLGENS
BESLUIT VAN DEN SENAAAT DER UNIVERSITEIT
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT
DER GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN OP **DINSDAG**
28 JUNI 1932, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR DOOR

JOHANNES PIETER VAN WAASBERGEN

ARTS TE STRIJEN

GEBOREN TE NIEUWERKERK AAN DEN IJSSEL



1932

DRUKKERIJ Fa. SCHOTANUS & JENS, UTRECHT

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

Aan mijn Ouders
Aan mijn aanstaande Vrouw

Het verschijnen van dit proefschrift biedt mij de welkome gelegenheid U, Hoogleraren, Oud-Hoogleraren en Docenten der Medische en Philosophische Faculteiten van de Utrechtsche Hoogeschool te danken voor het onderwijs, dat ik van U mocht genieten.

Gaarne breng ik ook een woord van dank aan de Hoogleraren MICHAËL, ENGELHARD en ROCHAT van de Medische Faculteit te Groningen, die tot mijn medische vorming hebben bijgedragen.

Zeergeleerde REMIJNSE, HEKMAN en KRAMER, U ben ik dankbaar voor het gedeelte der praktische opleiding, die ik heb mogen ontvangen in de Rotterdamsche Gemeente-Ziekenhuizen.

Hooggeleerde ALDERSHOFF, Hooggeachte Promotor, mijn warmste dank ben ik U verschuldigd voor alle moeite en tijd, die gij U gegeven hebt, ondanks Uwe drukke bezigheden van velerlei aard, bij de totstand-koming van dit proefschrift. Uw hartelijke en prettige wijze van omgang, het voorrecht kennis te hebben mogen nemen van de werkzaamheden in het Instituut en van Uwe onderzoekingen, hebben den tijd, op Uw Instituut doorgebracht, tot één der aangenaamste van mijn leven gemaakt.

Zeergeleerde PONDMAN, de vriendschappelijke tegemoetkomende wijze waarop gij mij verschillende moeilijkheden hebt helpen overwinnen, heeft mij zeer aan U verplicht.

Zeergeleerde TASMAN, het scheikundig karakter der onderzoekingen bracht mij met U tot nauwe aanraking en samenwerking. Uw hulp en raadgevingen heb ik zeer op prijs gesteld en het zal mij aangenaam zijn U steeds als vriend te mogen blijven beschouwen.

Zeergeleerde BRANDWIJK, Uw inzicht in wetenschappelijk onderzoek, heeft mij tot steun gediend.

Zeergeleerde JONKHOFF, voor de diensten, welke gij mij bewezen hebt bij de sectie van proefdieren, ben ik U dank verschuldigd.

Zeergeleerde TIMMERMANS, Uw vriendschappelijke omgang en hulpvaardigheid stemmen mij tot dankbaarheid.

Erkentelijk ben ik voor de welwillende medewerking, die ik van het personeel van het Rijks-Serologisch Instituut mocht ondervinden; in het bijzonder dank ik hierbij apotheker-assistent VAN DER SLOT en bediende THEO VAN DE VATHORST voor aan mij bewezen diensten.

INHOUD.

	Pag.
Inleiding	11

HOOFDSTUK I.

Geschiedkundig overzicht der actieve onvatbaarmaking tegen diphtherie	14
--	----

HOOFDSTUK II.

Zuivering van anatoxine	43
-----------------------------------	----

HOOFDSTUK III.

Beschrijving der gevolgde werkwijzen	53
--	----

HOOFDSTUK IV.

Eigen Onderzoek. Vergelijkende zuiveringsproeven . .	60
--	----

HOOFDSTUK V.

Eigen onderzoek. Vergelijkende immunisatieproeven. .	74
--	----

HOOFDSTUK VI.

Samenvatting	99
Geraadpleegde literatuur	104
Stellingen	119

INLEIDING

Reeds in de vroegste tijden werd in Egypte, Syrië en Palestina de ziekte diphtherie als een zeer gevaarlijke keelziekte beschouwd. In de Middeleeuwen en later moeten herhaaldelijk zware epidemieën Europa hebben geteisterd, terwijl ook in Amerika van 1771—1772 een uitgebreide en ernstige epidemie schijnt te hebben gewoed.

De naam diphtherie is door *Bretonneau*, vermoedelijk in 1855, in de literatuur ingevoerd.

In 1883 deelde *Klebs* op het congres voor inwendige geneeskunde te Wiesbaden mede, dat hij aan de peripherie van de diphtherie-membranen, die met methyleenblauw waren gekleurd, staafjes had gevonden. Deze staafjes geleken op den tuberculbacil, met dit verschil echter, dat zich sporen aan de uiteinden bevonden. Het was aan *Klebs* niet gelukt deze staafjes in reïncultuur te kweken. Aan *Loeffler* kwam in 1884 de eer toe de diphtherie-bacil te hebben geïsoleerd.

Loeffler beschouwde het in 1883 reeds door *Klebs* waargenomen en beschreven organisme als de oorzaak der diphtherie.

Vervolgens beschreef *Loeffler* een aantal experimenten met dieren, welke waren ingespoten met een reïncultuur van diphtheriebacillen.

Bij de sectie van deze dieren bleken de inwendige organen steeds vrij te zijn van bacillen, waarom *Loeffler* als oorzaak van den dood aannam een van de entingplaats uitgaande werking der microben. Hij veronderstelde verder, dat op de plaats van enting giftige stoffen werden gevormd, welke giften in den bloedstroom zouden worden opgenomen.

In 1887 deelde *Loeffler* mede, dat er naast de typische

virulente diphtheriebacil een niet virulente bacil in de keelholte voorkwam. Deze laatste vertoonde morphologisch veel overeenkomst met de diphtheriebacil, hoewel verschillen in groei en kolonies waren waar te nemen. *Loeffler* was toen reeds van meening, dat het dierexperiment noodzakelijk was om uit te maken of men al dan niet met een virulente stam had te doen. Dit niet virulente micro-organisme verkreeg den naam van pseudo-diphtheriebacil. In het zelfde jaar berichtte *Loeffler* tevens nog het belangrijke feit, dat twee caviae, die na enting met diphtheriebacillen waren genezen, in staat bleken meerdere inspuitingen met diphtheriebacillen te doorstaan.

Dit is een zeer belangrijke ontdekking geweest, omdat hierop onze tegenwoordige serumtherapie berust.

Behring en *Kitasato* hebben in 1890 het diphtherie-antitoxine gevonden.

Zij merkten op, dat de lichaamsvochten van dieren, welke waren ingespoten met microbenproducten, verkregen uit culturen van de bacil van Klebs-*Loeffler*, specifieke antidiphtherische eigenschappen gingen vertoonen.

De oorspronkelijke gedachte van *Behring* was toen, dat een prophylactisch middel tegen diphtherie zou zijn gevonden. Eerst later bleek dat de hoofdwaaarde van het antidiphtherieserum op therapeutisch gebied was gelegen.

Na deze onderzoekingen van *Behring* hebben de werken van *Roux* en *Yersin*, mededeelingen van *Martin* en *Chaillou* op het congres te Boedapest in 1894 nog meer licht over de antidiphtherische serumtherapie laten schijnen.

Hier te lande hebben in de jaren 1894—1895 *Ringeling*, spoedig gevolgd door *Spronck* en *Schimmel*, antidiphtheritisch paardeserum bereid.

Vanaf dien tijd is de mortaliteit van diphtherie progressief gaan dalen; de invloed op de morbiditeit was natuurlijk veel minder uitgesproken, daar dit alleen kan geschieden door middel van actieve onvatbaarmaking.

Reeds voordien in 1887 was het diphtherietoxine ontdekt door de bekende onderzoekers *Roux* en *Yersin*.

Deze zelfde schrijvers hebben ook toen al proeven verricht over de zuivering van het diphtherietoxine, waarvan de principes zijn aangegeven in hun klassieke werken (1888—1890).

In die jaren na de ontdekking van het diphtherietoxine werd veel gewerkt over de zuivering van dit toxine, maar hoofdzakelijk nog slechts met het theoretisch doel de natuur van het diphtherietoxine te leeren kennen.

Daarna kwam een periode van inzinking, omdat de proeven tot geen enkel belangrijk resultaat voerden.

De laatste jaren echter heeft men de studie over de toxine-zuivering, in het bijzonder van het diphtherietoxine, weer ter hand genomen, vooral sedert de invoering van het anatoxine door *Ramon* in de diphtherieprophylaxis.

Hier te lande heeft men, evenals in Engeland en Denemarken, tegen de plaatselijke reactie van het anatoxine, hoewel onschuldig, eenig bezwaar.

Daarom heeft dit tot nu toe, met uitzondering van Frankrijk, nog weinig algemeene toepassing gevonden.

Men zoekt nu naar een entstof, die de goede onvatbaar-makende werking bezit van het anatoxine, maar een minder sterke plaatselijke reactie veroorzaakt.

De wijze waarop, hier en elders, wordt getracht een hieraan beantwoordende bevredigende entstof te vinden, zal in dit proefschrift nader worden uiteengezet.

HOOFDSTUK I

GESCHIEDKUNDIG OVERZICHT DER ACTIEVE ONVATBAARMAKING TEGEN DIPHTHERIE

§ 1. Actieve onvatbaarmaking met diphtheriebacillen

Nadat *Loeffler* in 1887 reeds een paar waarnemingen hieromtrent had gedaan, deed *Behring* in 1890 mededeeling over proeven bij caviae, waarbij het hem zou zijn gelukt door voorbehandeling dezer caviae met diphtheriebacillen, waarvan de virulentie was verzwakt, hen tegen diphtherie te beschermen.

Om de virulentie dezer diphtheriebacillen te verzwakken, maakte hij gebruik van chemicaliën, voornamelijk joodtrichloride.

Vele jaren later in 1912 berichtten *Hewlett* en *Nankivell* weer, dat zij er in waren geslaagd caviae, door voorbehandeling met diphtheriebacillen, tegen de 3-4 voudige doodelijke dosis, d.l.m., te immuniseeren.

Petruschky in 1912 en *Johnson* in 1915 raadden aan kinderen te immuniseeren tegen diphtherie door inspuiting van met chloroform gedooide diphtheriebacillen.

Volgens de mededeelingen van *Park* en *Zingher* in 1916 zagen deze onderzoekers echter bij toepassing van diphtheriebacillenvaccins geen resultaten.

Löwenstein maakte gebruik van de percutane weg om te immuniseeren tegen diphtherie.

Hij nam voor dit doel culturen van diphtheriebacillen, niet gefiltreerd, gedood door formol en geëmulgeerd in een half doorschijnende visceuse vloeistof.

Zoowel bij proefdieren als bij den mensch zou hij met

behulp van deze methode goede resultaten hebben verkregen.

Baar en *Grabenhofer* berichtten eveneens over goede resultaten met de zalf van Löwenstein door herhaalde inwrijvingen der huid, 8 maal met een tusschenruimte van 8-14 dagen.

Becker daarentegen, evenals *Schmidt*, verkreeg met de methode volgens Löwenstein in het geheel geen resultaten.

In 1930 berichtten *Jakopp* en *Streit* (76)*) nog weer over proeven, verricht met de zalf van Löwenstein, en waarmede zij vrij gunstige resultaten zouden hebben bereikt.

De meeste schrijvers zijn het er echter over eens, dat de waarde van de methode Löwenstein gering is.

Böhme en *Riebold* (80) hebben in 1924 aanbevolen als middel ter immunisatie tegen diphtherie huidenting met een emulsie van levende diphtheriebacillen als een eenvoudige, ongevaarlijke en werkzame methode.

Deze, „diphtherielymphe” werd toegepast op dezelfde wijze als de koepokstof en als de entstof tegen tuberculose van Ponndorf, waarvan ook *Böhme* de bereider is.

Op grond van proeven bij caviae hebben zij 62 kinderen volgens deze methode behandeld.

In de huid der bovenarm werden ongeveer 20 dicht aangrenzende entstrepen aangelegd, waarna de lymphe hierop werd gebracht en overgelaten aan opdrooging.

Zij verkregen hiermede goede resultaten en vonden, dat van het gebruik van levende, toxineafscheidende diphtheriebacillen, geen nadeelige gevolgen zijn te vreezen.

Toch bezit deze methode zooveel nadeelen en gevaren, dat praktische toepassing geen aanbeveling verdient.

Den laatsten tijd hebben *Legroux*, *Ramon*, *Debré* en *Thiroloux* (54) weer bericht over immunisatieproeven bij paarden, waarbij zij levende diphtheriebacillen als antigeen gebruikten, welke subcutaan werden ingespoten. Na de inspuiting zouden ze in het subcutane weefsel gaan groeien en toxinen produceeren, welke toxinen in het dierlijk organisme worden

*) De tusschen haakjes geplaatste nummers verwijzen naar de geraadpleegde literatuurlijst.

opgenomen en tot vorming van specifieke antitoxinen zouden aanleiding geven.

§ 2. Actieve onvatbaarmaking met diphtherietoxinen

De eerste pogingen om menschen te immuniseeren door middel van veelvuldige onderhuidsche inspuitingen met langzamerhand stijgende doses diphtherietoxine zijn verricht door *Dserzgowsky* (96).

Reeds in 1902 deelde deze schrijver zijn eerste proeven hieromtrent mede, welke proeven waren verricht bij caviae.

De duur der immunisatieperiode bedroeg ruim 3 maanden en gedurende deze tijd verrichtte hij 24 inspuitingen. Bij zich zelf uitgevoerde experimenten hebben hem toen getoond, dat het inbrengen van diphtherietoxine in het menschelijk organisme, met in acht nemen van bepaalde voorzorgen, volkomen onschadelijk en ongevaarlijk is.

Zijn hoop, dat de praktizeerende artsen deze methode in toepassing zouden brengen, werd echter niet verwezenlijkt.

Dserzgowsky ging daarom toen over tot andere methoden, die minder gevaarlijk waren en minder tijd vergden, namelijk intratracheale infusies en -inhalaties, alsmede langs den weg der gifresorbtie door het slijmvlies der neus- en mondholte.

Hierbij ging deze onderzoeker uit van het denkbeeld, dat de natuurlijke immuniteit tegen diphtherie bij een bacillendrager of een infectie met diphtheriebacillen zich ontwikkelt door binnendringen der toxinen in het organisme langs de slijmvliesen van den tractus respiratorius.

Proeven bij paarden hadden gediend als basis om een zelfde methode uit te werken voor den mensch.

Deze proeven hadden als resultaat opgeleverd, dat immuniseering vanuit het slijmvlies der neus door inbrengen van met toxine gedrenkte wattentampons in de neusgaten, alle twee dagen gedurende ongeveer een half uur, evenals vanuit het slijmvlies van de larynx door inhaleeren van een verstoven toxineoplossing, werkzaam en onschadelijk is. Deze behandeling werd gedurende vrij langen tijd herhaald.

Op het geneeskundig congres te St.-Petersburg in 1909 heeft *Dserzgowsky* deze immunisatieproeven bij kinderen vertoond.

Als voordeel van deze methode werd door *Dserzgowsky* genoemd eenvoudigheid, omdat ze ook uitvoerbaar is door niet-artsen en daardoor voor immuniseering der massa gemakkelijk aan te wenden. Bovendien kon ze langen tijd achtereen worden uitgevoerd zonder reactie van het organisme en zou een duurzame immuniteit worden verkregen.

Eindelijk zou met deze methode ook nog worden tevoorschijn geroepen een locale immuniteit van de tractus respiratorius tegen diphtherie.

In de latere jaren zijn door verschillende onderzoekers (*Blumenau, Magyar en Schick, Boldireff, Moody, Courie, Bauer, Opitz, Scholz*) proeven genomen met de oorspronkelijke methode van *Dserzgowsky*, echter met zeer wisselende resultaten.

Door geen van hen is evenwel deze methode in de praktijk doorgevoerd, omdat een groot aantal inspuitingen noodig zijn, en bovendien locale reacties en ziektegevallen bij gevoelige personen kunnen voorkomen.

Voordat *Dserzgowsky* zijn proeven verrichtte om menschen onvatbaar te maken met behulp van de beschreven subcutane methode, was aan *Behring* bij proeven op paarden reeds gebleken, dat de onvatbaarheid dezer dieren goed tot stand was te brengen door subcutaan inspuiten van diphtherietoxine.

Om de moeilijkheden der soms doodelijke toxinerwerking te voorkomen, gebruikte *Behring* eerst joodtrichloride ter vermindering van de giftigheid.

Ook dit liet hij tenslotte weg en immuniseerde zijn paarden met behulp van diphtherietoxine, verdund door middel van physiologische keukenzoutoplossing.

De pogingen van *Besredka* (66) om langs percutanen weg bij caviae immuniteit te verkrijgen door het brengen van

diphtherietoxine op de geschoren of gescarificeerde huid, zijn bijna geheel mislukt.

Denis Szüle hervatte later deze experimenten van *Besredka*, maar met vervanging van het vloeibare toxine door toxine, ingesloten in een mengsel van lanoline en vaseline. Hij was evenwel met deze proeven niet gelukkiger dan *Besredka*.

Dezelfde proeven werden ook verricht op het konijn, welke gevoeliger dan de cavia bleek te zijn voor toxine, dat op de huid werd gebracht, en waarbij een zekere immuniteit werd verkregen.

Uit proeven van *Brandwijk* (15) bij caviae bleek, dat toxine, toegediend per os, geen onvatbaarmakende werking heeft.

Volgens de ervaring van het R.S.I., is subcutane inspuiting van een langzamerhand stijgende dosis diphtherietoxine bij paarden, op het oogenblik nog de beste methode voor het verkrijgen van antitoxisch serum.

De proef van *Schick*, hoewel uitsluitend gebruikt voor diagnostische doeleinden, oefent eigenlijk ook nog een soort actieve onvatbaarmaking uit. Deze proef is in 1912 door *Schick* ingevoerd en beschreven.

Meerdere malen uitvoeren der proef van *Schick* is in staat een vorming van antilichamen te voorschijn te roepen en de positieve reactie te laten overgaan in een negatieve (*Nasso, Aldershoff*). Vandaar is eigenlijk de intracutane reactie met diphtherietoxine geen geschikte maatstaf voor de waardeering van een immuniseeringsmethode.

Bieber heeft zich nog eens bezig gehouden met het verkrijgen van onvatbaarheid bij menschen door intracutane inspuitingen van sterk verdund toxine. Hiertoe waren echter veel inspuitingen noodig, hetgeen een groot bezwaar vormde en waarom hij hiervan reeds spoedig weer is teruggekomen.

Bij de reactie van *Schick* wordt gebruik gemaakt van een goed gestabiliseerd, met physiologische keukenzoutoplossing verdund, 0,5 % carbol bevattend diphtherie-vergif, ter sterkte van $\frac{1}{50}$ d.l.m. per 0,2 c.c.

Indien de intracutane inspuiting van 0,2 c.c. van deze gifverduunning geen reactie verwekt, is in het bloed een voldoende hoeveelheid diphtherie-antitoxine aanwezig, om het individu tegen diphtherie te beschutten.

Met deze inspuiting kan men evenwel niet steeds volstaan, omdat het diphtherie-vergif, behalve diphtherietoxine, dat niet in zuiveren toestand te verkrijgen is, nog andere onbekende bacillaire producten bevat, die bij sommige menschen, voornamelijk bij volwassenen, een lichte ontsteking op de plaats der intracutane inspuiting veroorzaken.

Om deze z.g. pseudoreactie gemakkelijk te onderkennen van de echte positieve reactie spuit men, in de huid van den linker onderarm 0,2 c.c. diphtherie-vergif, gedurende 10 minuten op 75° C. verhit, waarin dus de toxine onwerkzaam is gemaakt; in de huid van den rechteronderarm 0,2 c.c. van hetzelfde vergif, onverwarmd.

De inspuiting vindt plaats aan het bovenste $\frac{1}{3}$ gedeelte van de buigzijde van den onderarm, tusschen de venen.

Terwijl de oorspronkelijke raad van *Schick* luidde, de reactie af te lezen na 2 maal 24 uur, moet dit volgens *Aldershoff* (1) zijn „niet eerder dan 3 maal 24 uur”, omdat de pseudo-reactie dan reeds weer aan het verbleeken is en de proef dus beter te beoordeelen.

Bij het aflezen kunnen wij het volgende onderscheiden:

I. *Negatieve reactie*: het individu is onvatbaar voor diphtherie, beschikt althans over voldoende vrij antitoxine om het toxine bij de reactie ingebracht, te verhinderen zijn werking te ontvouwen.

Van de negatieve reactie onderkent men twee typen:

Type A: aan geen van beide armen treedt ontsteking op. Het individu is dus bovendien ongevoelig voor aspecifieke eiwitten.

Type B: „pseudoreactie”: kort na de inspuiting treedt aan beide armen lichte ontsteking van gelijke grootte op, die binnen 2—3 dagen verdwijnt en te beschouwen is als gevolg

van individuele gevoeligheid voor onbekende stoffen, die zoowel in het verwarmde, als in het niet-verwarmde diphtherie-vergif voorkomen.

II. *Positieve reactie*: het individu is vatbaar voor diphtherie. beschikt dus niet over voldoende vrij antitoxine om de werking van het ingebrachte toxine te verhinderen.

Ook van de positieve reactie onderkent men twee typen.

Type A: alleen aan den rechter arm treedt ontsteking op, gekenmerkt door roodheid en zwelling. In dit geval is elke ontsteking, al is zij ook gering, als positieve reactie op te vatten.

Type B: „gecombineerde reactie”: aan beide armen volgt ontsteking. Aan den linker arm treedt een lichte ontsteking op, die binnen 2—3 dagen verdwijnt en veroorzaakt wordt door de aspecifieke eiwitten van het verhitte toxine. Aan den rechter arm ontstaat tezelfder tijd een ontsteking grooter dan die aan den linker arm en toenemende, want ze is de som der ware toxine- en der aspecifieke reactie, die 5—8 uren na de inspuiting een aanvang neemt en gewoonlijk haar maximum bereikt na drie dagen. De ware toxinereactie treedt dus later op dan de pseudoreactie en blijft langer bestaan. Leest men de reactie niet eerder dan op den derden dag af, dan kan men de reactie met verhit toxine achterwege laten. De aspecifieke pseudoreactie toch is op den derden dag reeds grootendeels verdwenen, de ware reactie pas op haar maximum.

Algemeen wordt aangenomen dat onvatbaarheid voor diphtherie daarop berust, dat een voldoende hoeveelheid antitoxinen in het bloed aanwezig is, of tenminste tijdig door de lichaamscellen kan worden gevormd. Want enkele personen met een positieve reactie van Schick kunnen een latente, cellulaire, histogene onvatbaarheid bezitten; zij vormen bij infectie snel antitoxinen en hun reactie kan daarop vlug negatief worden. (*Aldershoff, Ten Bokkel Huinick.*)

Aan den anderen kant zijn de gevallen toch ook niet zoo zeldzaam, dat personen met een negatieve reactie van Schick nog worden aangetast door diphtherie.

Het antitoxine alleen zou niet voldoende beschermen, wanneer de overige beschermende krachten ontoereikend zijn.

Hoewel over de beteekenis van het antitoxine zelf geen twijfel behoeft te bestaan, zou men moeten aannemen, dat de vorming van antitoxinen slechts is een factor van het totale weerstandsvermogen tegen diphtherie.

Na inspuiten van een entstof of het uitvoeren der reactie van Schick kan ook een negatieve phase optreden, gepaard gaande met een vermindering van de hoeveelheid antitoxine in het bloed en van het totale weerstandsvermogen tegen diphtherie, waarom sommige schrijvers, o.a. *Siegl* (75), actieve onvatbaarmaking, in tijden dat veel diphtheriegevallen voorkomen, afraden.

Volgens het bovenstaande kan men dus geen absolute waarde toekennen aan de reactie van Schick voor de al of niet aanwezigheid van onvatbaarheid.

De reactie zou negatief uitvallen, naar de opgave van *Schick* zelf, wanneer het bloedserum een hoeveelheid antitoxinen van $\frac{1}{30}$ A.E. of meer bevat. Andere schrijvers weer (*Kolmer* en *Moshage*, *Ten Bokkel Huinck*, *Kassowitz*, *Wernicke* en *Schmidt*) geven waarden op beneden of boven deze door *Schick* aangegeven grens.

Volgens *Alderhoff* (1) is de proef van Schick niet meer dan een reactie op de al of niet aanwezigheid van vrij antitoxine; *Kramer* (18) drukt zich aldus uit: „ze laat toe een schatting van het antitoxinegehalte van het bloed”.

Glenny en de staatscommissie in Engeland (154) stellen aan de test-dosis voor de Schick-proef, welke moet beantwoorden aan $\frac{1}{50}$ d.l.m., bovendien de eisch, dat zijn neutraliseerend vermogen moet liggen tusschen $\frac{1}{1250}$ en $\frac{1}{750}$ A.E.

Hiermede is in vroeger jaren niet voldoende rekening gehouden, waardoor de statistische opgaven over het resultaat der methoden tot actieve immunisatie, nagegaan met behulp der reactie van Schick, veel van hun waarde verliezen.

Hierdoor wordt ook begrijpelijk, dat de verschillende onderzoekers niet dezelfde waarde aan antitoxine in het bloed

hebben gevonden, waarbij de proef van Schick negatief uitvalt.

§ 3. Actieve onvatbaarmaking met diphtherie toxine-antitoxine mengsels.

Reeds vanaf 1895 werd gebruikt een mengsel van toxinen en antitoxinen voor actieve onvatbaarmaking tegen diphtherie, in wisselende onderlinge verhouding, aanvankelijk slechts bij paarden en caviae.

Babes (1895), *Wernicke* (1895), *Park* (1896), *Dreyer* en *Madsen* (1896), hebben dergelijke mengsels gebruikt.

Theobald Smith heeft echter als eerste in 1907, op grond van zijn succesvolle proeven bij caviae, deze methode ook aanbevolen voor toepassing bij den mensch.

De eerste entingen bij den mensch met T.A.-mengsels werden evenwel, na voorproeven gedurende vele jaren bij dieren, uitgevoerd door *Behring* en zijn medewerker *Hahn* (97).

Op het congres voor inwendige geneeskunde te Wiesbaden in 1913 werden hieromtrent door *Behring* mededeelingen gedaan.

Vooraf ging een voordracht van *Hahn*, waarin deze aantoonde, dat antidiphtherie-serum prophylactisch slechts weinig nut heeft, wegens de te korte duur der bescherming, als gevolg van het feit, dat soortvreemd serum vlug aan proteolyse wordt onderworpen.

In aansluiting aan deze voordracht berichtte toen *Behring* over een nieuw prophylactisch middel om te gebruiken voor actieve onvatbaarmaking tegen diphtherie, bestaande uit een mengsel van toxine en antitoxine.

Het middel was volgens hem volmaakt onschadelijk en er trad een werkelijke bescherming op, aantoonbaar door de vorming van een groote hoeveelheid beschermende stoffen in het bloed der geënten, die alle vrij van diphtherie bleven.

Bij de discussie werd door *Matthes* eveneens medegedeeld een geval, waarbij actieve onvatbaarmaking was verricht met dit nieuwe middel. Een eenigermate levendige reactie hierbij was echter toen door hem waargenomen.

Behring zegt omtrent zijn nieuw middel alleen het volgende: „Mein neues Mittel ist eine Mischung von sehr starkem Diphtheriegift mit Antitoxinen in solchem Verhältnis, das die Mischlösung im Meerschweinversuch nur einen geringen oder gar keinen Toxinüberschuss aufweist.”

Hij laat zich dus over de juiste samenstelling van zijn mengsel niet uit.

Bij het door *Aldershoff* (1) ingestelde onderzoek naar de samenstelling van het T.A.-mengsel *Behring*, afkomstig van de *Behring Werke*, bleek dit niet altijd dezelfde te zijn en de giftigheid vertoonde niet onbelangrijke verschillen.

De door *Behring* aangegeven methode hield in, dat de entingen, 3—5 in aantal, intracutaan moesten worden uitgevoerd.

Behring heeft deze enting bij den mensch intracutaan toegepast, onder invloed van de toen sterk verbreide meening, dat de huid een goede vormer van immuunstoffen zou zijn, een meening, welke in haar algemeenheid echter volstrekt niet is bewezen.

De ervaringen, opgedaan met de methode *Behring*, zijn over het algemeen niet groot, in verhouding misschien nog het grootst hier te lande (*Aldershoff*, *Ten Bokkel Huinick*, *Kramer*, *Hulshoff Poll*).

In ons land zijn door genoemde onderzoekers een groot aantal kinderen volgens de methode *Behring* geënt en de uitkomsten lieten een bevredigend oordeel toe.

Bieber heeft ook nog intracutane entingen verricht met een T.A. mengsel, waarin meer antitoxine aanwezig was dan in het mengsel van *Behring*. Ook hij gaf echter weer niet de juiste samenstelling op van zijn mengsel.

In verband met de resultaten van zijn inspuitingen meende *Behring* te kunnen zeggen, dat bij geregelde toepassing van zijn T.A.-mengsel, de diphtherie als endemische ziekte tot verdwijnen zou zijn te brengen en zou ophouden een gevreesde volksziekte te zijn.

De intracutane methode bezat het voordeel dat het verloop

der reactie met het oog kon worden vervolgd. Niettegenstaande dit voordeel bleken aan deze methode toch eenige belangrijke nadeelen te kleven:

1. De intracutane enting is vooral bij massa-entingen technisch niet eenvoudig en nogal pijnlijk.

2. De herhaalde entingen, telkens gevolgd door de proef van Schick om hun onvatbaarmakend vermogen na te gaan, vergden veel van de kinderen en hun ouders, zoowel als van den arts.

3. De juiste samenstelling van het T.A.-mengsel van Behring was niet bekend.

Bovenstaande bezwaren hebben er toe geleid, dat de intracutane methode van Behring werd vervangen door de subcutane, een methode, die is aangegeven door *Park* en *Zingher*.

Deze onderzoekers begonnen ongeveer tegelijkertijd hun studies over T.A.-mengsels als *Behring*, en de groote belangstelling, die tegenwoordig de actieve onvatbaarmaking tegen diphtherie over de geheele wereld geniet, is voor een niet gering gedeelte aan genoemde Amerikaansche schrijvers te danken.

Voor hun methode zijn drie subcutane inspuitingen van 1 c.c. noodig, telkens met tusschenruimte van een week.

De samenstelling van het mengsel van *Park* en *Zingher* is nauwkeurig bekend en dit mengsel is op groote schaal toegepast.

Zooals bekend is, worden bij de toxine-antitoxine-mengsels 3 soorten onderscheiden:

1. *Onderneutrale mengsels*, d.w.z. waarin het aanwezige toxine slechts gedeeltelijk door het antitoxine is geneutraliseerd en dat dus een overschot aan toxine bevat.

De onderzoekingen hebben bevestigd, dat de licht toxische mengsels de beste uitkomsten geven. Onder deze rubriek behoort thuis het mengsel van *Park* en *Zinger*, evenals het reeds genoemde van *Behring*, en T.A.U.

2. *Neutrale mengsels*, d.w.z. waarin het aanwezige toxine

geheel is geneutraliseerd door het antitoxine. Door bepaalde voorzorgen wordt dit mengsel zoo bereid dat het niet vlokt. Een dergelijk mengsel werd door *Bieber* voor de intracutane enting gebruikt.

3. *Overneutrale mengsels*, d.w.z. waarin na neutralisatie van het aanwezige toxine nog vrij antitoxine over is. Voor de bescheiden proeven, welke in Frankrijk door *Renault* en *Lévy* omtrent de subcutane methode van Park en Zingher zijn verricht, werden zulke overneutrale mengsels gebruikt.

Bij de bereiding van T.A.-mengsels moet van ieder te gebruiken toxine vooraf nauwkeurig het antitoxinebindend vermogen worden bepaald; men moet dus niet uitgaan van een schema, ontleend aan de theoretische verhoudingen tusschen L₊, d.l.m. en A.E.

De oorspronkelijke samenstelling van het T.A.-mengsel van Park en Zingher was 0,85 L₊ + 1 A.E. d.w.z. dat een hoeveelheid antitoxine, die in staat is 100 d.l.m. te binden, gemengd wordt met het $\frac{85}{100}$ deel van de L₊ d.i. de hoeveelheid toxine, die gemengd met 1 A.E. nog juist in staat is een cavia van 250 gr. in 4 dagen te doodden, dus nog 1 d.l.m. vrij toxine bevat. Contrôle door proeven op dieren blijft steeds noodzakelijk, waarbij door *Banzhaf*, die de mengsels van Park en Zingher standaardiseert, voor dit oude mengsel 0,85 L₊ + 1 A.E. wordt aangegeven dat 1 c.c. bij een cavia van 350 gr. slechts een gering infiltraat mag geven en geen verlamming, terwijl 5 c.c. een duidelijke locale reactie gevolgd door verlamming, dus geen acute dood, mag veroorzaken. Dit mengsel bevat dus een groote hoeveelheid toxine, dat echter voor een groot deel is geneutraliseerd.

Later kwam men tot de overtuiging dat dezelfde uitwerking was te bereiken door een kleinere hoeveelheid toxine in te spuiten, die voor een kleiner gedeelte door antitoxine is geneutraliseerd.

Tevens had men hierbij het voordeel, dat een dergelijk mengsel minder proteïnen, afkomstig van bacteriëlichamen

en den voedingsbodem, en minder eiwit, afkomstig van het voor neutralisatie toegevoegde serum bevatte. En dit laatste was zeker als een voordeel te beschouwen, daar toch herhaalde inspuiting, ook van zeer kleine hoeveelheden vreemd eiwit, het gevaar voor overgevoeligheid doet ontstaan.

Volgens deze inzichten hebben *Park* en *Zingher* hun nieuw T.A.-mengsel bereid.

Dit bevat per c.c. $0,1 \text{ L} + 0,075 \text{ A.E.}$, dus per c.c. heel wat minder toxine, maar absoluut en in verhouding ook minder antitoxine. Ook dit mengsel wordt gecontrôleerd door dierproeven: 1 c.c. moet steeds verlamming geven, die meestal na 18 dagen doodelijk afloopt, terwijl 5 c.c. in 10 dagen, maar niet eerder, den dood veroorzaakt. Dit mengsel is wat meer toxisch dan het vroeger gebruikte, maar de reactie bij den mensch is geringer doordat het minder proteïnen bevat.

De onvatbaar makende werking bleek even goed te zijn als van het vroeger gebruikte mengsel. Na de mededeelingen van *Park* en *Zingher* werd dit laatste mengsel volgens het beginsel dezer schrijvers door *Aldershoff* bereid en door het R.S.I. als T.A.U. (Utrecht) afgeleverd. De samenstelling van T.A.U. wisselt van $0,1 \text{ L} + 0,075 \text{ A.E.}$ tot $0,1 \text{ L} + 0,125 \text{ A.E.}$, welk laatste mengsel dan nog licht toxisch is.

Teneinde te voorkomen dat met T.A. behandelde kinderen tegen paardeeiwit worden gesensibiliseerd en latere inspuiting met serum afkomstig van paarden anaphylaxie zou kunnen geven, is in het R.S.I. reeds van den aanvang af T.A.U. bereid met diphtherieserum afkomstig van schapen. Ook elders is men daar later toe overgegaan.

Dat dit noodig is, blijkt o.a. uit doodelijke gevallen van anaphylactische shock na inspuiting van paardeserum bij kinderen die in Amerika vroeger waren behandeld met T.A. van paardeserum bereid (*Waldbott*, The Journ. of the Amer. Med. Association, Vol. 98, No. 6, 1932).

Het is noodzakelijk de bereide T.A.-mengsels eerst ouder te laten worden om zodoende de binding vaster te maken.

Bovendien moet men voor de bereiding dezer mengsels

oude belegen, gestabiliseerde toxinen gebruiken, waarop *Behring* reeds de aandacht heeft gevestigd.

Tevens is noodig dat het gebruikte serum een hooge aviditeit bezit, dus krachtig toxine bindt.

Het product wordt gecontrôleerd op een groot aantal dieren, daarna eenige maanden bewaard en vóór de uitgifte weer onderzocht.

In de literatuur wordt wel beweerd, dat lage temperatuur in staat zou zijn omzettingen in de mengsels te weeg te brengen.

De strenge winter van 1929 was voor *Aldershoff* (7) een geschikte gelegenheid om de invloed van lage temperatuur op toxine-antitoxinemengsels na te gaan. Uit zijn onderzoek heeft hij de conclusie kunnen trekken dat het gevaarlijk giftig worden van een phenolbevattend T.A.-mengsel slechts bestaat bij mengsels van het type $0,85 L_{+} + 1 L_{+}$.

Het T.A.U., dat van het type $0,1 L_{+}$ is, verdraagt be-
vriezing zonder gevaarlijk giftig te worden.

De invloed der lage temperatuur bleek afhankelijk te zijn van verschillende factoren, in het bijzonder van de samenstelling van het T.A.-mengsel, de duur der bevrozing en van het toegevoegde conserveermiddel. Wanneer aan T.A.-mengsels, in plaats van $\frac{1}{2} \%$ phenol, 1% superol wordt toegevoegd, dan vlokken ze niet uit door bevrozing en worden ook niet giftiger; de ontledende werking van phenol wordt hiermede dus voorkomen.

Met kleinere giften dan 1 c.c. zouden misschien even goede resultaten zijn te verkrijgen; het onderzoek van *Aldershoff* (1) wees in de richting van een bevestigend antwoord.

Loewenthal sprak zich positief uit door te zeggen dat kleine giften hetzelfde doen als groote. Hij beval daarom voor subcutane inspuiting hoeveelheden van 0,1 tot 0,2 c.c. aan.

Zeker is dat elke actieve onvatbaarmaking met toxine-antitoxinemengsels berust op de langzame splitsing der T.A.-binding in het lichaam, dus op het vrij komen van toxine, zoodat de geënte persoon wordt onderworpen aan een langdurig aanhoudende prikkel. Ook het feit, dat het maximum

aan immuniteit eerst meerdere maanden na de inspuiting optreedt, laat zich niet verklaren door de geringe hoeveelheid vrij gif, waarvan de immuniseerende werking na 2 weken voorbij is, maar slechts door het langzame splitsen der T.A.-binding.

De ervaring heeft geleerd dat de tijdsduur, waarna het maximum aan immuniteit optreedt, des te grooter is naarmate de T.A. binding vaster is, en dat de hoogte van de tenslotte te bereiken antitoxinetiter afhangt van de hoeveelheid gif-eenheden, welke in gebonden vorm worden toegediend, een soort depôtwerking. Daarnaast speelt de omstandigheid of het T.A.-mengsel neutraal, overneutraal of onderneutraal is, slechts een rol in verband met de snelheid in optreden van vrij antitoxine. Is het mengsel ondergeneutraliseerd, dan oefent het weinige vrije gif een bepaalde ictus immunisatorius uit en versnelt daarmee het intreden der onvatbaarheid. Bij gebruik van een overneutraal mengsel speelt het proces der actieve onvatbaarmaking zich langzamer af.

Glenny heeft door middel van dierproeven met zekerheid aangetoond, dat een tweede of volgende inspuiting van een kleine hoeveelheid van een T.A.-mengsel een veel krachtiger en sneller vorming van antitoxinen tengevolge heeft dan de eerste inspuiting. Hij sprak van „primary and secondary stimulus”. Bij den mensch is dit aangetoond door *Ten Bokkel Huinick* en *Aldershoff*.

Zoowel met het mengsel van *Behring* als dat van *Park* en *Zingher* verlopen minstens twee maanden alvorens de onvatbaarheid na de enting ontstaat. Volgens *Aldershoff*, zou de onvatbaarheid na behandeling met T.A.U. als regel eerst ontstaan 6—12 weken na de laatste enting.

Vandaar kon de actieve onvatbaarmaking tegen diphtherie geen toepassing vinden bij onmiddellijk dreigend besmettingsgevaar. De verkregen onvatbaarheid met T.A.-mengsels zou volgens *Park* en *Zingher* in minstens 90 % der gevallen een minimumduur van 7 jaar bezitten. Na de 3 inspuitingen met het T.A.-mengsel zou in 80 à 85 % der gevallen de positieve

reactie van Schick veranderen in een negatieve; *Park* en *Zingher* geven als maximum op 92 % nuttig effect. Met het T.A.U. van het R.S.I. bereikte *Seligmann* (74) een negatief worden der reactie van Schick bij 95 % der geënte kinderen.

Deze gegevens verliezen nu echter veel van hun vroegere waarde na de studie van *Glenny* over de waardeering der reactie van Schick.

De meeste entstatistieken toch berusten nog op de resultaten verkregen door middel van de reactie van Schick. Bovendien moet men hierbij nog rekening houden met het feit, dat ook zonder enting ongeveer 70 % der kinderen op den leeftijd van 10 jaar Schick negatief wordt. Het statistisch bewijs voor het praktisch resultaat der actieve onvatbaarmaking kan daarom eigenlijk alleen worden geleverd door vergelijking der ziektecijfers bij geënten en niet-geënten.

Een dergelijk statistisch bewijs over een zeer groot materiaal is geleverd door *Park*. Deze vergeleek twee groepen van elk 90.000 schoolkinderen, waarvan de eerste groep bestond uit 57.000 van tevoren Schick negatieve en daardoor niet geïmmuniseerde kinderen, en uit 33.000 oorspronkelijk Schick positieve, geïmmuniseerde kinderen, terwijl de tweede groep noch gecontrôleerd, noch geïmmuniseerd was. Bij de niet geïmmuniseerde kinderen van groep 2 vond hij het ziektecijfer $\pm 5,5$ maal groter als bij de geïmmuniseerde kinderen van groep 1. Hierbij werd verondersteld dat zich onder de tweede groep ook 57.000 oorspronkelijk Schick negatieve kinderen bevonden, met hetzelfde lage ziektecijfer als die uit de eerste groep.

Aanvankelijk was men in de voorafgaande jaren over de verkregen resultaten met het T.A.U. in ons land zeer tevreden. De gemeente *Uitgeest* ging daarbij als baanbreker voor toepassing van het T.A.U. in andere gemeenten voorop (17).

De statistiek van *Overbosch* (10) uit *Arnhem*, loopende over 1 Febr. 1930—15 Mei 1930, heeft evenwel weer twijfel doen ontstaan, daar deze èn wat betreft de morbiditeit èn wat betreft de mortaliteit afwijkt in ongunstigen zin van de tot nu toe gepubliceerde opgaven uit andere gemeenten. De

laatste statistiek van *Seligmann* (74) echter, welke een vergelijkend onderzoek heeft ingesteld met anatoxine Ramon, T.A.U. en de zalf van Löwenstein, is echter weer zeer gunstig voor het T.A.U.

Over het geheel genomen stond echter bij het onderzoek van *Seligmann* het anatoxine aan de spits.

In het algemeen zijn de locale- en algemeene reacties na de inspuiting van T.A.-mengsels gering. Gewoonlijk doet de eerste inspuiting het meest intensief reageeren; jeugdige personen reageeren het minst. Wanneer locale reacties voorkomen, dan worden deze veroorzaakt gedeeltelijk door het diphtherietoxine zelf, gedeeltelijk en vaker door niet specifieke begeleidende stoffen.

Het T.A.U. is bij minstens 150,000 kinderen in ons land toegepast en reactieverschijnselen van eenige beteekenis, behoudens lichte roodheid op de plaats van inspuiting, zijn daarbij nooit voorgekomen.

Dit feit heeft volgens *Aldershoff* de enting tegen diphtherie hier te lande zonder tegenkanting op zoo ruime schaal ingang doen vinden.

Het voornaamste bezwaar tegen het gebruik van onderneutrale T.A.-mengsels is en blijkt hun giftigheid. Zooals reeds is vermeld, wordt in de literatuur wel beweerd dat T.A.-mengsels weinig standvastig zijn; de ruime ervaring van het R.S.I. heeft echter geleerd dat T.A.U., en waarschijnlijk elk goed bereid T.A.-mengsel, zoo weinig van samenstelling verandert, dat reeds voor eenige jaren bereid T.A.U. nog zonder bezwaar is te gebruiken.

Alleen in het buitenland zijn ziektegevallen en gevallen met doodelijke afloop voorgekomen (5, 46, 68) door: fouten (Amerika 1919, België 1922 en 1928), verzuimen bij de bereiding (Oostenrijk 1924), ondeskundige bewaring (Amerika 1923), fouten tegen de steriliteit der entstof (China, Australië 1927).

Deze voorgekomen ongevallen doen dan ook niets af aan de waarde der methode.

Het T.A.-mengsel, goed bereid, goed bewaard en goed gebruikt, is onverdiend er van verdacht kwaad te hebben gesticht.

Het R.S.I. is daarom ook steeds de verantwoordelijkheid voor het T.A.U. blijven aanvaarden.

Aldershoff (5) schrijft dan ook zeer terecht: „De bereiders dragen de verantwoordelijkheid voor de goede bereiding, de geneeskundigen, die het tot heil onzer kinderen benutten, dragen de verantwoordelijkheid voor het goede gebruik; maar niet meer en niet minder dan bij de aanwending van allerlei andere vaccins voor massa-enting”.

Door *Pockels* en *Reiter* zijn in 1925 bij een klein aantal kinderen perorale immuniseeringsproeven met T.A.-mengsels verricht, echter met negatief resultaat.

Ook de proeven van *Brandwijk* (15), om caviae te immuniseeren door middel van toediening door den mond van T.A.U., leverden een negatieve uitkomst op.

§ 4. Actieve onvatbaarmaking met diphtherie toxine-antitoxinevlokken

Bij deze methode wordt gebruik gemaakt van de vlokken, welke het eerst ontstaan in het neutrale toxine-antitoxine mengsel volgens de reactie van Ramon.

Door centrifugeeren worden deze vlokken gescheiden van de overige vloeistof. De vlokken worden daarna meerdere malen gewasschen met physiologische zoutoplossing en zijn daardoor bevrijd van de aspecifieke eiwitten. Vervolgens worden ze geëmulgeerd in physiologische zoutoplossing, waardoor men een geheel neutrale vlokkenemulsie verkrijgt (Toxine-Antitoxine Flocken, T.A.F.).

Schmidt en *Scholz* (83) vonden als doelmatigste vorm voor immuniseering de emulsie der vlokken in een 0,9 % keukenzoutoplossing, waaraan een 0,5 % carbol is toegevoegd. Deze emulsie was dan praktisch onbegrensd houdbaar.

Zij dachten in deze vlokken een ideaal preparaat te hebben voor actieve onvatbaarmaking. Langs subcutane weg toege-

diend, zou dit het beste werken. Door middel van de T.A.-vlokken is het mogelijk een groote hoeveelheid gebonden gif in een klein volumen in te spuiten, ook omdat deze binding als zoodanig veel vaster is als in den vorm van het toxine-antitoxinemengsel. Hierbij moet echter worden vooropgesteld, dat de verwerking van het gifdepôt in het lichaam parallel gaat met actieve onvatbaarmaking, dus met het optreden van vrij antitoxine.

Wanneer dit echter niet gebeurt, het lichaam dus uit ons onbekende gronden niet in staat is zich snel genoeg te immuniseeren, dan dreigt beslist gevaar. Hierbij moet men zich dan voorstellen dat het lichaam de toxine-antitoxine verbinding in den loop der tijd sneller kan splitsen, en als dit gebeurt op een tijd dat de antitoxinetiter nog niet hoog genoeg is, dan kan het organisme door toxinerwerking zwaar ziek worden. Dit gevaar is natuurlijk des te grooter naarmate meer gebonden gif in het ingespoten depôt voorhanden is.

Naarmate het vlokkenpreparaat ouder is, wordt door het vaster worden der binding dit gevaar geringer.

In het algemeen is het genoemde gevaar bij T.A. in vlokkenvorm geringer als bij T.A. in oplossing, waartegenover staat dat in deze laatste vorm veel minder gebonden gif wordt ingespoten.

De voornaamste bezwaren tegen T.A.F. zijn:

1. Het is neutraal en zuiver neutrale mengsels immuniseeren slechts zeer langzaam. Er is wel eens voorgesteld de vlokken-emulsie door toevoegen van toxine onderneutraal te maken om zodoende een grootere en sneller ontstaande onvatbaarheid te verkrijgen. Dit is echter niet logisch, daar men dan de voordeelen der vlokkenemulsie, waarvan neutraliteit, dus primaire ongiftigheid, het belangrijkste is, denkbeeldig maakt.

2. Voor hen die dissociatie van T.A. vreezen, is T.A.F. een onlogisch product, want zoo dit niet bewezen gevaar bestaat, is dit bij de veel geconcentreerder T.A.F.-emulsie een veel grooter gevaar dan bij de sterk verdunde onderneutrale mengsels zooals T.A.U.

De actieve onvatbaarmaking met T.A.F. werd het eerst in Duitschland toegepast.

Volgens proeven van *Schreiber* is bij inspuiting van 0,3—0,4 c.c. van bovengenoemde suspensie de locale reactie onbeteeuend en bijna pijnloos. Herhaalde inspuitingen van kleine hoeveelheden voldeden het best. De immuniseering met T.A.F. verloopt echter betrekkelijk langzaam, zoodat het hoogtepunt der productie van antilichamen eerst na maanden wordt bereikt.

Het bezit van een entstof, die na een enkele dosis voldoende onvatbaarheid geeft, zou van groote waarde zijn.

Een groote hoeveelheid T.A.F., als depôt in het lichaam gebracht, zou misschien dit doel kunnen bereiken.

De onvatbaarheid zou dan echter slechts zeer langzaam ontstaan waarom deze wijze van enten dus alleen in aanmerking zou komen, indien geen onmiddellijk gevaar voor diphtherie bestaat. Daar men echter omtrent de splitsing van T.A.-verbindingen in het lichaam nog zeer weinig zekers weet, geeft het in het lichaam brengen van een groote hoeveelheid T.A.F. een onveilig gevoel.

Aan T.A.F. werd vroeger geen immuniseerende werking toegekend, zooals door *Löwenstein* in 1924, ook niet door *Ramon* in 1925. *H. Schmidt* en *W. Scholz* (83) hebben zich echter in 1926 van het goede immuniseerend vermogen der T.A.-vlokken overtuigd.

Door hen werd T.A.F. gehouden voor de meest bruikbare entstof.

Sordelli en *Serpa* deelden in 1925 nog mede, dat ze bij paarden en caviae ook een immuniteit konden opwekken door het brengen van vlokkenmateriaal op de gescarificeerde huid en bevalen deze methode toen ook aan voor actieve onvatbaarmaking bij den mensch.

Veel ingang heeft het echter niet gevonden.

§ 5. Actieve onvatbaarmaking met diphtherieanatoxine

Omdat aan de tot nu toe beschreven entstoffen toch nog altijd kleefde het nadeel der meerdere of mindere toxiciteit,

heeft men pogingen in het werk gesteld om een geheel ongiftig toxine, dat echter zijn onvatbaarmakende antigeenwerking heeft behouden, in handen te krijgen. Verschillende onderzoekers hebben zich hiermede bezig gehouden. Het denkbeeld der atoxische antigenen was reeds afkomstig van *Ehrlich*, dat praktisch werd uitgevoerd door *Löwenstein, von Eisler* e.a., en via hen door *Glenny*. *Glenny* (118) zou reeds in 1904 door formol gemodificeerde toxinen hebben bereid en gebruikt.

Busson en *Löwenstein* meenden in 1920, dat door toevoeging van formol aan diphtherietoxine en maanden lang verblijf bij broedtemperatuur, ook de onvatbaarmakende werking verloren ging. Hun ervaring is echter in strijd met die van talrijke anderen en onjuist gebleken.

Glenny en *Sudmersen* vonden, dat caviae na inspuiten van een oud, met formaline bewaard toxine, onvatbaar werden en geen reactie vertoonden.

Glenny en *Hopkins* voegden aan diphtherietoxine toe één per duizend formaline en verwarmden dit vier weken lang op 37° C. De giftigheid van het toxine vonden ze hierdoor sterk verminderd, maar niet geheel verdwenen. Met dit, door hen benaamde „toxoid”, deden zij proeven op konijnen, en het bleek hierbij dat de onvatbaarmakende werking van diphtherietoxine niet verandert, indien het toxine is veranderd in toxoid. De toxische werking wordt dus door formol weggenomen en de antigeen- of antistoffenverwekkende werking blijft behouden.

Volgens de theorie van *Ehrlich* kan men zeggen dat de toxophore groep van het antigeen is vernietigd en de haptophore groep behouden.

Praktische beteekenis heeft echter dit ontgifte toxine pas gekregen door den arbeid van *Ramon* in het Instituut Pasteur te Parijs. Deze heeft zoowel onze inzichten in, als de toepassing van het anatoxine aanmerkelijk verder gebracht en wel als gevolg van zijn degelijke studie, in het jaar 1923, over de reacties tusschen antigeen en antitoxine (22).

Zonder aan de groote verdiensten van *Ramon* iets af te doen, moet toch eerlijkheidshalve worden opgemerkt, dat dit

anatoxine van Ramon niets anders is dan het toxoid van Glenny e.a., die evenals Löwenstein reeds eerder met formol het diphtherietoxine ongiftig hadden gemaakt, maar pas Ramon zag de antigeenwaarde er van voldoende in.

Ramon vond, dat zich in een mengsel van diphtherietoxine en -antitoxine een vlokkig neerslag vormt, het duidelijkst bij 37° C. Het neerslag ontstaat het eerst in dat mengsel, waar het toxine juist door het antitoxine wordt geneutraliseerd, en waarin dus geen vrij toxine of vrij antitoxine meer voorkomt („floculation initiale”).

Deze vlokking is specifiek, want ze treedt niet op met normaal serum, of eenig ander antiserum. Ze treedt ook niet op met diphtherietoxine, dat gemodificeerd is door verwarming op 100°.

Ramon schrijft: „Elle est la manifestation visible la plus caractéristique de la réaction entre la toxine et l' antitoxine diphtériques”.

Met behulp van deze vlokkingreactie is de sterkte van een antitoxine of toxine te bepalen, indien men een toxine of antitoxine van bekende sterkte in handen heeft. Onder *antigeenwaarde* verstaat men de hoeveelheid eenheden antitoxine, die de initiale vlokking veroorzaakt in 1 c.c. toxine of anatoxine.

Deze methode geeft veel snellere uitkomsten dan de titratie volgens Ehrlich op dieren en spaart vele dieren uit. De toepassing is eenvoudig, hoewel natuurlijk ervaring voor betrouwbare aflezing wordt vereischt.

Evenwel geeft de titratie volgens Ramon niet steeds dezelfde uitkomst als de dierproef en kan deze laatste voor nauwkeurige titratie niet worden gemist.

Het denkbeeld om antitoxische sera te titreeren door middel van uitvlokking met toxine, is niet van Ramon afkomstig.

Reeds in 1909 gebruikten Calmette en Massol de vlokkingreactie bij het titreeren van antislangenbeetserum.

Daarna hebben Nicolle, Césari en Debains het beginsel

in toepassing gebracht bij het titreeren van diphtherie- en tetanusserum door middel van een ringreactie, die ontstaat, als met toxine vermengde gestolde gelatine wordt overgoten met antitoxisch serum.

Georgi vond, onafhankelijk van de genoemde onderzoekers, dat antitoxische sera door uitvloeking kunnen worden getitreerd. Hij voegde evenwel ook nog toe gecholesterineerd hartextract; hem was dus ontgaan, dat ook reeds door eenvoudig vermengen van toxine en antitoxine een neerslag ontstaat.

Ramon vond na verschillende proefnemingen als de beste methode voor het bereiden van anatoxine toevoeging aan diphtherietoxine van 3 à 4 per duizend formaline en blootstellen gedurende 4—5 weken aan een temperatuur van 37° — 42° C.

Op welke wijze deze omzetting in anatoxine geschiedt, heeft men eigenlijk nog niet goed kunnen doorgronden. Een dergelijk toxine, dat daarna zijn toxische eigenschappen mist, heeft zijn uitvlokkend vermogen en ook zijn immuniseerende eigenschappen behouden.

Het vlokt wel iets langzamer dan het oorspronkelijke toxine. Volgens *Ramon* zou de immuniseerende werking van het anatoxine in rechtstreeksche verhouding staan tot zijn uitvlokkend vermogen. Hoe meer antitoxine-eenheden een bepaalde hoeveelheid anatoxine nodig heeft voor zijn beginuitvloeking, „floculation initiale”, en hoe sneller deze optreedt, des te sterker zou dan zijn immuniseerend vermogen zijn.

In het R.S.I. voegt men, evenals *Ramon*, aan diphtherietoxine toe 3 à 4 per duizend formaline, en past een langzame ontgiftiging gedurende 4—5 weken bij 40° C. toe.

Bij verhitten van toxine is het overblijvend onvatbaar-makend vermogen gering en verdwijnt het uitvlokkend vermogen. Wanneer evenwel het toxine volgens de beschreven methode geheel in anatoxine is omgezet, doet daarna verwarming tot 72° C. aan de onvatbaar-makende werking en het uitvlokkend vermogen geen afbreuk meer.

Hieruit blijkt dus dat toxoid iets anders is dan door formale ongiftig gemaakt toxine en in wezen daarvan verschilt.

De atoxiciteit van het anatoxine wordt nagegaan door 5 c.c. subcutaan in te spuiten bij een cavia van 300 gram. Het dier wordt gedurende een maand in observatie gehouden en om de 2 dagen nagezien. Wanneer het gedurende dien tijd geen enkel verschijnsel van locale of algemeene diphtherie-intoxicatie vertoont en regelmatig in gewicht toeneemt, dan wordt atoxiciteit van het anatoxine aangenomen.

Volgens *Schmidt* (127) is, voor toepassing der onschadelijkheidsproef van het anatoxine bij caviae, observatie gedurende 6 weken noodzakelijk.

De laatste tijd wordt de onschadelijkheidsproef van Ramon nog wel aangevuld met een intracutane proef bij de cavia en het konijn.

Moloney voert deze proef bij de cavia uit op de volgende wijze: 0,1 c.c. van het anatoxine wordt intracutaan ingespoten.

Wordt hierdoor geen reactie tevoorschijn geroepen grooter dan 12 m.M. in doorsnede, dan wordt aangenomen dat het anatoxine voldoende is ontgift. Ook spuit hij wel 0,1 c.c. intracutaan in van een verdunning 1 op 10, welke dosis dan geen reactie mag geven grooter dan 5 m.M. in doorsnede.

S. Schmidt (127) spuit 0,2 c.c. van het anatoxine intracutaan in bij het konijn, hetgeen dan nog een geringe roodheid veroorzaakt, of 5 c.c. intraveneus bij een konijn van 3 K.G., dat gedurende 2 maanden in observatie wordt gehouden en geen verschijnselen van locale of algemeene diphtherie-intoxicatie direct of later optredend, mag vertoonen.

Anatoxine bezit de volgende voordeelen:

1. Absolute onschadelijkheid.
2. Het bevat geen serum.
3. Goede antigeenwaarde.
4. Stabiliteit,

Nadat *Ramon* bij proefdieren goede resultaten had verkregen, werd door hem het anatoxine ook gebruikt om kinderen tegen diphtherie te immuniseeren.

Eerst werd subcutaan $1\frac{1}{2}$ c.c. anatoxine ingespoten, 3 weken later 1 c.c. eveneens subcutaan en 15 dagen na deze tweede inspuiting nog $1\frac{1}{2}$ c.c. anatoxine subcutaan.

Later kan de immuniteit nog weer aanzienlijk worden versterkt door een nieuwe inspuiting van anatoxine, de z.g. „injection de rappel”.

De eerste proeven hieromtrent zijn verricht door *Martin, Darré, Loiseau, Laffaille, Roubinowitsch* en *Zoeller* (51, 52, 57, 58 en 59).

Uit hun onderzoekingen is af te leiden, dat de vorming van antitoxinen sneller plaats vond dan met T.A.-mengsels.

De resultaten werden nagegaan door toepassing der proef van Schick en bepaling van de antitoxinetiter van het serum vóór en na de enting.

De onvatbaarheid ontstond bij 88,7 % der geënten na 5—6 weken en bij 98,8 % na 8 weken. Bij gebruikmaken van z.g. „vaccins associés”, d.w.z. mengsels van anatoxine met andere prikkelende stoffen, o.a. typhusvaccin, werden nog betere resultaten verkregen en wel in 100 % der gevallen immuniteit, althans negatieve Schick. Volgens deze onderzoekers is de plaatselijke en algemeene reactie zelden merkbaar en van weinig beteekenis. De locale reactie moet worden toegeschreven aan de aanwezigheid in anatoxine van eiwitstoffen afkomstig uit de bouillon, waarin de diphtheriebacillen zijn gekweekt, en van de bacillen zelf.

Hierbij dient echter te worden opgemerkt, dat de proeven van bovengenoemde onderzoekers werden verricht bij kinderen beneden de 6 jaar.

Bij deze kinderen is de plaatselijke reactie geringer dan bij oudere kinderen en verdwijnt weer spoedig.

De algemeene reactie uit zich alleen in een lichte temperatuursverhooging.

Ramon raadt daarom aan voor het immuniseeren met anatoxine den leeftijd van $1\frac{1}{2}$ —6 jaar, omdat die kinderen meestal nog niet gesensibiliseerd zijn voor de bacteriënproteinen.

Bovendien eischt de diphtherie 60 % van haar slachtoffers

tusschen den 2- en 6-jarigen leeftijd; deze dienen dus allereerst te worden beschermd.

Door het Instituut Pasteur te Parijs worden slechts die monsters anatoxine voor actieve onvatbaarmaking in den handel gebracht, waarvan de antigeenwaarde op zijn minst 8 A.E. bedraagt, door het R.S.I. met minstens 12 A.E.

In Frankrijk zijn sedert 1923 zeker een millioen kinderen geïmmuniseerd met anatoxine.

Bij entingen met anatoxine, die *Aldershoff* (9) in Frankrijk kon bijwonen, heeft deze toch reacties waargenomen, die, hoewel op zichzelf onschadelijk, toch hier te lande ongaarne worden gezien.

Ook *Bessemans* (45) en *De Potter* (48) hebben hierop gewezen.

Park en *Zingher* hebben in 1924 ook reeds de onvatbaarmaking met toxoid bij kinderen ter hand genomen. Zij voegden aan het diphtherietoxine toe één per duizend formaline en plaatsten dit 4—5 weken bij 38° C., waarna de toxiciteit wel niet geheel was verdwenen, maar toch zeer sterk afgenomen. Zij voegden echter nog antitoxine toe, zoodat zij dus eigenlijk werkten met een toxine-antitoxinemengsel, waarin verzwakt toxine aanwezig was. De plaatselijke reactie vonden zij bij kinderen echter zeer sterk.

Later gingen zij er ook toe over geheel atoxisch anatoxine te bereiden volgens de methode *Ramon* door toevoeging van 2 à 3 per duizend formaline en verwarmen gedurende 4—5 weken bij 38° C. Toch is tot op heden ook in New-York het T.A.-mengsel de meest gebruikte entstof gebleven.

Onderzoekingen van *Brandwijk* (15) over immuniseering van caviae door toediening van anatoxine per os leverden geen resultaat op.

De gewijzigde zalf van *Löwenstein*, welke anatoxine en gedooide diphtheriebacillen bevat, waarmee de huid wordt ingewreven, gaf ook zeer onvoldoende resultaten, evenals het inbrengen in de neus van in anatoxine gedrenkte tampons.

Deze beantwoorden te weinig aan het doel onvatbaarheid

te verwekken, en zijn daarom slechts aan te raden, indien tegen inspuiting onoverkomenlijke bezwaren bestaan.

Ook bij paarden is met anatoxine onvatbaarheid te verwekken. Het paard wordt bij deze behandeling niet telkens weer bloot gesteld aan den toxineprikkel, zoodat de gezondheidstoestand van het dier veel beter blijft en het paard ook veel langer is te gebruiken.

De ervaringen in het R.S.I., opgedaan met hyperimmunisatie van paarden door middel van anatoxine, zijn echter niet zoo gunstig als die van Ramon, vooral wat betreft de eindtiter van het verkregen serum.

Ramon (23, 37) heeft ook nog getracht een versterking van de immuniseering bij paarden te verkrijgen door tapioca-poeder aan het diphtherieanatoxine toe te voegen en dit mengsel subcutaan in te spuiten.

Hij was hiertoe overgegaan, omdat hij opmerkte dat paarden, welke op de plaats van inspuiting een meer of minder levendige ontsteking kregen, vaak gevolgd door een absces daar ter plaatse, een vrij aanzienlijke verhooging van het anti-toxinegehalte van het serum vertoonden. Het sterke ontstekings-oedeem heeft tengevolge een langzame resorptie van het antigeen.

Glenny, Pope, Waddington en *Wallace* (114) vonden in 1926 dat ook toevoeging van aluin aan anatoxine de anti-geenwaarde sterk deed toenemen; ook hier is het locale oedeem wel de oorzaak.

In den laatsten tijd nam *Ramon* (23, 37) waar, dat een analoog effect als met tapioca, kan worden verkregen door toevoeging aan het antigeen van 0,5 % chloorcalcium, dat een neerslag verwekt van calciumfosfaat, hetgeen een meer of minder groot gedeelte van het antigeen fixeert.

Tot nu toe werd hier te lande voor actieve onvatbaar-making tegen diphtherie de volgende gedragslijn aangenomen:

1. Kinderen boven de 6 jaar immuniseeren met T.A.U.
2. Voor kinderen beneden de 6 jaar wordt anatoxine aanbevolen.

Een anatoxine, bevrijd van aspecifieke eiwitstoffen, dat dus ook bij oudere kinderen en volwassenen kan worden aangewend, blijft echter het ideaal, waarnaar in het R.S.I. met goede kans op succes wordt gezocht.

§ 6. Actieve onvatbaarmaking met diphtherie anatoxine-antitoxinevlokken

Hierbij gebruikt men de vlokken, welke het eerst ontstaan in het neutrale anatoxine-antitoxinemengsel volgens de reactie van Ramon (A.A.F. of Ananti Aldershoff). De verdere bewerking der vlokken geschiedt op dezelfde wijze, zooals is uiteengezet voor de toxine-antitoxinevlokken. Voor hen, die dissociatie van T.A.-verbindingen vreezen, is het logischer gebruik te maken van Ananti dan van T.A.F., omdat bij splitsing slechts een niet giftige stof ontstaat; hier zal snel loslaten eerder een voordeel beteekenen, tenzij men de grootste waarde legt op een depôtwerking.

Ananti heeft in dierproeven bewezen goed te immuniseeren; het maakt echter volgens *Aldershoff* (3, 4 en 9) slechts langzaam onvatbaar. In Engeland maakt men er toch in de praktijk gebruik van.

Door subcutaan inspuiten van Ananti zou slechts een geringe plaatselijke reactie optreden.

In Ananti is, daar anatoxine ongiftig is, antitoxine overbodig, indien men geen depôtwerking aanneemt. Wanneer dus uit de binding Ananti het antitoxine weer kon worden verwijderd, zonder het antigeen te schaden, dan zouden we een ideale entstof verkrijgen, n.l. het atoxische antigeen in zuiveren vorm.

Brandwijk (15) heeft hieromtrent verschillende onderzoeken gedaan:

1. De invloed van hogere temperatuur.
Deze proeven hebben niets opgeleverd.
2. Toevoeging van formaline aan een emulsie van Ananti om dit van antitoxine te bevrijden.

Hiermede werden eveneens geen resultaten verkregen.

3. Aanzuren en daarna weer alkalisch maken van een Anantiemulsie. *Hallauer* had n.l. opgemerkt dat, wanneer diphtherietoxine krachtig werd aangezuurd, dit dan zijn giftige werking verliest, welke echter na toevoeging van natronloog, juist tot het neutrale punt weer terugkeert.

Brandwijk kon dit bevestigen. Door toepassing van dit principe op Ananti, kreeg *Brandwijk* een deel van het antigeen vrij aanwezig. Zodoende werd dus eigenlijk een onderneutraal Anantimengsel verkregen. Dit gezuiverde Ananti heeft hij toegepast bij caviae, welke een goede onvatbaarheid vertoonden, maar eerst na ongeveer zes weken. Het nadeel der ietwat vertraagde onvatbaarheid zou men kunnen onder-
vangen door grootere giften.

Na het inspuiten van gezuiverd Ananti ontstond bijna geen locale reactie.

4. Door adsorptie van het aan het antigeen gebonden antitoxine aan een stof met een zoo sterke aantrekking tot antitoxine, dat dit uit de binding Ananti wordt vrij gemaakt, zonder echter het anatoxine te schaden. Dit adsorptiemiddel moet echter weer gemakkelijk uit de oplossing verwijderd kunnen worden, opdat het eindproduct geen vreemde stoffen bevat, welke voor den mensch schadelijk zouden kunnen zijn. Uit onderzoekingen van *Zunz*, *Rakusin* en *Flieher* was gebleken, dat diphtherieantitoxine wordt geadsorbeerd door acidum silicicum, dierlijke kool en aluminiumhydroxyde.

Door proeven werd gevonden dat het eerste en het laatste moeilijk uit de oplossing waren te verwijderen, terwijl dit bezwaar bij kool niet bestond.

Na deze proeven van *Brandwijk* werd de mogelijkheid niet uitgesloten geacht, dat in de toekomst bij den mensch voldoende onvatbaarheid is te verkrijgen door een enkele enting, aangezien een groote gift van het zuivere Ananti geen bezwaar meer zou vormen.

HOOFDSTUK II

ZUIVERING VAN ANATOXINE

Na de bekende onderzoeken van *Roux* en *Yersin* had men niet zooveel belang meer gesteld in de zuivering van diphtherietoxine, zooals reeds in de inleiding is uiteengezet, omdat de geringe resultaten weinig voor de toekomst deden verwachten. Toen evenwel de proteïnechemie meer en meer tot ontwikkeling was gekomen, heeft men, na een rustperiode van tientallen jaren, de zuivering van het diphtherietoxine en -anatoxine weer ter hand genomen.

De proeven over zuivering van toxine en anatoxine hebben een tweeledig doel:

1. Een zuiver theoretisch belang om de natuur van het diphtheriegif te ontsluiëren.
2. Een praktisch belang om krachtig werkende antigenen te verkrijgen.

Hoofdzakelijk heeft men getracht zijn doel te bereiken op drie manieren:

1°. *Neerslaan der proteïnen van de toxinebouillon met verschillende neutrale zouten*, vooral natriumsulfaat of ammoniumsulfaat, met opvolgende dialyse. Neerslaan met alcohol of door middel van zuren en opvolgend oplossen van het neerslag in zwak alkalische vloeistoffen.

Aan *Brieger* en zijn medewerkers danken wij een groot deel dezer onderzoeken en het gelukte hun op deze wijze

reeds vrij zuivere preparaten te bereiden, echter ging bij deze proeven de antigeenwaarde meestal achteruit.

Abt heeft in de laatste tijd een methode verbeterd, welke in principe reeds was aangegeven door *Roux* en *Yersin* n.l.: neerslaan van het ruwe toxine met oplosbare calciumzouten, welke met de fosfaten uit de bouillon onoplosbare neerslagen vormen en waardoor het toxine wordt geadsorbeerd. Het neerslaan door middel van zuren (118, 143 en 144) is een vooral in de laatste jaren veel gebruikte methode (*Glenny* en *Walpole*, *Watson* en *Wallace*, *Kissin* en *Bronstein*, *Watson* en *Langstaff*, *Schmidt* en *Kjaer*).

Deze methode schijnt bij doelmatige toepassing vrij zuivere preparaten te geven, is eenvoudig en niet duur.

Volgens *Kissin* en *Bronstein* is een voorproef met kleine hoeveelheden gewenscht, om te weten hoeveel zuur men ongeveer moet toevoegen. Na centrifugeeren en wasschen wordt het neerslag weer opgelost in een kleine hoeveelheid alkalische vloeistof. Op deze wijze kan men in een heel klein volumen een bepaald percentage van het werkzame bestanddeel verkrijgen.

Het grootste gedeelte der stikstofhoudende, niet specifieke stoffen wordt op deze wijze verwijderd. Het meest werd nog gewerkt met zoutzuur, waarbij een opbrengst van 50—60 % werd verkregen; bij gebruiken van azijnzuur was de opbrengst te gering.

De beste resultaten vond men wanneer het uitgangsproduct op P_H 3,5—4,1 werd gebracht, bij lage temperatuur en korte inwerkingstijd van het zuur, niet langer dan $3\frac{1}{2}$ uur.

Het immuniseerend vermogen van de op deze wijze gezuiverde toxinen en anatoxinen was echter slechter dan dat der ruwe producten; ook de houdbaarheid dezer gezuiverde producten was niet zoo goed.

Zuivering door middel van aethylalcohol, methylalcohol en aceton gaf geen bevredigende resultaten en is bovendien kostbaar.

Glenny, *Pope*, *Waddington* en *Wallace* (114) toonden in

1926 aan, dat de antigeenwaarde van diphtherietoxoiden werd verbeterd door toevoeging van aluin $[K_2Al_2(SO_4)_3]$, zonder scheiden of met weer oplossen van het precipitaat. Aluin werd het eerst gebruikt in 1925 door *Glenny* (113), toen deze het effect van vertraagde resorptie trachtte na te gaan door toxoid in betrekkelijk onoplosbare vorm te brengen.

Maximale precipitatie werd verkregen bij toevoeging van 1,5—2% aluin; met een grootere hoeveelheid aluin, van 3,5—10%, neemt de zuiverheid van het precipitaat toe, terwijl de opbrengst afneemt. Aluin werd als vaste stof toegevoegd.

Het mengsel bleef gedurende 18 uren staan, voordat het werd gefiltreerd. Nadien werd het overblijvende precipitaat tweemaal gewasschen met een 1% oplossing van natriumchloride. De hoeveelheid waschwasser bedroeg telkens het volumen van het oorspronkelijke toxoid.

De gewasschen precipitaten werden geperst tusschen vloeipapier om vocht te verwijderen en daarna gesuspendeerd in physiologische zoutoplossing, waaraan een $\frac{1}{2}$ % phenol was toegevoegd. *Glenny* en zijn medewerkers gebruikten hoofdzakelijk alleen deze suspensie van aluinvlokken voor de actieve onvatbaarmaking tegen diphtherie.

Om de antigeenwaarde der precipitaten te bepalen met de vlokingsreactie volgens Ramon, werden deze opgelost in een 2% oplossing van natriumkaliumtartraat (Seignette zout).

Glenny en *Waddington* deelden in 1928 vergelijkende proeven mede omtrent het antigeenvermogen van toxoid en aluintoxoid, waarbij duidelijk de superioriteit van het aluintoxoid aan den dag kwam. Verdere mededeelingen zijn in 1930 gedaan door *Glenny* (113), welke de voordeelen aantoonde van het toevoegen van aluin aan diphtherietoxoid om paarden te immuniseeren voor het verkrijgen van therapeutische sera.

Het grootste gedeelte van gewoon toxoid wordt geëlimineerd binnen de eerste 24 uur en na 3 dagen blijft nog slechts een spoor over; dit gedeelte is echter van aanzienlijk belang voor de ontwikkeling der immuniteit.

In aluintoxoid is het antigeen aanwezig in den vorm van een betrekkelijk onoplosbaar precipitaat, dat voldoende lang in het lichaam blijft om als continue prikkel te werken, nadat de cellen op den eersten prikkel hebben gereageerd; de vermeerdering van het antigeenvermogen van aluintoxoid moet dan ook worden toegeschreven aan de langzame resorptie en elimineering.

De mogelijkheid bestaat, met dit product door één enkele inspuiting een actieve onvatbaarheid te verwekken.

Volgens *Glenny* geeft subcutane inspuiting van aluintoxoid bij caviae een matig sterke reactie, bij paarden een zeer sterke reactie.

Glenny heeft ook enkele honderden kinderen en volwassenen met aluintoxoid geënt.

Bij kinderen was eveneens een duidelijke reactie waar te nemen, maar niet zoo sterk als bij caviae, volgens *Glenny*; bij volwassenen was de reactie minder sterk.

Uit proeven van *Pondman* en *Tasman* (162) bleek echter dat bij caviae reeds zeer groote infiltraten zich ontwikkelden, zoodat in het R.S.I. deze methode als niet praktisch toepasbaar wordt beschouwd.

Park voegt aluin in poedervorm toe aan het anatoxine (130) en schijnt goede resultaten te hebben verkregen door kinderen met een dergelijk mengsel te immuniseeren; over de reactie spreekt hij niet.

In 1931 is door *Tasman* en *Pondman* (161) nog een bijzondere methode uitgewerkt.

Zij voegden toe aan 1 liter van het uitgangsproduct 13,2 gram aluminium-sulfaat $[\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}]$. In hun proeven werd als precipiteerende stof aluminium-sulfaat gebezigd, omdat met een aequivalente hoeveelheid aluminium-sulfaat dezelfde resultaten bereikt werden als met aluin.

Na eenige malen omschudden werd na drie uur staan het neerslag afgezogen, eenmaal gewasschen met 300 c.c. gedestilleerd water en daarna gesuspenderd in 200 c.c. van een 10% natriumfosfaat-oplossing ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) voor elueering. Na 2 maal 24 uur werd wederom afgezogen en

het filtraat ter afkoeling enkele uren in de ijskast geplaatst.

Daarna enting dezer vloeistof met enkele natriumfosfaat-kristallen en voor uitvriezen van de overmaat natriumfosfaat weer gedurende 24 uur in de ijskast geplaatst.

Vervolgens wordt de vloeistof door filtratie van de gevormde kristallen natriumfosfaat gescheiden en tenslotte nog door een „Seitz-Entkeimungsfilter” gefiltreerd.

Door middel van deze precipitatiemethode verkregen de schrijvers vrij zuivere producten en het immuniseerend vermogen bleek eveneens goed te zijn.

2°. *Adsorptie van het werkzame bestanddeel der toxinebouillon door toevoeging van metaalhydroxyden.*

Ook heeft men bij de adsorptiemethode wel gebruik gemaakt van dierlijke kool en kaoline.

Op initiatief van Sörensen, zijn S. Schmidt en K. Linderström—Lang (122 en 123) in 1929 begonnen met onderzoekingen over de zuivering van diphtherietoxine en -anatoxine met behulp van een methode in gebruik bij de enzymchemie, n.l. door middel van eene suspensie van aluminiumhydroxyde. Zij bereidden aluminiumhydroxyde volgens het principe, zooals dit in 1923 reeds door Willstätter (77, 78 en 79) was aangegeven, waardoor het mogelijk werd, voortdurend een suspensie van aluminiumhydroxyde te bereiden van een bijna gelijksoortige en constante samenstelling.

De aangevangen onderzoekingen van S. Schmidt en K. Linderström—Lang werden voortgezet door S. Schmidt, A. Hansen en K. A. Kjaer.

Voor het bereiden der suspensie van aluminiumhydroxyde gingen Schmidt, Hansen en Kjaer (139, 142) te werk op de volgende wijze:

100 c.c. van een 10% ammoniakoplossing worden gegoten bij een oplossing van 22 gram ammoniumsulfaat in 600 c.c. gedestilleerd water, welke van te voren is verhit op 63° C.

Daarna wordt dit mengsel afgekoeld tot 58° C. Hieraan wordt snel toegevoegd een oplossing van 76,7 gram aluminium-

ammoniumsulfaat 12 a.q. in 150 c.c. gedestilleerd water, eveneens op 58° C. verhit. Hierbij precipiteert het aluminiumhydroxyde. Vervolgens wordt dit totale mengsel verwarmd op 61° C. en gedurende 10 minuten flink geroerd.

Schmidt wijst met nadruk op het belang, gedurende het neerslaan van aluminiumhydroxyde er voor zorg te dragen, dat de temperatuur niet beneden 58° C. en ook niet boven 61° C. komt, daar dan het aluminiumhydroxyde geheel andere eigenschappen kan aannemen.

Nadat gedurende 10 minuten flink is geroerd, wordt het geprecipiteerde aluminiumhydroxyde uitgegoten in 7,2 L. gedestilleerd water, waaraan is toegevoegd 12,5 c.c. van een 10 % ammoniakoplossing. Dit geheel wordt krachtig geschud en het precipitaat daarna rustig aan bezinking overgelaten.

Vervolgens wordt de bovenstaande vloeistof door centrifugeeren of afzuigen verwijderd en het neerslag nogmaals gewasschen met 7,2 L. gedestilleerd water, waaraan nu 25 c.c. van een 10 % ammoniakoplossing is toegevoegd.

Tenslotte wordt, na bezinking van dit neerslag en afzuigen van het waschwasser, telkens met 7,2 L. gedestilleerd water, maar nu zonder ammoniak, zoolang gewasschen totdat de bovenstaande vloeistof troebel blijft. Volgens *Schmidt* is het belangrijk zoo snel mogelijk te werk te gaan met het wasschen van het geprecipiteerde aluminiumhydroxyde en dit zoo mogelijk in 2,5 uur te verrichten.

Mijn ervaring, zooals nog uit te beschrijven proeven zal blijken, is, dat dit laatste niet strikt noodzakelijk is.

Hierna wordt zooveel mogelijk water afgeheveld en houdt men ongeveer een halve liter suspensie over.

De suspensie moet worden gereed gemaakt, de dag vóór de zuivering, omdat men de suspensie versch bereid moet gebruiken en niet kan laten verouderen.

Merkwaardigerwijze vindt men slechts op één plaats in de verschillende publicaties van *Schmidt* (130) een opgave over het gehalte aan aluminiumoxyde van de door hem gebruikte suspensies, n.l. 0,0007 gram Al_2O_3 per c.c. Zooals nog uit

mijn te vermelden proeven zal blijken, ligt deze waarde ver beneden die, welke voor de door mij gebruikte, volgens Schmidt's voorschrift bereide suspensies, werden gevonden.

Schmidt en *zijn medewerkers* geven op in hun publicaties, dat per 100 c.c. toxine of anatoxine wordt toegevoegd 20 c.c. suspensie. De toxinen worden volgens *Schmidt* (127) het best geadsorbeerd bij P_H 7—8, terwijl voor de anatoxinen het P_H optimum werd gevonden bij P_H 5,5—6,5.

Maschmann, *Küster* en *Fischer* geven als gunstigste waterstofionenconcentratie voor de adsorptie van diphtherie- en tetanustoxine aan aluminiumhydroxyde de waarde $P_H = 6$ op.

Om de P_H der toxinen en anatoxinen te verlagen werd gebruik gemaakt van 10 % azijnzuur.

De adsorptie geschiedt volgens *Schmidt* bijna oogenblikkelijk.

Nadat het toxine of anatoxine zorgvuldig met de suspensie is gemengd, wordt gecentrifugeerd of door een Buchner-filter gefiltreerd. Het neerslag wordt tweemaal gewasschen met zooveel gedestilleerd water, als het volumen uitgangproduct + suspensie bedroeg. Daarna wordt het neerslag geëluëerd met $\frac{1}{6}$ van het volumen van het uitgangproduct eener oplossing van 2,4 % $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ in gedestilleerd water. Later (139) werd het neerslag ook wel verwreven met deze vermelde hoeveelheid vast fosfaat en vervolgens langzaam kleine hoeveelheden gedestilleerd water toegevoegd totdat het bovengenoemde volumen was bereikt.

Ook heeft *Schmidt* (132 en 133) voor deze elueering nog wel gebruik gemaakt van 15 % $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$, of opgelost in gedestilleerd water.

Het werkzame bestanddeel zou bijna oogenblikkelijk in de fosfaatoplossing overgaan.

Schmidt en *zijn medewerkers* hebben ook proeven verricht met andere elutievloeistoffen, zooals een oplossing van na-

triumsilikaat, kaliumantimonaat en natriumcarbonaat; geen enkele gaf evenwel voordeelen boven de fosfaatoplossing.

Elutie met ammoniak gelukte ook goed, maar de elutie-vloeistof is dan sterk opalesceerend en geeft moeilijkheden bij het bepalen der antigeenwaarde volgens Ramon.

Bij gebruik maken van 2,4 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ is, na centrifugeeren of filtreeren, het gezuiverde product gereed, hetwelk daarna nog door een Seitz-Entkeimungsfilter wordt gefiltreerd.

Wanneer 15 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ wordt gebruikt, moet, na centrifugeeren of filtreeren, het gezuiverde product nog door uitvriezen gedurende 24 uur met opvolgende filtratie bevrijd worden van het overtollige fosfaat. Hierna wordt dit gezuiverde product nog gefiltreerd door een Seitz-Entkeimungsfilter.

Het eindproduct, licht van kleur, bevat een meer of minder groot gedeelte van het toxine of anatoxine, maar zeer weinig niet specifieke proteïnesubstanties.

Men kan een bijna kleurloos product verkrijgen door, tegelijkertijd bij de adsorptie met aluminiumhydroxyde, ook nog 2 % dierlijke kool toe te voegen. Door deze toevoeging van kool heeft echter wat meer verlies aan antigeen plaats.

Bij deze methode volgens *Schmidt* (127) kon door de zuivering $\pm 97\%$ der niet specifieke proteïnesubstanties worden verwijderd; de gemiddelde opbrengst bedroeg ongeveer 52 %.

De gezuiverde toxinen volgens de methode *Schmidt* zijn minder toxisch dan de ruwe toxinen; het antitoxinebindend vermogen is echter onveranderd.

Schmidt geeft op, dat de gezuiverde toxinen en anatoxinen met de zelfde snelheid vlokken als de ruwe producten, die voor hun bereiding hebben gediend.

Mijn ervaring, zooals nog nader zal blijken, is, dat de gezuiverde producten steeds sneller vlokken.

De door immuniseeringsproeven van *Claus Jensen* (152)

verkregen resultaten hielden in, dat de gezuiverde anatoxinen minstens even goed waren als de ruwe anatoxinen en dat zij tot geen sterker reacties aanleiding gaven dan de ruwe producten.

3°. *Ramon, Legroux en Schoen* (43 en 44) hebben in 1931 getracht het *anatoxine door dissociatie vrij te maken uit de verbinding anatoxine-antitoxine*, een procédé, dat in 1923 reeds door *Ramon* is gebruikt om het complex toxine-antitoxine te dissocieeren en het antitoxine aldus weer terug te krijgen. Eerst wordt een mengsel gemaakt van een bepaalde hoeveelheid anatoxine, van bekende antigeenwaarde, met de daarvoor benodigde hoeveelheid antidiphtherieserum ter initiale uitvlokking. Dit mengsel wordt in een waterbad bij 50° C. geplaatst. Wanneer de vlokking duidelijk waarneembaar is, wordt gecentrifugeerd en daarna de bovenstaande vloeistof verwijderd.

Het aldus verkregen flocculaat wordt gewasschen met physiologische zoutoplossing en opnieuw gecentrifugeerd. Na verwijdering van het waschwater wordt $\frac{1}{4}$ van het uitgangsvolumen, anatoxine + serum, aan gedestilleerd water toegevoegd.

Deze bereide suspensie wordt nu gedurende 20 minuten verwarmd in een waterbad bij 82° C. Na deze verwarming vertoont de oplossing slechts een lichte opalescentie.

Het antitoxine is dan, of geheel vernield, of op zijn minst inactief geworden, terwijl het anatoxine daarentegen zich dan weer voor een groot gedeelte in actieven toestand bevindt.

Met behulp van deze methode zou ook minstens 97 % der niet specifieke proteïnesubstanties van het ruwe product worden verwijderd; verder werd door de schrijvers in vele gevallen ook een goede opbrengst verkregen. Het immuniseerend vermogen der aldus gezuiverde anatoxinen was minstens gelijk aan dat van het ruwe anatoxine. Het nadeel dezer methode is, dat met het serum soortvreemd eiwit in het product wordt gebracht.

Vanicek (160) heeft nog een methode beschreven om diphtherietoxine en -anatoxine te zuiveren door middel van dialyse.

Het ruwe product werd gebracht in een dialysezak, welke zak zich weer bevond in een 50 % suikeroplossing. Daar deze suikeroplossing een belangrijk grootere osmotische water-attractie heeft dan het electrolytarme ruwe product, gaat het water, dat zich in dit ruwe product bevindt, dus naar de suikeroplossing. Met deze methode vindt echter alleen concentreering, en geen eigenlijke zuivering plaats.

HOOFDSTUK III

BESCHRIJVING DER GEVOLGDE WERK- WIJZEN

1. *Precipitatie met aluminiumsulfaat.*

Aan 1 liter van het uitgangspproduct werd, zonder eenige P_H -correctie, 13,2 gram aluminiumsulfaat $[Al_2(SO_4)_3 \cdot 9 H_2O]$ toegevoegd. Na eenige malen omschudden werd na drie uur staan het neerslaan afgezogen, tweemaal met 600 c.c. gedestilleerd water gewasschen en gesuspenderd in 200 c.c. 10 % natriumfosfaatoplossing. $(Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O)$.

Na tweemaal 24 uur werd wederom afgezogen, het filtraat door uitvriezen van de overmaat natriumfosfaat bevrijd en tenslotte nog door een Seitz-Entkeimungsfilter gefiltreerd. Van het begin- en eindproduct werd steeds de antigeenwaarde, het totaal stikstofgehalte en de waterstofionenconcentratie bepaald.

Als zuiveringsfactor werd beschouwd het quotiënt:

$$\frac{\frac{A.W.}{N} \text{ gezuiverd product}}{\frac{A.W.}{N} \text{ ruw product}}$$

waarin A.W. de antigeenwaarde en N het stikstofgehalte aangeeft.

Alle bij deze proeven verkregen gezuiverde eindproducten werden bewaard onder toluol en op geregelde tijden hiervan de antigeenwaarden bepaald om op deze wijze een indruk van de houdbaarheid der gezuiverde producten te verkrijgen.

2. Adsorptie met aluminiumhydroxyde.

a. Bereiding en bepaling van het aluminiumgehalte der suspensies.

De suspensie werd bereid, door aan een op 63° C. verhitte oplossing van 22 gram ammoniumsulfaat in 600 c.c. gedestilleerd water, waarbij kort vóór de menging 100 c.c. 10 % ammoniak werd gevoegd, toe te voegen een op 58° C. verwarmde oplossing van 76,7 gram aluminiumammoniumsulfaat 12 a.q. in 150 c.c. gedestilleerd water.

Hierbij precipiteert het aluminiumhydroxyde. Dit mengsel werd onder voortdurend roeren gedurende 10 minuten op 58° à 61° C. gehouden, daarna uitgegoten in 7,2 liter gedestilleerd water, waaraan 12,5 c.c. 10 % ammoniak was toegevoegd.

Na bezinken werd de bovenstaande heldere vloeistof met behulp van een waterstraalzuigpomp weggezogen en opnieuw 7,2 liter gedestilleerd water, benevens 25 c.c. 10 % ammoniak toegevoegd.

Na bezinken werd wederom de bovenstaande vloeistof weggezogen en 7,2 liter gedestilleerd water, nu zonder ammoniak, toegevoegd. Deze laatste behandeling werd zolang voortgezet, totdat de suspensie niet geheel helder meer bezonk. Meestal was dit na 4—6 maal wasschen bereikt.

Daarna werd de suspensie afgezogen, gecentrifugeerd en tot 500 c.c. aangevuld. Het geheele procédé werd in den beginne in twee dagen, later in één dag en eenmaal ook in 2,5 uur uitgevoerd.

Zoo spoedig mogelijk, meestal den volgenden dag, werd de aldus verkregen suspensie voor de adsorptie gebruikt.

De bepaling van het aluminiumgehalte der suspensies is zeer eenvoudig.

Een bepaalde hoeveelheid hiervan, b.v. 20 c.c., wordt in duplo in een droogstoof bij ongeveer 150° C. ingedroogd en vervolgens gegloeid tot constant gewicht. Het teruggewogen Al_2O_3 wordt omgerekend tot grammen Al_2O_3 per c.c. suspensie. Als hoeveelheid grammen Al_2O_3 per c.c. suspensie wordt aangenomen het gemiddelde der duploproef.

b. Adsorptie met de aluminiumhydroxydesuspensie.

Aan 1 liter van het al dan niet met 10 % azijnzuur ten opzichte van P_H gecorrigeerde toxine of anatoxine werd 200 c.c. der bovenbeschreven suspensie toegevoegd. Na een kwartier staan, gedurende welken tijd eenige malen krachtig werd doorgeschud, werd afgezogen, het residu tweemaal met 600 c.c. gedestilleerd water gewasschen en daarna opgewreven met 200 c.c. 2,4 % natriumfosfaatoplossing. ($Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$.)

Na 1—2 uur staan werd wederom afgezogen en de heldere vloeistof door een Seitz-Entkeimungsfilter gefiltreerd.

Werd het residu opgewreven met 200 c.c. 15 % natriumfosfaatoplossing, dan werd na afzuigen het filtraat eerst door uitvriezen van de overmaat natriumfosfaat bevrijd en daarna de heldere vloeistof door een Seitz-Entkeimungsfilter gefiltreerd. Van het begin- en eindproduct werd steeds de antigeenwaarde, het totaal stikstofgehalte en de waterstofionenconcentratie bepaald.

Als zuiveringsfactor werd ook hier weer beschouwd het quotiënt:

$$\frac{\frac{A.W.}{N} \text{ gezuiverd product.}}{\frac{A.W.}{N} \text{ ruw product.}}$$

De bij deze proeven verkregen gezuiverde eindproducten werden eveneens bewaard onder toluol en op geregelde tijden hiervan ook de antigeenwaarden bepaald om een indruk van de houdbaarheid dezer gezuiverde producten te verkrijgen.

3. Bepaling der antigeenwaarden.

De antigeenwaarden der ongezuiverde en gezuiverde producten werden bepaald met behulp van de vlokingsreactie volgens Ramon (22). Hierbij wordt gebruik gemaakt van een serum van bekende sterkte, hetwelk zoo sterk wordt verdund, dat deze serumverdunding 100 of 200 A.E. per c.c. bevat.

Aan een rij buisjes, waarin eerst 5 c.c. van het te onder-

zoeken product is gebracht, worden nu opklimmende hoeveelheden antitoxine-eenheden toegevoegd, benodigd voor de antigeenwaarde, die men in elk buisje vermoedt. Daarna worden de buisjes geplaatst in een waterbad bij 50° C. Het buisje waarin het eerst vlokking optreedt, geeft dan de gezochte antigeenwaarde aan.

4. *Bepaling der totaal stikstofgehalten.*

Het stikstofgehalte der ongezuiverde en gezuiverde producten werd bepaald met een eenigermate gewijzigde methode volgens Kjeldahl. Deze methode werd steeds uitgevoerd in duplo en dan het gemiddelde hiervan als vaste waarde aangenomen.

In een Kjeldahlkolf wordt gebracht een schepje van het mengsel: $97,5\%$ K_2SO_4 + $2,5\%$ $CuSO_4$. Met een geijkte pipet wordt 5 c.c. van het te onderzoeken product in de zelfde kolf gebracht, waarna nog 20 c.c. geconcentreerd zwavelzuur wordt toegevoegd. Dit geheel wordt, na goed mengen, verhit op een zandbad totdat de vloeistof in de kolf een licht blauwgroene tint aanneemt. Het bovengenoemde mengsel wordt toegevoegd, om de verbranding der organische stoffen te bespoedigen. Door over te gaan van cupri- in cupro-verbinding, draagt kopersulfaat de zuurstof over op de te oxydeeren stoffen. Zelf wordt de cuproverbinding door de zuurstof uit de lucht, benevens het zwavelzuur weer gemakkelijk tot cupriverbinding geoxydeerd.

Door de verhitting worden de stikstofhoudende bestanddeelen van organischen aard vernield, waarbij steeds de stikstof in den vorm van ammoniak vrij komt en deze zich met het zwavelzuur verbindt tot ammoniumsulfaat.

Wanneer de blauwgroene kleur aanwezig is kan men aannemen, dat alle stikstof aanwezig is in den vorm van ammoniumsulfaat. Hierna wordt verdund met 250 c.c. leidingwater, geschud en eenig puimsteen toegevoegd. Vervolgens toevoeging van 50 à 60 c.c. 50% natronloog, waardoor de vloeistof alkalisch wordt gemaakt en de ammoniak in vrijheid gesteld.

Door overdestilleeren vangt men deze ammoniak op in een Erlenmeyer, waarin zich bevindt een schepje boorzuur, 90 c.c. gedestilleerd water en 5 druppels eener 0,5 % oplossing van broomkresolgroen in alcohol als indicator.

Men destilleert circa 150 c.c. over. Boorzuur bindt de ammoniak volledig.

Vervolgens wordt getitreerd met $\frac{1}{10}$ normaal zoutzuur, totdat de blauwe kleur der vloeistof in een even groene verkleuring overgaat. Bij gebruik maken van boorzuur wordt de ammoniak direkt teruggetitreerd, omdat ammoniumboraat zich weer gemakkelijk splitst en bovendien behoeven we hierdoor de gebruikte hoeveelheid boorzuur niet te kennen. Verder geeft boorzuur ook geen moeilijkheden bij het omslaan van de indicator.

Een blancoproef, waarbij men als organische substantie die vernield wordt, zuivere stikstofvrije glucose gebruikt, wordt op bekende wijze in rekening gebracht.

5. Bepaling der waterstofionenconcentraties.

De P_H -bepalingen der begin- en eindproducten werden verricht met het toestel, hetwelk is uitgevoerd door *Barendrecht* en volgens een gewijzigde techniek beschreven door *Jan Smit* (163).

6. Bepaling der hoeveelheid antitoxinen in het serum.

De hoeveelheid antitoxinen in het serum werd bepaald met behulp van de intracutane titratiemethode, zooals deze in 1909 is voorgesteld door *Römer* en *Sames*. Nadien heeft deze methode eenige wijzigingen ondergaan: in 1922 door *Kellogg*, welke slechts bepaalde of het serum meer of minder dan $\frac{1}{30}$ A.E. per c.c. bevatte. De laatste wijziging der intracutane titratiemethode is in 1931 beschreven door *Glenny* en *Mona Llewellyn-Jones* (121) en hier te lande uitgewerkt door *Pondman* en *Tasman* (162).

Volgens deze techniek werd hier hoofdzakelijk te werk gegaan.

Voor de proeven werden alleen gebruikt witte caviae met een gewicht van 300 gram of meer.

De huid der caviae mag niet gelaedeerd zijn. Eerst werden de haren aan de zijanten geknipt, op den rug werd een smalle streep haar overgelaten. Na het knippen behandelde men de huid met een ontharingspasta van de volgende samenstelling:

bariumsulfide 7 deelen, meel 7 deelen, talk 7 deelen, gepoederde harde zeep 1 deel.

Een kleine hoeveelheid van dit mengsel werd met wat water tot een papje verwerkt. Deze pasta werd nu op de huid gebracht en eenigen tijd hierop gelaten. Daarna kon de pasta, met inbegrip der haren, gemakkelijk worden verwijderd.

Voorafgaande aan de eigenlijke titratie wordt eerst standaardserum (Frankfurt) getitreerd tegenover een toxine van bekende sterkte. Eén c.c. eener verdunning van standaardserum, welke $\frac{1}{10}$ A.E. per c.c. bevat, wordt gemengd met afdalende hoeveelheden van een toxine van bekende sterkte en elk dezer aldus verkregen mengsels met physiologische zoutoplossing aangevuld tot 10 c.c. Na goed schudden wordt van elk dezer mengsels 0,2 c.c. intracutaan ingespoten bij een cavia om zoodoende de „*minimal reaction dosis*” (M.R.D.) volgens *Glenny* te leeren kennen. Hieronder wordt verstaan die hoeveelheid toxine, welke, gemengd met $\frac{1}{10}$ A.E., nog juist bij intracutaan inspuiten als reactie een kleine roodheid te zien geeft. De plaatsen van inspuiting kunnen worden gemarkeerd met Oost-Indische inkt. Na 24 uur wordt afgelezen.

Op de zodoende vooraf bepaalde M.R.D. wordt nu ingesteld om het antitoxinengehalte van het serum te bepalen.

Verschillende opklimmende serumhoeveelheden worden gemengd met die hoeveelheid toxine, welke men in de M.R.D. heeft leeren kennen. Deze mengsels worden eveneens met physiologische zoutoplossing aangevuld tot 10 c.c. en, na goed schudden, wordt van elk dezer mengsels weer 0,2 c.c. intracutaan bij een cavia ingespoten en na 24 uur afgelezen.

Die hoeveelheid serum, gemengd met de hoeveelheid toxine

van het mengsel der M.R.D., welke een reactie geeft overeenkomende met die van de M.R.D., bevat dan $\frac{1}{10}$ A.E. De hoeveelheid antitoxine-eenheden per c.c. serum kan nu worden berekend.

Deze methode is zeer betrouwbaar en economisch, kost weinig dieren en de uitkomsten zijn vlug bekend.

Op deze wijze zou het volgens *Glenny* zelfs mogelijk zijn $\frac{1}{2000}$ tot $\frac{1}{5000}$ A.E. per c.c. serum te bepalen.

Door mij werd voor deze intracutane titratiemethode ook nog gebruik gemaakt van witte konijnen, zooals deze in 1931 is aangegeven door *Claus Jensen* (151).

Hiervoor werden gebruikt gezonde mannelijke witte konijnen van ongeveer 3 K.G., welke ook op de beschreven wijze werden onthaard en ingespoten. Aflezing geschiedde hierbij echter eerst na tweemaal 24 uur.

Volgens mijn ervaring is ook de methode van *Claus Jensen* zeer betrouwbaar en bovendien kunnen op het konijn meer inspuitingen geplaatst worden dan bij de cavia.

De locale reacties bij het konijn geven meer aanleiding tot necrose dan bij de cavia en er zijn scherpere verschillen waar te nemen bij het afnemen in sterkte der reacties, welke door de mengsels worden veroorzaakt.

HOOFDSTUK IV

EIGEN ONDERZOEK

VERGELIJKENDE ZUIVERINGSPROEVEN

§ 1.

Zuiveringsproeven volgens de precipitatiemethode Zuiveringsproeven volgens de adsorptiemethode, Zonder correctie van de P_H

Als voorbeeld van toxinezuivering en anatoxinezuivering, uitgevoerd volgens de precipitatiemethode en volgens de adsorptiemethode zonder correctie van de P_H , worden hieronder de verschillende bepalingen van toxine No. 204, met inbegrip der resultaten, weergegeven.

Toxine No. 204.

A.W. = 10. Kf. = 24 min. totaal N = 0,299,

$$\frac{A.W.}{N} = 33. P_H = 8,59.$$

Resultaten:

Precipitatiemethode: A.W. = 38. Kf = 7 min, totaal N = 0,164.

$$\frac{A.W.}{N} = 232. P_H = 7,69.$$

Opbrengst = 76 %. Zuiveringsfactor = 7.

Adsorptiemethode: suspensie van aluminiumhydroxyde be-

reid in 2 dagen, 4 maal gewasschen; bevatte 0,01662 gram Al_2O_3 per c.c.

A.W. = 28. Kf = 9 min. totaal N = 0,032.

$\frac{\text{A.W.}}{\text{N}} = 875$. P_H = niet verricht.

Opbrengst = 60 % Zuiveringsfactor = 27.

De elutie geschiedde met 2,4 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$.

Hierbij moet, ter nadere verklaring der gebruikte teekens, het volgende worden opgemerkt:

A.W. = antigeenwaarde.

Kf = uitvlokkingsnelheid.

N = stikstofgehalte.

P_H = waterstofionenconcentratie.

Zuiveringsfactor = $\frac{\frac{\text{A.W.}}{\text{N}} \text{ gezuiverd product.}}{\frac{\text{A.W.}}{\text{N}} \text{ ruw product.}}$

De suspensies van aluminiumhydroxyde, gebruikt voor toepassing der adsorptiemethode, werden in de hieronder aangegeven tijden bereid en bij de ter plaatse genoemde toxinen en anatoxinen toegepast.

Suspensie bereid in 2 dagen 4 × gewasschen	Suspensie bereid in 1 dag 5 à 6 × gewasschen		Suspensie bereid in 2,5 uur 5 × gewasschen
Toxine 204	Toxine 195	Anatoxine 202(a)	Anatoxine 203(b)
" T 1	" 197	" 202(c)	
" 199	" T 2	" 203(a)	
Anatoxine 198	" 200	" T 1	
" 202(b)	" 198	" T 2	
	" T 4	" 200	
	" T 6	" 195	

Een der door mij bereide suspensies van aluminiumhydroxyde werd nog verdund tot het gehalte 0,0007 gr. Al_2O_3 per c.c., welk gehalte op één plaats in de literatuur (130) door *Schmidt* wordt opgegeven.

TABEL I.

UITGANGSPRODUCT							Adsorptie				
No.	Uitgangs- vloeistof	A.W.	Uitvlokings- snelh. in min.	Tot N	A.W. N	P _H	Gehalte sus- pensie aan gr. Al ₂ O ₃ per c.c.	A.W.	Uitvlokings- snelh. in min.	Tot N	A.W. N
204	toxine	10	24	0,299	33	8,59	0,01662	28	9	0,032	875
T 1	"	6	50	0,314	19	8,33	0,01662	18	14	0,030	600
199	"	9,5	27	0,431	22	8,02	0,01685	26	9	0,029	897
195	"	10	25	0,312	32	8,49	0,0151	14	30	0,046	304
197	"	9	30	0,327	28	8,12	0,0151	19	5	0,048	396
T 2	"	7,5	42	0,347	22	8,38	0,0146	m.	—	0,057	—
200	"	10	28	0,452	22	8,26	0,0146	m.	—	0,077	—
198	"	9	23	0,273	33	8,47	0,0143	27	5	0,026	1038
T 4	"	10	24	0,279	36	8,30	0,0143	26	5	0,025	1040
T 6	"	12	20	0,288	42	8,21	0,0142	20	14	0,020	1000
198	anatoxine	9,5	70	0,262	36	7,18	0,01685	30	23	0,071	423
202(a)	"	11	49	0,319	34	7,81	0,0148	6	300	0,037	162
202(b)	"	11	49	0,319	34	7,81	0,0171	9	160	0,037	243
202(c)	"	11	49	0,319	34	7,81	0,0152	m.	—	0,043	—
203(a)	"	12	41	0,334	36	7,82	0,0157	m.	—	0,050	—
203(b)	"	12	41	0,334	36	7,82	0,0146	m.	—	0,046	—
T 1	"	5,5	97	0,330	17	6,71	0,0157	18	33	0,050	360
T 2	"	6	105	0,336	18	7,40	0,0149	m.	—	0,046	—
200	"	9	56	0,461	20	7,03	0,0149	m.	—	0,058	—
195	"	7	97	0,308	23	7,94	0,0142	m.	—	0,030	—

gemiddelde waarde 0,0154

gelukte toxinen
gelukte anatoxinen

1) m. = mislukt.

2) n = niet verricht.

GEZUIVERDE PRODUCTEN

methode				Precipitatiemethode							
Zuiverings- factor	P _H eindproduct	Verhouding eindvol. tot uitgangsvol.	Opbrengst in %	A.W.	Uitvlokings- snelh. in min.	Tot N	A.W. N	Zuiverings- factor	P _H eindproduct	Verhouding eindvol. tot uitgangsvol.	Opbrengst in %
27	n	1/5	60	38	7	0,164	232	7	7,69	1/5	76
31	n	1/5	56	24	15	0,138	174	9	7,65	1/5	80
41	8,14	1/5	55	36	14	0,113	319	14	7,81	1/5	76
9	8,85	1/5	28	32	6	0,160	200	6	7,79	1/5	64
14	8,64	1/5	42	28	7	0,090	311	11	7,90	1/5	64
—	9,33	1/5	—	26	8	0,192	135	6	7,78	1/5	69
—	9,03	1/5	—	20	11	0,121	165	7	7,48	1/5	40
31	8,65	1/5	60	36	5	0,089	404	12	7,83	1/5	80
29	8,77	1/5	52	38	5	0,112	339	9	7,51	1/5	76
24	8,75	1/5	33	49	5	0,113	271	6	7,45	1/5	82
12	8,18	1/5	63	m.	—	0,085	—	—	7,69	1/5	—
5	8,36	1/5	11	39	12	0,202	193	6	7,43	1/5	70
7	8,20	1/5	16	n	—	—	—	—	—	—	—
—	8,57	1/5	—	n	—	—	—	—	—	—	—
—	8,99	1/5	—	42	7	0,256	164	5	7,46	1/5	70
—	9,43	1/5	—	n	—	—	—	—	—	—	—
21	8,47	1/5	65	21	20	0,117	180	11	7,29	1/5	76
—	8,13	1/5	—	25	19	0,216	116	6	7,23	1/5	83
—	8,16	1/5	—	23	21	0,195	117	6	7,20	1/5	51
—	8,33	1/5	—	34	15	0,181	301	13	7,61	1/5	97
26			48 %					toxinen 9			71 %
13			47 %					gelukte anatoxinen 8			74 %

Aan 1 liter uitgangsvloeistof werd 200 c.c. van deze verdunde suspensie toegevoegd. Er ontstond slechts een zeer weinig troebele vloeistof, geen neerslag. Een dergelijke, gering troebele vloeistof bleek praktisch niet voor verwerking vatbaar te zijn, zoodat de opgave van Schmidt vermoedelijk op een vergissing zal berusten.

Bij alle zuiveringen volgens de precipitatiemethode vond de elutie plaats met 10 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ en opvolgend uitvriezen.

Bij de zuiveringen volgens de adsorptiemethode werd hiervoor 2,4 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ gebruikt, uitgezonderd bij de hieronder genoemde toxinen en anatoxinen, waar de elutie geschiedde met 15 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ en opvolgend uitvriezen.

Toxine T 2	Anatoxine 202(c)
„ 200	„ 203(a)
	„ 203(b)
	„ T 1

Overigens wordt voor de door mij verrichte zuiveringen volgens de precipitatiemethode en volgens de adsorptiemethode zonder correctie van de P_H verwezen naar tabel 1, voor de hierbij gevolgde zuiveringstechniek en werkwijzen naar hoofdstuk III.

Uit tabel I volgt dat van de 10 toxinezuiveringen *volgens de adsorptiemethode* er 8 gelukt en 2 mislukt zijn.

Van de 7 anatoxinezuiveringen *volgens de adsorptiemethode* zijn er 3 gelukt (waarvan 1 slecht) en 4 mislukt.

Het aantal mislukkingen bij de anatoxinen is dus naar verhouding grooter dan bij de toxinen.

Als mislukt werd de adsorptie beschouwd, wanneer van het verkregen product door middel van uitvlokking geen antigeenwaarde (A.W.) was te bepalen. Zooals verder zal blijken speelt hierbij de P_H van het uitgangsproduct waarschijnlijk een rol. Het gehalte aan Al_2O_3 der suspensies van aluminiumhydroxyde is niet de beslissende factor, zooals de tabel leert.

De gemiddelde zuiveringsfactor bij de gelukte toxinezuiveringen *volgens de adsorptiemethode* bedroeg 26, de gemiddelde opbrengst 48 %.

De gemiddelde zuiveringsfactor bij de gelukte anatoxinezuiveringen *volgens de adsorptiemethode* bedroeg 13, de gemiddelde opbrengst 47 %.

De 10 toxinezuiveringen *volgens de precipitatiemethode* zijn allen gelukt; gemiddelde zuiveringsfactor 9, gemiddelde opbrengst 71 %.

Van de 7 anatoxinezuiveringen *volgens de precipitatiemethode* zijn er 6 gelukt en 1 mislukt; gemiddelde zuiveringsfactor der gelukte anatoxinen 8, gemiddelde opbrengst der gelukte anatoxinen 74 %.

TABEL II.

Verandering in antigeenwaarde der gezuiverde toxinen en anatoxinen, telkens met één maand tusschentijd bepaald.

No.	prec. meth.	ads. meth.	No.	prec. meth.	ads. meth.	No.	prec. meth.	ads. meth. a	ads. meth. b
gez. tox. 204	38	28	gez. tox. 198	36	27	gez. ana- tox. 202	39	6	9
	38	28		35	26		37	6	9
	38	27		36	26		38	6	9
	36	26		35	24		38	6	9
	36	26		36	24		38	6	9
	36	26		36	24		36	6	9
	36	26		35	26		37	6	9
	36	28							
gez. tox. T 1	24	18	gez. tox. T 4	38	26	gez. ana- tox. T 1	21	18	
	22	18		36	24		21	16	
	22	18		36	24		21	16	
	22	18		36	24		21	16	
	22	16		36	24		21	16	
	22	16		36	24		21	16	
	21	16		36	24		21	16	
	21	16							

TABEL II (vervolg van blz. 65).

No.	prec. meth.	ads. meth.	No.	prec. meth.	ads. meth.	No.	prec. meth.	ads. meth. a	ads. meth. b
gez. tox. 199	36 36 36 36 32 32 32 33	26 26 25 24 20 20 20 22	gez. ana- tox. T 2	25 24 24 24 24 24 24		gez. ana- tox. 203	42 42 42 42 40 40 40 40		
gez. ana- tox. 198		30 29 30 29 26 26 26 26	gez. ana- tox. 200	23 21 21 21 21 21 21		gez. tox. T 2	26 26 26 26 26 26 26		
gez. tox. 195	32 32 32 32 30 30 31	14 13 14 14 14 14 16	gez. ana- tox. 195	34 30 30 30 30 29		gez. tox. 200	20 20 20 20 20 20 20		
gez. tox. 197	28 28 27 27 26 26 28	19 19 19 19 19 19 21	gez. tox. T 6	49 47 46 46 46 46	20 20 20 20 20 20				

In tabel II is overzichtelijk weergegeven de verandering in antigeenwaarde van elk gezuiverd diphtherietoxine en -anatoxine, dus de *houdbaarheid* dezer producten, bepaald met de vlokingsreactie volgens Ramon.

Voor beide methodes neemt de antigeenwaarde der gezuiverde producten met de tijd zeer weinig en in ongeveer gelijke mate af.

De houdbaarheid is dus dezelfde.

Waar bij enkele producten de A.W.-waarde schijnbaar is toegenomen, moet daarvan de verklaring zijn kleine afwijkingen in het bindend vermogen van het gebruikte serum of het gelijktijdig vlokken in naburige buisjes, dus het moeilijk vaststellen van de „floculation initiale”.

Wanneer men de gezuiverde producten koud en in het donker onder toluol bewaart, is de vermindering der antigeenwaarde binnen een niet al te groote tijdruimte slechts gering.

§ 2.

Zuiveringsproeven volgens de precipitatiemethode.

Zuiveringsproeven volgens de adsorptiemethode met correctie van de P_H .

De P_H van toxinen, bestemd voor de zuivering volgens de adsorptiemethode, werd gebracht op $\pm 7,5$; de P_H van anatoxinen, bestemd voor de zuivering volgens de adsorptiemethode, werd gebracht op ± 6 .

Hiervoor werd gebruik gemaakt van 10 % azijnzuur.

De suspensies van aluminiumhydroxyde, gebruikt voor toepassing der adsorptiemethode, werden allen in 1 dag bereid, maar een verschillend aantal keeren gewasschen, varieerende van 4—7 maal.

Bij alle zuiveringen volgens de precipitatiemethode geschiedde de elutie met 10 % Na_2HPO_4 12 H_2O en opvolgend uitvriezen.

Bij alle zuiveringen volgens de adsorptiemethode werd voor de elutie 2,4 % Na_2HPO_4 12 H_2O gebruikt.

Voor de door mij verrichte zuiveringen volgens de precipitatiemethode en volgens de adsorptiemethode met correctie

TABEL III.

No.	Uitgangs- vloeistof	UITGANGSPRODUCT					Adsorptie			
		A.W.	Uitvlokkings- snelheid in min.	Totaal N	$\frac{A.W.}{N}$	P _H	P _H gebracht op	Suspensie Gr. Al ₂ O ₃ per c.c.	A.W.	Uitvlokkings- snelh. in min.
T 2	toxine	10	23	0,385	23	8,37	7,51	0,0148	36	6
211	"	10	27	0,290	34	8,31	7,58	0,0148	26	8
T 7	"	10	21	0,296	34	8,49	7,53	0,0150	30	7
T 3A	"	8	28	0,346	23	8,12	7,36	0,0153	12	30
T 8	"	11	21	0,267	41	8,59	7,48	0,0146	29	8
T 9	"	11	39	0,253	43	8,68	7,33	0,0133	25	12
T 10	"	8,5	40	0,246	34	8,77	7,49	0,0135	22	11
T 11	"	9	26	0,255	35	8,77	7,56	0,0135	24	10
T 12	"	12	20	0,294	41	8,18	7,57	0,0138	18	18
T 13	"	11	27	0,265	42	8,58	7,45	0,0138	22	15
T 14	"	11	30	0,269	41	8,65	7,59	0,0146	27	9
T 15	"	11	27	0,270	41	8,59	7,59	0,0146	26	10
T 16	"	9	29	0,293	31	8,38	7,57	0,0142	13	30
T 17	"	8,5	31	0,284	30	8,40	7,64	0,0142	m.	—
T 18	"	10,5	25	0,290	36	8,57	7,51	0,0148	18	16
T 19	"	11	25	0,284	38	8,64	7,62	0,0148	18	19
T 20	"	9	32	0,290	31	8,38	7,60	0,0155	24	12
198	anatoxine	9,5	70	0,262	36	7,18	5,75	0,0146	30	18
T 1	"	5,5	97	0,330	17	6,71	5,77	0,0146	17	34
203	"	12	41	0,334	36	7,82	5,77	0,0150	29	21
198A	"	8	71	0,265	30	7,29	6,03	0,0150	28	18
T 2A	"	9	52	0,277	33	7,67	5,90	0,0153	30	11
194	"	12	47	0,272	44	7,62	5,81	0,0146	32	18
T 6	"	9	33	0,272	33	7,27	5,99	0,0133	39	11
T 8	"	10,5	49	0,252	42	7,83	5,97	0,0153	33	21
T 9	1	9	57	0,253	36	7,79	6,01	0,0153	25	28
T 10	"	8,5	160	0,242	35	7,81	5,97	0,0155	26	35

Gemiddelde waarde 0,0146¹⁾

¹⁾ Deze waarde ligt iets beneden die, welke wij vonden voor suspensies, welke in twee dagen bereid waren, daar in het laatste geval uit hoofde van de grootere tusschenruimten bij de waterververschingen het neerslag vollediger bezinken kan en dus minder aluminiumhydroxyde met het waschwater verwijderd wordt.

GEZUIVERDE PRODUCTEN

methode					Precipitatiemethode						
Totaal N	A.W. N	P _H eindprod.	Zuiverings- factor	% antigeen terug- gewonnen	A.W.	Uitvlokings- snelheid in min.	Totaal N	A.W. N	P _H eindprod.	Zuiverings- factor	% antigeen terug- gewonnen
0,033	1091	8,14	47	72	44	8	0,097	454	7,72	20	88
0,044	591	8,11	17	52	40	9	0,149	275	7,66	8	80
0,032	938	8,44	28	60	42	3	0,129	326	7,82	10	84
0,023	522	8,32	23	24	22	9	0,098	225	7,69	10	55
0,019	1526	n	37	53	44	4	0,111	400	7,71	10	80
0,034	735	8,26	17	45	42	6	0,150	280	7,96	7	76
0,030	733	8,17	22	52	10	120	0,107	94	7,29	3	24
0,028	857	8,25	24	53	35	9	0,145	241	7,91	7	78
0,067	269	8,16	7	30	42	7	0,115	365	7,44	9	70
0,053	415	8,11	10	40	49	5	0,092	533	7,44	13	89
0,019	1421	8,28	35	49	40	7	0,110	364	7,64	9	73
0,012	2167	8,11	53	47	46	6	0,106	434	7,74	11	83
0,038	342	8,49	11	29	38	6	0,125	304	7,45	10	85
0,023	—	8,12	—	—	38	6	0,128	297	7,45	10	88
0,027	667	7,95	19	34	42	6	0,137	307	7,72	9	80
0,027	667	8,33	18	33	46	7	0,156	295	7,57	8	84
0,029	828	7,90	27	53	36	7	0,129	279	7,30	9	80
0,071	423	7,82	12	63	n	—	—	—	—	—	—
0,058	293	7,69	11	62	n	—	—	—	—	—	—
0,088	329	8,77	9	48	n	—	—	—	—	—	—
0,071	394	8,12	13	70	32	13	0,065	491	7,78	16	60
0,057	526	7,95	16	67	40	11	0,131	305	7,51	9	89
0,077	416	n	9	53	49	8	0,151	325	7,50	7	82
0,050	780	7,90	24	87	43	14	0,098	439	7,64	13	96
0,057	579	7,34	14	63	42	17	0,155	271	7,31	6	80
0,041	609	7,61	17	45	36	18	0,140	257	7,36	7	80
0,061	426	7,41	12	61	32	27	0,124	258	7,39	7	75

Toxine 25 . . 44%

Anatoxine . . . 14 . . 62%

Toxine 10 . . 76%

Anatoxine . . . 9 . . 83%

m = mislukt.

n = niet verricht.

van de P_H wordt verder verwezen naar tabel 3, voor de hierbij gevolgde zuiveringstechniek en werkwijzen naar hoofdstuk III.

Uit tabel III blijkt dat na correctie der P_H van de 17 toxinezuiveringen *volgens de adsorptiemethode* er 16 zijn gelukt en slechts 1 mislukt.

De 10 anatoxinezuiveringen *volgens de adsorptiemethode* zijn allen gelukt, waaruit volgt dat de P_H van het uitgangproduct, vooral van de anatoxinen, voor het gelukken der zuiveringen volgens de adsorptiemethode blijkbaar van groote beteekenis is.

De gemiddelde zuiveringsfactor bij de gelukte toxinezuiveringen *volgens de adsorptiemethode* bedroeg 25, de gemiddelde opbrengst 44 %.

Deze waarden verschillen dus niet veel van die der gelukte toxinezuiveringen volgens de adsorptiemethode uit tabel I, waarbij geen aandacht werd geschonken aan de P_H van het uitgangproduct.

De gemiddelde zuiveringsfactor bij de gezuiverde anatoxinen volgens de adsorptiemethode bedroeg 14 en de gemiddelde opbrengst 62 %.

Deze gemiddelde zuiveringsfactor verschilt dus weinig van die der gelukte anatoxinen volgens de adsorptiemethode uit tabel I, *de gemiddelde opbrengst blijkt echter belangrijk hooger te zijn nu aandacht is geschonken aan de P_H van het uitgangsanatoxine.*

De 17 toxinezuiveringen *volgens de precipitatiemethode* zijn allen gelukt; de gemiddelde zuiveringsfactor bedroeg 10, de gemiddelde opbrengst 76 %.

De 7 anatoxinezuiveringen *volgens de precipitatiemethode* zijn eveneens allen gelukt; de gemiddelde zuiveringsfactor bedroeg 9, de gemiddelde opbrengst 83 %.

Wanneer wij nu de adsorptiemethode en de precipitatiemethode aan een nadere beschouwing onderwerpen, dan blijkt dat *de gemiddelde zuiveringsfactor van de gezuiverde toxinen volgens de adsorptiemethode belangrijk hooger is*

dan die der gezuiverde toxinen volgens de precipitatiemethode.

De gemiddelde zuiveringsfactor van de gezuiverde anatoxinen volgens de adsorptiemethode is ook hooger, evenwel in geringere mate dan die der gezuiverde anatoxinen volgens de precipitatiemethode; de gemiddelde opbrengst der gezuiverde anatoxinen volgens de adsorptiemethode blijft echter veel lager dan die der gezuiverde anatoxinen volgens de precipatiemethode.

TABEL IV.

Verandering in antigeenwaarde der gezuiverde toxinen en anatoxinen, telkens met één maand tusschentijd bepaald.

No.	prec. meth.	ads. meth.	No.	prec. meth.	ads. meth.	No.	prec. meth.	ads. meth.	No.	prec. meth.	ads. meth.
gez. tox. T 10	10	22	gez. tox. T 3 A	22	12	gez. ana- tox. 198	30		gez. tox. T 14	40	27
	10	22		22	12		30			40	25
	10	22		22	12		28			40	27
	10	22		22	12		28			40	26
	10	20		22	12		27				
				22	12		27				
							27				
gez. tox. T 11	35	24	gez. ana- tox. T2A	40	30	gez. ana- tox. T 1	17		gez. tox. T 15	46	26
	33	23		39	29		17			43	26
	33	23		38	30		15			44	24
	33	21		38	29					44	24
	33	21		40	28						
				40	29						
gez. tox. T 12	42	18	gez. ana- tox. 194	49	32	gez. ana- tox. 203	29		gez. tox. T 16	38	13
	40	18		47	30		29			36	13
	40	17		46	30		27			35	13
	40	16		48	31		27			35	13
	39	14		46	30		27				
							27				
							27				

TABEL IV (vervolg van blz. 71).

No.	prec. meth.	ads. meth.	No.	prec. meth.	ads. meth.	No.	prec. meth.	ads. meth.	No.	prec. meth.	ads. meth.
gez. tox. T 13	49 47 46 44 42	22 20 20 20 20	gez. tox. T 8	44 40 38 36 34	29 26 24 24 24	gez. tox. T 5	44 40 36 34 34	36 34 31 33 34	gez. tox. T 17	38 34 34 35	
gez. ana- tox. T 8	42 42 42 42	33 32 33 32	gez. tox. T 9	42 38 37 39 37 36	25 24 24 25 24 24	gez. tox. 211	40 36 32 30 29	26 25 25 26 25	gez. tox. T 18	42 42 43 43	18 17 16 17
gez. ana- tox. T 9	36 35 35 35	25 25 25 25	gez. ana- tox. T 6	43 41 41 41 42 42	39 37 37 39 39 38	gez. tox. T 7	42 41 41 40 39 40	30 30 30 29 29 29	gez. tox. T 19	46 44 44 46	18 16 16 16
			gez. tox. T 20	36 36 36 36	24 22 22 22	gez. ana- tox. 198A	32 32 30 29 30 30	28 28 28 28 28 27	gez. ana- tox. T 10	32 32 32 32	26 26 26 26

In tabel IV is aangeteekend de verandering in antigeenwaarde van elk gezuiverd diphtherietoxine en -anatoxine, dus de *houdbaarheid* dezer producten, bepaald met de vlokingsreactie volgens Ramon.

De gezuiverde producten werden koud en in het donker onder toluol bewaard.

Voor beide methodes neemt weer de antigeenwaarde der

gezuiverde producten binnen een niet al te groote tijdruimte zeer weinig en in ongeveer gelijke mate af.

De houdbaarheid is dus dezelfde.

Waar bij enkele producten de A.W.-waarde schijnbaar is toegenomen, moet daarvan de verklaring weer zijn kleine verschillen in het bindend vermogen van het gebruikte serum of het gelijktijdig vlokken in naburige buisjes, dus het moeilijk vaststellen van de „floculation initiale”.

HOOFDSTUK V

EIGEN ONDERZOEK

VERGELIJKENDE IMMUNISATIEPROEVEN

§ 1.

Nagegaan werd:

1°. Of de antigeenwaarden (A.W.'s) van een ongezuiverd zwak anatoxine, een ongezuiverd sterk anatoxine, een gezuiverd zwak anatoxine en een gezuiverd sterk anatoxine gelijkwaardig zijn;

2°. het resultaat van het toedienen van eenzelfde hoeveelheid A.W.'s in één inspuiting of verdeeld over drie inspuitingen;

3°. de invloed van een depôtwerking door inspuiting der Ramonvlokken van het ongezuiverde product en van het gezuiverde product, dus van antigeen gebonden aan antitoxin, „Ananti”.

De gebruikte gezuiverde producten werden verkregen uitsluitend door middel van de precipitatiemethode.

De onderstaande dierproeven werden hiertoe verricht.

Groep I: *ongezuiverd zwak anatoxine, 3 maal.*

10 caviae werden 3 maal subcutaan ingespoten met 0,7 c.c. (= 5 A.W.) ongezuiverd zwak anatoxine A.W. 7. In het geheel krijgen deze caviae dus subcutaan 15 A.W. Als tusschenruimten voor de inspuitingen werden genomen resp. 3 en 2 weken.

Gebruikt werd anatoxine No. 134: A.W. = 7. Kf = 48 min.
 tot. $N = 0,300. \frac{A.W.}{N} = 23.$

Ter conserveering werd steeds 0,5 % carbol toegevoegd.
 De steriliteit werd steeds nagegaan door enten in runderbouillon en op ascitesagar; na 2 dagen werd definitief afgelezen.

Groep II: ongezuiverd sterk anatoxine, 3 maal.

10 caviae werden 3 maal subcutaan ingespoten met 0,4 c.c. (= 5 A.W.) ongezuiverd sterk anatoxine A.W. 13. In het geheel krijgen deze caviae dus subcutaan ook 15 A.W.

Als tussenruimten voor de inspuitingen weer resp. 3 en 2 weken.

Gebruikt werd anatoxine No. 194 D: A.W. = 13. Kf = 30 min. tot. $N = 0,305. \frac{A.W.}{N} = 43.$

Groep III: gezuiverd zwak anatoxine, 3 maal.

10 caviae werden 3 maal subcutaan ingespoten met 0,33 c.c. (= 5 A.W.) gezuiverd zwak anatoxine A.W. 15. In het geheel krijgen deze caviae dus subcutaan ook weer 15 A.W.

Als tussenruimten voor de inspuitingen resp. 3 en 2 weken.

Gebruikt werd gezuiverd anatoxine No. 134: A.W. = 15.
 Kf = 30 min. tot. $N = 0,101. \frac{A.W.}{N} = 149.$

Zuiveringsfactor = 6. Opbrengst = 43 %.

Groep IV: gezuiverd sterk anatoxine, 3 maal.

10 caviae werden 3 maal subcutaan ingespoten met 0,12 c.c. (= 5 A.W.) gezuiverd sterk anatoxine A.W. 43. In het geheel dus ook weer 15 A.W. subcutaan toegediend.

Als tussenruimten voor de inspuitingen resp. 3 en 2 weken.

Gebruikt werd gezuiverd anatoxine No. 194 D: A.W. = 43.
 Kf = 11 min. tot. $N = 0,168. \frac{A.W.}{N} = 256.$

Zuiveringsfactor = 6. Opbrengst = 66 %.

Groep V: ongezuiverd sterk anatoxine, 1 maal.

10 caviae werden 1 maal subcutaan ingespoten met 1,16 c.c. (= 15 A.W.) ongezuiverd sterk anatoxine A.W. 13. Elke cavia van deze groep krijgt dus ook 15 A.W. subcutaan, hier echter in één keer toegediend.

Gebruikt werd weer anatoxine No. 194 D.

Groep VI: gezuiverd sterk anatoxine (verdund), 3 maal.

10 caviae werden 3 maal subcutaan ingespoten met 1 c.c. gezuiverd sterk anatoxine A.W. 43, dat tevoren met physiologische zoutoplossing 8,6 maal was verdund (= 5 A.W.)

In het geheel krijgt elke cavia van deze groep dus subcutaan ook weer 15 A.W.

Als tusschenruimten voor de inspuitingen resp. 3 en 2 weken. Gebruikt werd gezuiverd anatoxine No. 194 D.

Groep VII: gezuiverd sterk anatoxine, 1 maal.

10 caviae werden 1 maal subcutaan ingespoten met 1 c.c. gezuiverd sterk anatoxine A.W. 43, waarvan de antigeenwaarde met physiologische zoutoplossing was teruggebracht tot 30 A.W. per c.c. In het geheel krijgt elke cavia van deze groep dus 30 A.W. subcutaan in één keer toegediend.

Gebruikt werd gezuiverd anatoxine No. 194 D.

Groep VIII: vlokken uit gezuiverd sterk anatoxine, 1 maal.

10 caviae werden 1 maal subcutaan ingespoten met 1 c.c. eener hieronder beschreven vlokkensuspensie.

30 c.c. gezuiverd sterk anatoxine A.W. 43 werden met behulp van 56 c.c. physiologische zoutoplossing teruggebracht tot 15 A.W. per c.c., dus dan 86 c.c. van 15 A.W. per c.c.

Hiervan wordt op steriele wijze 30 c.c. gemengd met $30 \times 15 = 450$ A.E. van het standaardserum (Frankfurt) en in het waterbad bij 50° C. geplaatst. Na de uitvlokking blijft dit nog een uur in het waterbad staan en wordt hierna gedurende 2 maal 24 uur in de ijskast geplaatst.

Vervolgens wordt gecentrifugeerd en de bovenstaande

vloeistof afgegoten. De vlokken worden nog één maal met physiologische zoutoplossing gewasschen en gecentrifugeerd.

De vlokken worden tenslotte gesuspenderd in 30 c.c. gezuiverd sterk anatoxine van 15 A.W. per c.c.

1 c.c. dezer suspensie bevat dus 30 A.W., waarvan 15 A.W. opgelost en 15 A.W., in aan antitoxine gebonden vorm, als vlokken.

Voor het bereiden der suspensie werd gebruikt gezuiverd anatoxine No. 194 D.

Groep IX: *vlokken uit ongezuiverd sterk anatoxine, 1 maal.*

10 caviae werden 1 maal subcutaan ingespoten met 1 c.c. eener hieronder beschreven vlokkensuspensie.

30 c.c. ongezuiverd sterk anatoxine A.W. 13 werden op steriele wijze gemengd met $30 \times 13 = 390$ A.E. van het standaardserum (Frankfurt) en hierna in het waterbad bij 50° C. tot vlokken gebracht.

De verdere bewerking dezer vlokken geschiedde op dezelfde wijze als voor de vlokken van groep VIII is uiteengezet.

De vlokken worden tenslotte gesuspenderd in 26 c.c. gezuiverd sterk anatoxine A.W. 43, waarvan de antigeenwaarde met behulp van physiologische zoutoplossing is teruggebracht van 43 A.W. op 15 A.W. per c.c.

1 c.c. dezer suspensie bevat dus ook 30 A.W., waarvan 15 A.W. opgelost en 15 A.W., in aan antitoxine gebonden vorm, als vlokken.

Voor het bereiden der suspensie werden gebruikt anatoxine No. 194 D en gezuiverd anatoxine No. 194 D.

Van groepen VIII en IX werden de locale reacties nagegaan.

De eerste dag na de inspuiting waren bij beide groepen op de entingplaats infiltraten te voelen.

De infiltraten van groep VIII (behandeld met Anantivlokken van het gezuiverde anatoxine), waren grooter dan die van groep IX (behandeld met Anantivlokken van het ongezuiverde anatoxine).

Na 5 dagen waren bij 4 caviae van groep VIII nog duidelijke infiltraten te voelen, de infiltraten der andere 6 caviae van groep VIII waren klein.

Van groep IX waren bij alle 10 caviae na 5 dagen kleine infiltraten te vinden.

De locale reacties, welke zich vormen na de inspuiting van anatoxine en gezuiverd anatoxine, zullen in latere immuniseeringsproeven nog nauwkeurig ter sprake komen.

Teneinde na te gaan in hoeverre de inspuitingen met anatoxine, gezuiverd en ongezuiverd, en met vlokken door de dieren zonder schade werden verdragen, werd het lichaamsgewicht der dieren geregeld gecontrôleerd, waarbij bleek dat dit regelmatig toenam.

Door verbloeding na de hartpunctie of door intercurrente ziekten verloor ik in

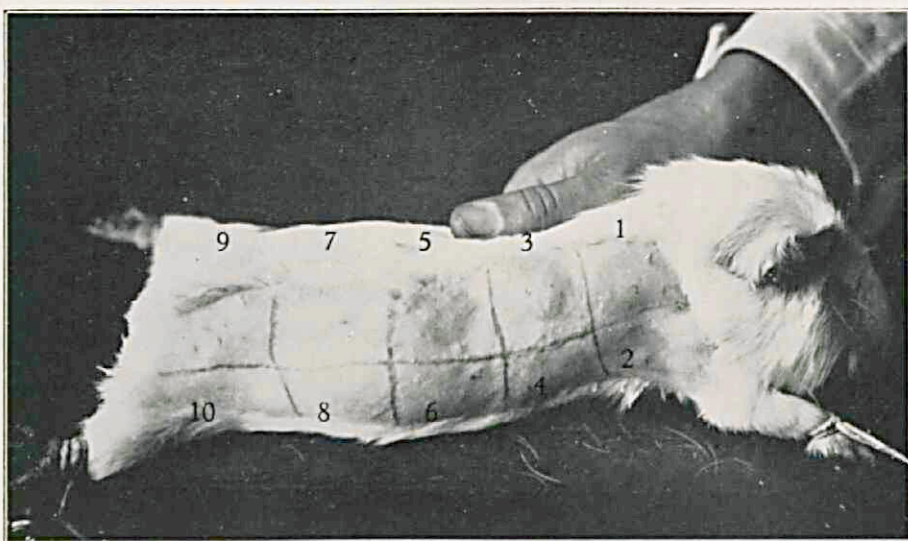
groep I:	1	proefdier
„ II:	5	proefdieren
„ III:	3	„
„ IV:	3	„
„ V:	4	„
„ VI:	4	„
„ VII:	6	„
„ VIII:	5	„
„ IX:	5	„

Bij geen dezer dieren werden bij de sectie verschijnselen van diphtherievergifting gevonden.

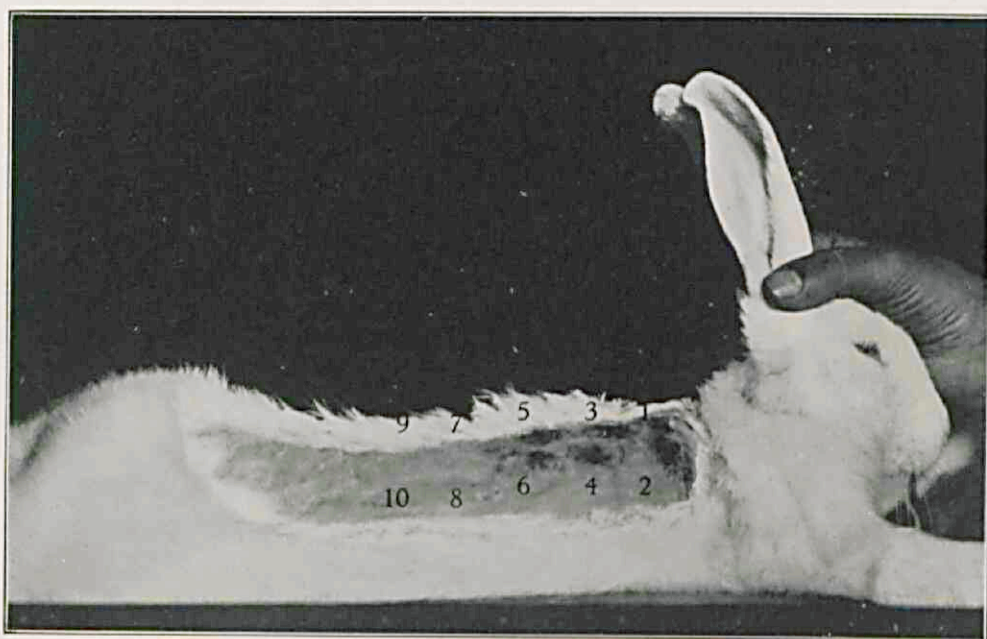
Antitoxinegehalte 7 weken na de eerste inspuiting

Om van de verkregen immuniteit der behandelde proefdieren een indruk te krijgen, werd 7 weken na de eerste inspuiting van alle dieren door middel van hartpunctie bloed afgenomen. Het bloed van alle caviae uit één groep werd gemengd en na het stollen het uitgeperste serum afgecentrifugeerd. Voor conserveering werd 1 $\frac{0}{100}$ superol aan de sera toegevoegd.

Voor de titratie dezer sera werd gebruik gemaakt van de



Bepaling der bindingswaarde van het gebruikte toxine op de cavia.



Bepaling der bindingswaarde van het gebruikte toxine op het konijn.

door *Glenny* verbeterde Römer-methode, welke hier te lande is uitgewerkt door *Pondman* en *Tasman*, beschreven in hoofdstuk III op blz. 57.

De titratie werd verricht op de cavia en op het konijn.

Om de bindingswaarde van het te gebruiken toxine te bepalen, werd gewerkt met standaardserum (Frankfurt) en een toxine met A.W. = 14 en d.l.m. = 2,5 m.gr.

De resultaten dezer bepaling, uitgevoerd op de cavia en op het konijn, zijn van de bijgaande photo's af te lezen en in tabel V overzichtelijk weergegeven.

TABEL V
Bepaling bindingswaarde van het gebruikte toxine.

No. van het mengsel	In 10 cc. voorhanden		Huidreactie na 24 u. bij de cavia	Huidreactie na 2×24 u. bij het konijn
	A.E.	d.l.m.		
1	0,1 A.E.	20	+++	+++
2	"	16	+++	+++
3	"	12	++	+++
4	"	10	++	++
5	"	8	+	++
6	"	6	±	++
7	"	4	—	+
8	"	2	—	—
9	"	1	—	—
10	"	0,8	—	—

Uit tabel V volgt dat de mengsels 5,6 en 7 per 10 c.c. 0,1 A.E. en resp. 8,6 en 4 d.l.m. bevatten of in 0,2 c.c. $\frac{1}{500}$ A.E. en resp. 0,16, 0,12 en 0,08 d.l.m.

Daar deze mengsels bij de cavia een duidelijke overgang van positieve tot negatieve reactie lieten zien, werd voor de eindtitratie bij de cavia gebruik gemaakt van mengsels, die in 10 c.c., behalve de toegevoegde hoeveelheid serum, 6 d.l.m. van het gebruikte toxine bevatten. Gelijktijdig werd dan steeds 0,2 c.c. van de mengsels 5,6 en 7 als contrôle intracutaan ingespoten.

Daar de mengsels 6,7 en 8 bij het konijn ook een duidelijke overgang van positieve tot negatieve reactie lieten zien, werd voor de eindtitratie bij het konijn gebruik gemaakt van mengsels, die in 10 c.c., behalve de toegevoegde hoeveelheid serum, 4 d.l.m. van het gebruikte toxine bevatten.

De mengsels 6,7 en 8 bevatten per 10 c.c. 0,1 A.E. en resp. 6,4 en 2 d.l.m., of in 0,2 c.c. $\frac{1}{500}$ A.E. en resp. 0,12, 0,08 en 0,04 d.l.m.

Gelijktijdig werd van deze mengsels 6,7 en 8 0,2 c.c. als contrôle intracutaan ingespoten. Het serum der 9 groepen werd nu op de in tabel VI aangegeven wijze bij de cavia en het konijn getitreerd.

Van elk mengsel werd steeds 0,2 c.c. intracutaan ingespoten. Voor het titreeren bij de cavia waren 2 dieren nodig, die in het geheel 51 intracutane inspuitingen, contrôle's inbegrepen, kregen.

Op het konijn werden 48 intracutane inspuitingen geplaatst.

Uit tabel VI ziet men dat de titratie op de cavia volgens *Glenny* en op het konijn volgens *Jensen* goed met elkaar zijn te vergelijken.

Daar de contrôle-reacties bij het konijn beter zijn uitgevallen, werden de resultaten der titratie beoordeeld bij het konijn.

Uit tabel VI blijkt dan dat de gezochte antitoxinetiter van het serum der verschillende groepen de volgende was:

titer groep	I = 0,5—1 A.E. per c.c. serum.			
" "	II = 1 A.E.	"	"	"
" "	III = 1 A.E.	"	"	"
" "	IV = 1—2 A.E.	"	"	"
" "	V = 0,1—0,5 A.E.	"	"	"
" "	VI = 1 A.E.	"	"	"
" "	VII = 0,5 A.E.	"	"	"
" "	VIII = 0,5 A.E.	"	"	"
" "	IX = 1 A.E.	"	"	"

Uit de resultaten van de groepen I, II, III en IV, alle ingespoten met 3×5 A.W., maar van zwak of sterk gezuiverd en ongezuiverd anatoxine, kan men besluiten dat het blijkbaar niet onverschillig is uit welk product de gebruikte A.W.'s afkomstig zijn en er dus een factor van kwalitatieven aard in het spel zou kunnen zijn. In dat geval zou de bindingswaarde dus niet parallel lopen aan de antigeenwaarde, zooals door *Ramon* wel wordt aangenomen.

Uit het resultaat van groep VI blijkt dat de graad van verdunning weinig invloed heeft gehad.

De resultaten van groepen V en VII wijzen er op, dat één enkele inspuiting slechter immuniseert en dat de voorkeur moet worden toegekend aan het toedienen van 3 injecties.

Uit de resultaten van groepen VIII en IX, vergeleken met die van groep VII, is van een depôtwerking der Anantivlokken van het gezuiverde en van het ongezuiverde product, 7 weken na de inspuiting, nog geen invloed te bemerken: dit kan eerst later te voorschijn treden en dient dus bij volgende titraties te worden nagegaan.

Over het algemeen genomen heeft, in de immuniseeringsproeven met 3×5 A.W., het gezuiverde sterke anatoxine de beste resultaten bij de titratie gegeven.

Antitoxinegehalte 12 weken na de eerste inspuiting

Om het verloop der antitoxische immuniteit bij de proefdieren te vervolgen, werd 12 weken na de eerste inspuiting van alle dieren door middel van hartpunctie wederom bloed afgenomen en gemengd.

Het bloed der verschillende groepen werd weer op de vroeger beschreven wijze bewerkt en met de sera de titratie volgens *Glenny* uitgevoerd op het konijn.

TABEL VI

No.	Groep	Samenstelling der mengsels bij titratie op de cavia			Huidreactie na 24 uur bij de cavia
		Serum	Toxine	Zout-oplossing	
1	I	3 c.c.	1,5 c.c. : 6 d.l.m.	5,5 c.c.	+ (zw.)
2	I	2	id.	6,5	+ (zw.)
3	I	1	id.	7,5	+ (zw.)
4	I	0,2	id.	8,3	+
5	I	0,1	id.	8,4	++
6	II	2	id.	6,5	—
7	II	1	id.	7,5	+ (zw.)
8	II	0,2	id.	8,3	+
9	II	0,1	id.	8,4	++
10	II	0,05	id.	8,45	+++
11	III	3	id.	5,5	—
12	III	2	id.	6,5	+ (zw.)
13	III	1	id.	7,5	+ (zw.)
14	III	0,2	id.	8,3	+ (zw.)
15	III	0,1	id.	8,4	+
16	III	0,05	id.	8,45	++
17	IV	1	id.	7,5	—
18	IV	0,2	id.	8,3	—
19	IV	0,1	id.	8,4	++
20	IV	0,05	id.	8,45	+++
21	V	3	id.	5,5	—
22	V	2	id.	6,5	+ (zw.)
23	V	1	id.	7,5	+
24	V	0,2	id.	8,3	+ + (zw.)
25	V	0,1	id.	8,4	++
26	V	0,05	id.	8,45	+++
27	VI	1	id.	7,5	—
28	VI	0,2	id.	8,3	+ (zw.)
29	VI	0,1	id.	8,4	+
30	VI	0,05	id.	8,45	++
31	VII	2	id.	6,5	—
32	VII	1	id.	7,5	+
33	VII	0,2	id.	8,3	++
34	VII	0,1	id.	8,4	+++
35	VII	0,05	id.	8,45	+++
36	VIII	1	id.	7,5	+
37	VIII	0,2	id.	8,3	++
38	VIII	0,1	id.	8,4	++
39	VIII	0,05	id.	8,45	+++
40	VIII	0,025	id.	8,475	+++
41	IX	1	id.	7,5	—
42	IX	0,2	id.	8,3	+
43	IX	0,1	id.	8,4	++
44	IX	0,05	id.	8,45	+++
45	IX	0,025	id.	8,475	+++
46	contrôle	1 c.c. 1:100	2 c.c. : 8 d.l.m.	7	+
47	"	1 c.c. 1:100	1,5 " : 6 "	7,5	+
48	"	1 c.c. 1:100	1 " : 4 "	8	+ (zw.)

1) Standaard-serum.

Samenstelling der mengsels bij titratie op het konijn			Huidreactie na 2 × 24 uur bij het konijn	Gezochte titer van het serum
Serum	Toxine	Zout-oplossing		
3 c.c.	1 c.c. : 4 d.l.m.	6 c.c.	—	$\frac{1}{30}$ A.E.
2	id.	7	—	$\frac{1}{20}$
1	id.	8	—	0,1
0,2	id.	8,8	±	0,5 A.E.
0,1	id.	8,9	+	1 A.E.
2	id.	7	—	$\frac{1}{20}$
1	id.	8	—	0,1
0,2	id.	8,8	—	0,5
0,1	id.	8,9	+	1 A.E.
0,05	id.	8,95	++	2
3	id.	6	—	$\frac{1}{30}$
2	id.	7	—	$\frac{1}{20}$
1	id.	8	—	0,1
0,2	id.	8,8	—	0,5
0,1	id.	8,9	+	1 A.E.
0,05	id.	8,95	++ (zw.)	2
1	id.	8	—	0,1
0,2	id.	8,8	—	0,5
0,1	id.	8,9	+	1 A.E.
0,05	id.	8,95	+	2 A.E.
3	id.	6	—	$\frac{1}{30}$
2	id.	7	—	$\frac{1}{20}$
1	id.	8	±	0,1 A.E.
0,2	id.	8,8	++ (zw.)	0,5 A.E.
0,1	id.	8,9	++	1
0,05	id.	8,95	+++	2
1	id.	8	—	0,1
0,2	id.	8,8	+	0,5
0,1	id.	8,9	+	1 A.E.
0,05	id.	8,95	++	2
2	id.	7	—	$\frac{1}{30}$
1	id.	8	+	0,1
0,2	id.	8,8	+	0,5 A.E.
0,1	id.	8,9	++	1
0,05	id.	8,95	++	2
1	id.	8	—	0,1
0,2	id.	8,8	+	0,5 A.E.
0,1	id.	8,9	++	1
0,05	id.	8,95	++	2
0,025	id.	8,975	+++	4
1	id.	8	—	0,1
0,2	id.	8,8	+	0,5
0,1	id.	8,9	+	1 A.E.
0,05	id.	8,95	+	2
0,025	id.	8,975	++	4
1 c.c. 1:100	1,5 c.c. : 6 d.l.m.	7,5	+	0,1 A.E. ¹⁾
1 c.c. 1:100	1 " : 4 "	8	+	0,1 A.E. ¹⁾
1 c.c. 1:100	0,5 " : 2 "	8,5	—	0,1 A.E. ¹⁾

TABEL VII.

Bepaling bindingswaarde van het gebruikte toxine.

No. van het mengsel	In 10 c.c. voorhanden		Huidreactie na 2 × 24 u. bij het konijn
	A.E.	d.l.m.	
1	0,1 A.E.	20	+++
2	"	16	+++
3	"	12	+++
4	"	10	++
5	"	8	++
6	"	6	+
7	"	4	—
8	"	2	—
9	"	1	—
10	"	0,8	—

Uit tabel VII blijkt dat de bindingswaarde van het gebruikte toxine wat is verminderd. Nu laten de mengsels 5, 6 en 7 bij het konijn een duidelijke overgang van positieve tot negatieve reactie zien. Daarom werd voor de eindtitratie, uitgevoerd bij het konijn, gebruik gemaakt van mengsels, die in 10 c.c., behalve de toegevoegde hoeveelheid serum, 6 d.l.m. van het gebruikte toxine bevatten.

Gelijktijdig werd dan weer 0,2 c.c. van de mengsels 5, 6 en 7 als contrôle intracutaan ingespoten. In het geheel werden 48 injecties, in tabel VIII weergegeven, verricht.

TABEL VIII.

No.	Groep	Samenstelling der mengsels bij titratie op het konijn			Huidreactie na 2 x 24 u. bij het konijn	Gezochte titer van het serum
		Serum	Toxine	Zout- oplossing		
1	I	2 c.c.	1,5 c.c. : 6 d.l.m.	6,5 c.c.	—	$\frac{1}{20}$ A.E.
2	I	1	id.	7,5	+(zw.)	0,1 A.E.
3	I	0,2	id.	8,3	+	0,5 A.E.
4	I	0,1	id.	8,4	+	1
5	I	0,05	id.	8,45	++	2
6	II	2	id.	6,5	—	$\frac{1}{20}$
7	II	1	id.	7,5	—	0,1
8	II	0,2	id.	8,3	+	0,5 A.E.
9	II	0,1	id.	8,4	++	1
10	II	0,05	id.	8,45	++	2
11	III	2	id.	6,5	—	$\frac{1}{20}$
12	III	1	id.	7,5	—	0,1
13	III	0,2	id.	8,3	+	0,5
14	III	0,1	id.	8,4	+	1 A.E.
15	III	0,05	id.	8,45	+	2
16	IV	2	id.	6,5	—	$\frac{1}{20}$
17	IV	1	id.	7,5	—	0,1
18	IV	0,2	id.	8,3	+	0,5
19	IV	0,1	id.	8,4	+	1 A.E.
20	IV	0,05	id.	8,45	+	2
21	V	4	id.	4,5	—	$\frac{1}{40}$
22	V	3	id.	5,5	—	$\frac{1}{30}$
23	V	2	id.	6,5	—	$\frac{1}{20}$
24	V	1	id.	7,5	+	0,1 A.E.
25	V	0,2	id.	8,3	+	0,5 A.E.
26	VI	2	id.	6,5	—	$\frac{1}{20}$
27	VI	1	id.	7,5	—	0,1
28	VI	0,2	id.	8,3	+	0,5
29	VI	0,1	id.	8,4	+	1 A.E.
30	VI	0,05	id.	8,45	+	2
31	VII	2	id.	6,5	—	$\frac{1}{20}$
32	VII	1	id.	7,5	+	0,1 A.E.
33	VII	0,2	id.	8,3	+	0,5 A.E.
34	VII	0,1	id.	8,4	++	1
35	VII	0,05	id.	8,45	++	2
36	VIII	2	id.	6,5	—	$\frac{1}{20}$
37	VIII	1	id.	7,5	—	0,1
38	VIII	0,2	id.	8,3	+	0,5 A.E.
39	VIII	0,1	id.	8,4	+	1 A.E.
40	VIII	0,05	id.	8,45	++	2
41	IX	2	id.	6,5	—	$\frac{1}{20}$
42	IX	1	id.	7,5	—	0,1
43	IX	0,2	id.	8,3	+	0,5 A.E.
44	IX	0,1	id.	8,4	+	1 A.E.
45	IX	0,05	id.	8,45	++	2
46	contr.	1 c.c. 1:100	2 c.c. : 8 d.l.m.	7	+	0,1 A.E. ¹⁾
47	"	1 " 1:100	1,5 " : 6 "	7,5	+	0,1 A.E. ¹⁾
48	"	1 " 1:100	1 " : 4 "	8	—	0,1 A.E. ¹⁾

¹⁾ Standaard-serum

Uit tabel VIII blijkt dat de gezochte antitoxinetiter van het serum der verschillende groepen de volgende was:

titer	groep I	= 0,1—0,5 A.E.	per c.c. serum.
"	"	II = 0,5 A.E.	"
"	"	III = 1 A.E.	"
"	"	IV = 1 A.E.	"
"	"	V = 0,1—0,5 A.E.	"
"	"	VI = 1 A.E.	"
"	"	VII = 0,1—0,5 A.E.	"
"	"	VIII = 0,5—1 A.E.	"
"	"	IX = 0,5—1 A.E.	"

Bij nadere beschouwing hiervan en vergelijking met de resultaten der eerste titratie (tabel VI) ziet men dat de antitoxinetiter van groepen I, II, IV, VII en IX is verminderd.

Groepen III, IV en VI, dus de gezuiverde producten waarmee 3 inspuitingen van 5 A.W. zijn verricht, staan met hun antitoxinetiter bovenaan.

De groepen VIII en IX zijn nu minstens op dezelfde hoogte gebleven; de *depôtwerking der Anantivlokken van het gezuiverde en van het ongezuiverde product schijnt dus nu tot uiting te komen.*

Antitoxinegehalte 16 weken na de eerste inspuiting

Tenslotte werd de antitoxische immuniteit dezer proefdieren nog verder vervolgd door 16 weken na de eerste inspuiting van alle caviae nogmaals bloed af te nemen door middel van hartpunctie.

Het bloed der verschillende groepen werd weer op de vroeger beschreven wijze bewerkt en met de sera de titratie volgens *Glenny* uitgevoerd op het konijn.

De bepaling der bindingswaarde van het te gebruiken toxine gaf dezelfde uitkomsten als in tabel VII is weergegeven. De zelfde contrôlemengsels uit tabel VII werden aangenomen. Daarom werd voor de eindtitratie bij het konijn weer gebruik gemaakt van mengsels, die in 10 c.c., behalve de toegevoegde hoeveelheid serum, 6 d.l.m. van het gebruikte toxine bevatten.

TABEL IX.

No.	Groep	Samenstelling der mengsels bij titratie op het konijn			Huidreactie na 2 x 24 u. bij het konijn	Gezochte titer van het serum
		Serum	Toxine	Zout- oplossing		
1	I	3 c.c.	1,5 c.c. : 6 d.l.m.	5,5 c.c.	—	$\frac{1}{30}$
2	I	2	id.	6,5	—	$\frac{1}{20}$
3	I	1	id.	7,5	+	0,1 A.E.
4	I	0,2	id.	8,3	++	0,5
5	I	0,1	id.	8,4	+++	1
6	II	3	id.	5,5	—	$\frac{1}{30}$
7	II	2	id.	6,5	±	$\frac{1}{20}$
8	II	1	id.	7,5	+	0,1 A.E.
9	II	0,2	id.	8,3	+++	0,5
10	II	0,1	id.	8,4	+++	1
11	III	3	id.	5,5	—	$\frac{1}{30}$
12	III	2	id.	6,5	±	$\frac{1}{20}$
13	III	1	id.	7,5	±	0,1
14	III	0,2	id.	8,3	+	0,5 A.E.
15	III	0,1	id.	8,4	++	1
16	IV	3	id.	5,5	—	$\frac{1}{30}$
17	IV	2	id.	6,5	—	$\frac{1}{20}$
18	IV	1	id.	7,5	±	0,1
19	IV	0,2	id.	8,3	+	0,5 A.E.
20	IV	0,1	id.	8,4	++	1
21	V	3	id.	5,5	—	$\frac{1}{30}$
22	V	2	id.	6,5	—	$\frac{1}{20}$
23	V	1	id.	7,5	+	0,1 A.E.
24	V	0,2	id.	8,3	++	0,5
25	V	0,1	id.	8,4	+++	1
26	VI	3	id.	5,5	—	$\frac{1}{30}$
27	VI	2	id.	6,5	±	$\frac{1}{20}$
28	VI	1	id.	7,5	+	0,1 A.E.
29	VI	0,2	id.	8,3	++	0,5
30	VI	0,1	id.	8,4	+++	1
31	VII	3	id.	5,5	±	$\frac{1}{30}$
32	VII	2	id.	6,5	±	$\frac{1}{20}$
33	VII	1	id.	7,5	+	0,1 A.E.
34	VII	0,2	id.	8,3	++	0,5 A.E.
35	VII	0,1	id.	8,4	+++	1
36	VIII	3	id.	5,5	—	$\frac{1}{30}$
37	VIII	2	id.	6,5	—	$\frac{1}{20}$
38	VIII	1	id.	7,5	±	0,1 A.E.
39	VIII	0,2	id.	8,3	++	0,5 A.E.
40	VIII	0,1	id.	8,4	++	1
41	IX	3	id.	5,5	—	$\frac{1}{30}$
42	IX	2	id.	6,5	—	$\frac{1}{20}$
43	IX	1	id.	7,5	—	0,1
44	IX	0,2	id.	8,3	++	0,5 A.E.
45	IX	0,1	id.	8,4	++	1
46	contr.	1 c.c. 1:100	2 c.c. : 8 d.l.m.	7	++	0,1 A.E. ¹⁾
47	"	1 " 1:100	1,5 " : 6 "	7,5	+	0,1 A.E. ¹⁾
48	"	1 " 1:100	1 " : 4 "	8	±	0,1 A.E. ¹⁾

¹⁾ Standaard-serum.

In het geheel werden verricht 48 intracutane inspuitingen, contrôle's inbegrepen; deze zijn in tabel IX overzichtelijk, met inbegrip der resultaten, opgeteekend.

Uit tabel IX blijkt, dat de gezochte antitoxinetiter van het serum der verschillende groepen de volgende was:

titer groep	I = 0,1 A.E. per c.c. serum.	
" "	II = 0,1 A.E.	"
" "	III = 0,5 A.E.	"
" "	IV = 0,5 A.E.	"
" "	V = 0,1 A.E.	"
" "	VI = 0,1 A.E.	"
" "	VII = 0,1 A.E.	"
" "	VIII = 0,1—0,5 A.E.	"
" "	IX = 0,5 A.E.	"

Bij vergelijking dezer resultaten met die der tweede titratie (tabel VIII), blijkt dat de antitoxinetiter van alle groepen is verminderd.

Groepen III en IV, welke behandeld zijn resp. met gezuiverd zwak- en gezuiverd sterk anatoxine in 3 inspuitingen van 5 A.W., staan met hun antitoxinetiter bovenaan.

De antitoxinetiter van groepen VIII en IX is nu wat ingezakt; 4 maanden na de inspuiting der vlokken van het gezuiverde- en van het ongezuiverde product vindt men de antitoxinetiter hiervan dus eerst verminderd, terwijl dit bij de groepen I tot en met VII voor het meerendeel reeds 3 maanden na de eerste inspuiting het geval was.

Slotbeoordeeling der 3 titraties

Uit de resultaten der immuniseeringsproeven met 3×5 A.W., van zwak of sterk gezuiverd en ongezuiverd anatoxine, kan men besluiten, dat het blijkbaar niet onverschillig is uit welk product de gebruikte A.W.'s afkomstig zijn en er dus een factor van kwalitatieven aard in het spel zou kunnen zijn.

Over het algemeen genomen hebben in de immuniseerings-

proeven met 3×5 A.W. de gezuiverde anatoxinen de beste resultaten bij de titratie gegeven.

De graad van verdunning van het gebruikte gezuiverde anatoxine heeft weinig invloed gehad.

De antitoxinetiter van gezuiverd anatoxine schijnt langer hoog te blijven.

Een enkele inspuiting immuniseert slechter dan 3 inspuitingen.

De immunisatie met Ananti-vlokken van het gezuiverde en ongezuiverde anatoxine was goed, de depôtwerking dezer vlokken kwam ± 3 maanden na de inspuiting tot uiting. Wanneer er geen diphtherie-epidemie heerscht, zou het dus aanbeveling verdienen voor de actieve onvatbaarmaking tegen diphtherie een depôtwerking van Anantivlokken te gebruiken.

§ 2.

Immunisatieproeven met ongezuiverd anatoxine en gezuiverd anatoxine door inspuiten van gelijke hoeveelheden A.W.'s, teneinde nauwkeurig de reacties te kunnen nagaan.

Het gebruikte gezuiverde product werd verkregen door middel van de precipitatiemethode. De volgende dierproeven werden hiertoe verricht:

Groep I: ongezuiverd anatoxine, 3 maal.

25 caviae werden 3 maal subcutaan ingespoten met 0,5 c.c. (= 6 A.W.) ongezuiverd anatoxine A.W. 12. In het geheel krijgen deze caviae dus subcutaan 18 A.W. Als tusschenruimten voor de inspuitingen werden gekozen respectievelijk 3 en 2 weken.

Gebruikt werd anatoxine No. 203:

A.W. = 12 Kf = 41 min. tot. N = 0,334.

$\frac{\text{A.W.}}{\text{N}} = 36$. $P_H = 7,82$.

Groep II: gezuiverd anatoxine, 3 maal.

25 cavia werden 3 maal subcutaan ingespoten met 0,5 c.c. (= 6 A.W.) gezuiverd anatoxine A.W. 42, waarvan de anti-

geenwaarde door middel van physiologische zoutoplossing is teruggebracht op 12 A.W. per c.c.

In het geheel krijgen deze caviae dus subcutaan ook 18 A.W. Als tussenruimten voor de inspuitingen werden weer genomen respectievelijk 3 en 2 weken.

Gebruikt werd gezuiverd anatoxine No. 203:

A.W. = 42. Kf = 7 min. tot N = 0,256.

$\frac{\text{A.W.}}{\text{N}} = 164$. $P_H = 7,82$.

Zuiveringsfactor = 6. Opbrengst = 70 %.

Teneinde na te gaan in hoeverre de inspuitingen met anatoxine, gezuiverd en ongezuiverd, door de dieren zonder schade werden verdragen, werd het lichaamsgewicht der dieren geregeld gecontrôleerd, waarbij bleek dat dit regelmatig toenam.

Door verbloeding na de hartpunctie of door intercurrente ziekten stierven in:

groep I: 5 dieren.

„ II: 2 „

Nooit werd bij de sectie der gestorven dieren iets gevonden, dat op diphtherieintoxicatie wees.

Van beide groepen werden na iedere inspuiting de locale reacties nagegaan.

Locale reacties na de eerste inspuiting

Groep I:

De eerste dag na de inspuiting vertoonden van de 25 caviae, welke waren behandeld met *ongezuiverd anatoxine*, 17 dieren op de plaats van inspuiting, welke geschoren was, een duidelijke roodheid en zeer kleine infiltraten; 8 dieren vertoonden geen reactie.

De tweede dag na de inspuiting waren bij alle proefdieren kleine doch duidelijke infiltraten met roodheid te vinden.

De vierde dag na de inspuiting vertoonden 5 van de 25 caviae

nog een klein infiltraat op de plaats van inspuiting, de 20 andere dieren waren vrij.

De vijfde en zesde dag na de inspuiting werd nog slechts bij 1 der proefdieren een klein infiltraat gevonden, de overige dieren waren allen negatief.

Groep II:

De eerste dag na de inspuiting vertoonden van de 25 caviae, welke waren behandeld met *gezuiverd anatoxine*, 21 dieren op de plaats van inspuiting, welke eveneens geschoren was, een duidelijke roodheid en kleine infiltraten; slechts 4 proefdieren vertoonden geen reactie.

De tweede dag na de inspuiting waren bij alle proefdieren duidelijke infiltraten met roodheid te vinden.

De vierde dag na de inspuiting vertoont 1 der 25 proefdieren nog een klein infiltraat (geringer dan die bij ongezuiverd anatoxine op den vierden dag), de overige 24 dieren waren negatief.

Résumé: Uit deze proeven blijkt dat de locale reacties na de eerste inspuiting op den tweeden dag na de inspuiting het sterkst waren. Bij de met *gezuiverd anatoxine* behandelde proefdieren werden weliswaar over het algemeen iets sterker reacties waargenomen dan bij de proefdieren, welke met ongezuiverd anatoxine waren ingespoten, maar daar staat tegenover dat de locale reacties bij de met *gezuiverd anatoxine* behandelde dieren vlugger verdwenen dan die der met ongezuiverd anatoxine behandelde dieren.

Locale reacties na de tweede inspuiting

Groep I:

De eerste dag na de inspuiting vertoonden 8 van de 23 caviae, welke allen waren ingespoten met *ongezuiverd anatoxine*, op de plaats van inspuiting een duidelijke roodheid en zeer groote infiltraten; 11 proefdieren hadden een duidelijke roodheid en groote infiltraten, 4 caviae een duidelijke roodheid en kleine infiltraten.

De tweede dag na de inspuiting vertoonden 6 van de 23 caviae nog een duidelijke roodheid en groote infiltraten; bij de overige 17 caviae werd een steekreactie of geen reactie waargenomen.

De vierde dag na de inspuiting waren bij 3 van de 23 caviae nog zwak positieve reacties waar te nemen, de 20 andere caviae waren negatief.

Groep II:

De eerste dag na de inspuiting was slechts bij 1 van de 24 caviae, welke waren behandeld met *gezuiverd anatoxine*, op de plaats van inspuiting een duidelijke roodheid en een zeer groot infiltraat waar te nemen; 6 caviae vertoonden een duidelijke roodheid en groote infiltraten, 11 caviae een duidelijke roodheid en kleine infiltraten, 6 caviae een steekreactie.

De tweede dag na de inspuiting waren bij 3 caviae nog een duidelijke roodheid en groote infiltraten waar te nemen, 21 caviae hadden een steekreactie of geen reactie.

De vierde dag na de inspuiting was nog slechts bij 1 cavia een zwak positieve reactie waar te nemen, de 23 overige caviae waren negatief.

Résumé: Uit deze proeven valt op te maken dat de locale reacties na de tweede inspuiting voor beide groepen het sterkst waren de eerste dag na de inspuiting. Bij de met *gezuiverd anatoxine* behandelde proefdieren werden dit maal veel minder sterke reacties waargenomen dan bij de met *ongezuiverd anatoxine* behandelde dieren. De reacties bij de met *gezuiverd anatoxine* behandelde dieren waren vlugger verdwenen dan bij de met *ongezuiverd anatoxine* behandelde dieren.

Locale reacties na de derde inspuiting

Groep I:

De eerste dag na de inspuiting vertoonden 13 van de 22 caviae, welke waren behandeld met *ongezuiverd anatoxine*, op de plaats van inspuiting een duidelijke roodheid en zeer

groote infiltraten; 8 proefdieren hadden een duidelijke roodheid en groote infiltraten, 1 cavia een duidelijke roodheid en klein infiltraat.

De tweede dag na de inspuiting vertoonden 3 caviae nog zeer groote infiltraten, 5 proefdieren groote infiltraten en 11 proefdieren kleine infiltraten; 3 caviae waren negatief.

De vierde dag na de inspuiting waren bij 2 caviae nog groote infiltraten te vinden, bij 6 caviae kleine infiltraten en 14 proefdieren waren negatief.

De vijfde dag na de inspuiting was bij 1 cavia nog een groot infiltraat te vinden, bij 7 caviae kleine infiltraten, 14 caviae waren negatief.

Groep II:

De eerste dag na de inspuiting vertoonden 3 van de 23 caviae, welke waren ingespoten met *gezuiverd anatoxine*, op de plaats van inspuiting een duidelijke roodheid en groote infiltraten;

12 caviae hadden een duidelijke roodheid en gemiddelde infiltraten, 6 caviae hadden een duidelijke roodheid en kleine infiltraten, 2 caviae waren negatief.

De tweede dag na de inspuiting was bij 1 cavia nog een groot infiltraat te vinden, bij 1 cavia een gemiddeld infiltraat; 6 proefdieren vertoonden kleine infiltraten en 15 caviae waren negatief.

De vierde dag na de inspuiting waren bij 2 caviae kleine infiltraten te vinden, 21 caviae waren negatief.

De vijfde dag na de inspuiting was bij 1 cavia nog een klein infiltraat te vinden, 22 caviae waren negatief.

Résumé: Uit deze proeven blijkt, dat de locale reacties na de derde inspuiting het sterkst waren de eerste dag na de inspuiting. Bij de met *gezuiverd anatoxine* behandelde proefdieren werden ook weer dit maal veel minder sterke reacties waargenomen dan bij de met *ongezuiverd anatoxine* behandelde dieren.

De reacties bij de met *gezuiverd anatoxine* behandelde

dieren waren vlugger verdwenen dan die der met ongezuiverd anatoxine behandelde dieren.

Slotbeoordeeling der locale reacties na alle 3 inspuitingen.

Na de eerste inspuiting waren de locale reacties van gezuiverd- en ongezuiverd anatoxine het sterkst op den tweeden dag, na de tweede en derde inspuiting op den eersten dag volgende op de inspuiting.

Na de eerste inspuiting waren de locale reacties der met gezuiverd anatoxine behandelde dieren sterker dan die der met ongezuiverd anatoxine behandelde dieren, terwijl dit evenwel na de tweede en derde inspuiting juist omgekeerd het geval was.

Na alle 3 inspuitingen waren de locale reacties van het gezuiverde anatoxine vlugger verdwenen dan die van het ongezuiverde anatoxine.

Antitoxinegehalte 8 weken na de eerste inspuiting

Om van de verkregen immuniteit der behandelde proefdieren een indruk te krijgen, werd 8 weken na de eerste inspuiting van alle caviae door middel van hartpunctie bloed afgenomen. Het bloed van alle caviae uit één groep werd

TABEL X.

Bepaling bindingswaarde van het gebruikte toxine.

No. van het mengsel	In 10 c.c. voorhanden		Huidreactie na 24 u. bij de cavia
	A.E.	d.l.m.	
1	0,1 A.E.	50	+++
2	"	40	+++
3	"	30	+++
4	"	20	++
5	"	10	++
6	"	5	+
7	"	3	—
8	"	1	—
9	"	0,5	—

gemengd, op de vroeger beschreven wijze bewerkt en met de sera de titratie volgens *Glenny* uitgevoerd op de cavia.

Om de bindingswaarde van het te gebruiken toxine te bepalen, werd gewerkt met standaardserum (Frankfurt) en een toxine waarvan de A.W. = 14 en de d.l.m. = 1,5 m.gr.

Uit tabel X blijkt dat de mengsels 5,6 en 7 een duidelijke overgang laten zien van positieve tot negatieve reactie.

De mengsels 5,6 en 7 bevatten per 10 c.c. 0,1 A.E. en resp. 10,5 en 3 d.l.m., of per 0,2 c.c. $\frac{1}{500}$ A.E. en resp. 0,2, 0,1 en 0,06 d.l.m.

Voor de eindtitratie bij de cavia werd daarom gebruik gemaakt van mengsels, die in 10 c.c., behalve de toegevoegde hoeveelheid serum, 5 d.l.m. van het gebruikte toxine bevatten.

Het serum van elke groep werd nu op de in tabel XI aangegeven wijze bij de cavia getitreerd; van elk mengsel werd 0,2 c.c. intracutaan ingespoten.

In het geheel werden 13 insputingen, contrôle's inbegrepen, verricht.

TABEL XI.

No.	Groep	Samenstelling der mengsels bij titratie op de cavia			Huidreactie na 24 u. bij de cavia	Gezochte titer van het serum
		Serum	Toxine	Zout-oplossing		
1	I	2 c.c.	0,5 c.c. : 5 d.l.m.	7,5 c.c.	—	0,05 A.E.
2	I	1	id.	8,5	—	0,1
3	I	0,2	id.	9,3	—	0,5 A.E.
4	I	0,1	id.	9,4	+	1 A.E.
5	I	0,05	id.	9,45	++	2
6	II	2	id.	7,5	—	0,05
7	II	1	id.	8,5	—	0,1
8	II	0,2	id.	9,3	±	0,5 A.E.
9	II	0,1	id.	9,4	+	1
10	II	0,05	id.	9,45	++	2
11	contr.	1 c.c. 1:100	1 c.c. : 10 d.l.m.	8	+	0,1 A.E. ¹⁾
12	contr.	1 c.c. 1:100	0,5 c.c. : 5 d.l.m.	8,5	±	0,1 A.E. ¹⁾
13	contr.	1 c.c. 1:100	0,3 c.c. : 3 d.l.m.	8,7	—	0,1 A.E. ¹⁾

¹⁾ Standaardserum.

Uit tabel XI blijkt dat de gezochte antitoxinetiter der groepen de volgende was:

titer groep I (ongezuiverd anatoxine) = 0,5 — 1 A.E. per c.c. serum;

„ „ II (gezuiverd anatoxine) = 0,5 A.E. per c.c. serum.

Het ongezuiverde anatoxine heeft in deze proeven dus een betere antitoxinetiter gegeven dan het gezuiverde anatoxine, het verschil is evenwel niet groot.

Antitoxinegehalte 12 weken na de eerste inspuiting

De immuniteit der proefdieren werd verder vervolgd door 12 weken na de eerste inspuiting van alle dieren door middel van hartpunctie wederom bloed af te nemen. Met de verkregen sera werd weer de titratie volgens *Glenny* op de cavia uitgevoerd.

De bindingswaarde van het gebruikte toxine bleek nog dezelfde te zijn als in tabel X is aangegeven.

TABEL XII.

No.	Groep	Samenstelling der mengsels bij titratie op de cavia			Huidreactie na 24 u. bij de cavia	Gezochte titer van het serum
		Serum	Toxine	Zout-oplossing		
1	I	2 c.c.	0,5 c.c. : 5 d.l.m.	7,5 c.c.	—	0,05 A.E.
2	I	1	id.	8,5	—	0,1
3	I	0,2	id.	9,3	—	0,5
4	I	0,1	id.	9,4	+	1 A.E.
5	I	0,05	id.	9,45	++	2
6	II	2	id.	7,5	—	0,05
7	II	1	id.	8,5	—	0,1
8	II	0,2	id.	9,3	+	0,5 A.E.
9	II	0,1	id.	9,4	+	1
10	II	0,05	id.	9,45	++	2
11	contr.	1 c.c. 1:100	1 c.c. : 10 d.l.m.	8	++	0,1 A.E. ¹⁾
12	contr.	1 c.c. 1:100	0,5 c.c. : 5 d.l.m.	8,5	+	0,1 A.E. ¹⁾
13	contr.	1 c.c. 1:100	0,3 c.c. : 3 d.l.m.	8,7	—	0,1 A.E. ¹⁾

¹⁾ Standaardserum.

Voor de eindtitratie bij de cavia werd daarom weer op dezelfde wijze te werk gegaan als in tabel XI is beschreven.

De resultaten zijn in tabel XII weergegeven.

Uit tabel XII is te lezen dat de gezochte antitoxinetiter der groepen de volgende was:

titer groep I (ongezuiverd anatoxine) = 1 A.E. per c.c. serum.

„ „ II (gezuiverd anatoxine) = 0,5 A.E. per c.c. serum.

De dieren, welke behandeld zijn met ongezuiverd anatoxine, bezitten dus nog een hoogere antitoxinetiter dan die, welke behandeld zijn met gezuiverd anatoxine.

Antitoxinegehalte 16 weken na de eerste inspuiting

De immuniteit der dieren werd tenslotte nogmaals nagegaan door 16 weken na de eerste inspuiting van alle caviae bloed af te nemen door middel van hartpunctie. Met de verkregen sera werd nogmaals de titratie volgens *Glenny* uitgevoerd op de cavia.

De bindingswaarde van het gebruikte toxine bleek nog dezelfde te zijn als in tabel 10 is aangegeven.

TABEL XIII.

No.	Groep	Samenstelling der mengsels bij titratie op de cavia			Huidreactie na 24 u. bij de cavia	Gezochte titer van het serum
		Serum	Toxine	Zout-oplossing		
1	I	2 c.c.	0,5 c.c. : 5 d.l.m.	7,5 c.c.	+	0,05 A.E.
2	I	1	id.	8,5	+	0,1
3	I	0,2	id.	9,3	+	0,5
4	I	0,1	id.	9,4	++	1
5	I	0,05	id.	9,45	++	2
6	II	2	id.	7,5	—	0,05
7	II	1	id.	8,5	—	0,1 A.E.
8	II	0,2	id.	9,3	+	0,5
9	II	0,1	id.	9,4	++	1
10	II	0,05	id.	9,45	++	2
11	contr.	1c.c. 1:100	1 c.c. : 10 d.l.m.	8	+	0,1 A.E. ¹⁾
12	contr.	1c.c. 1:100	0,5 c.c. : 5 d.l.m.	8,5	—	0,1 A.E. ¹⁾
13	contr.	1c.c. 1:100	0,3 c.c. : 3 d.l.m.	8,7	—	0,1 A.E. ¹⁾

¹⁾ Standaardserum.

Voor de eindtitratie bij de cavia werd daarom weer op dezelfde wijze te werk gegaan als in tabellen XI en XII is weergegeven. De resultaten zijn in tabel XIII opgeteekend.

In tabel XIII ziet men, dat de gezochte antitoxinetiter der groepen was als volgt:

titer groep I (ongezuiverd anatoxine) = $< 0,05$ A.E. per
c.c. serum;

„ „ II (gezuiverd anatoxine) = $0,1$ A.E. per c.c.
serum.

Hieruit blijkt dus dat de antitoxinetiter van beide groepen nu sterk is verminderd, maar van het ongezuiverde anatoxine meer dan van het gezuiverde anatoxine.

Slotbeoordeeling der 3 titraties

De antitoxinetiter na inspuiting met het ongezuiverde anatoxine was hoger dan die van het gezuiverde anatoxine.

De antitoxinetiter na inspuiting met het gezuiverde anatoxine schijnt echter langer op een hoger niveau te blijven dan die van het ongezuiverde anatoxine.

HOOFDSTUK VI

SAMENVATTING

De zuiveringsmethode door middel van adsorptie, door Schmidt en zijn medewerkers beschreven, en de zuiveringsmethode door precipitatie met aluminiumsulfaat, zooals die is aangegeven door Tasman en Pondman, werden op een groot aantal diphtherietoxinen en -anatoxinen vergelijkenderwijs toegepast.

Hieruit bleek dat de waterstofionenconcentratie van het uitgangproduct, vooral van de anatoxinen, voor het gelukken der zuivering volgens de adsorptiemethode van groote beteekenis is, daarentegen van weinig belang voor de zuivering volgens de precipitatiemethode.

Wanneer de P_H van het uitgangproduct bij de zuivering volgens Schmidt niet in aanmerking wordt genomen, dan treden vrij veel mislukkingen op, vooral bij de anatoxinen. Neemt men de P_H van het uitgangproduct wel in acht, dan treedt slechts een enkele keer een mislukking op.

Bij de zuivering volgens de precipitatiemethode, waar men aan de P_H van het uitgangproduct geen aandacht behoeft te schenken, wordt slechts een hoogst enkele keer een mislukking waargenomen.

Schmidt (139, 142) geeft op, dat de gezuiverde toxinen en anatoxinen met dezelfde snelheid vlokken als de ruwe producten, die voor hun bereiding hebben gediend.

Mijn ervaring is dat de gezuiverde producten, zoowel van de adsorptiemethode als van de precipitatiemethode, steeds

sneller vlokken dan de ruwe producten die voor hun bereiding hebben gediend.

Het gemiddelde gehalte aan grammen Al_2O_3 per c.c. der bereide suspensies van aluminiumhydroxyde was in de eerste reeks zuiveringsproeven 0,0154 en in de tweede reeks zuiveringsproeven 0,0146, dus steeds veel hoger dan het gehalte 0,0007 gr. Al_2O_3 per c.c., hetwelk op één plaats in de literatuur (130) door Schmidt wordt opgegeven. *De opgave van Schmidt zal dus vermoedelijk op een vergissing moeten berusten.*

De gemiddelde zuiveringsfactor van de gelukte gezuiverde toxinen volgens de adsorptiemethode met correctie van de P_H is ongeveer gelijk aan die der gelukte gezuiverde toxinen zonder correctie van de P_H ; dit is eveneens het geval met de gezuiverde anatoxinen.

De gemiddelde opbrengst van de gelukte gezuiverde toxinen volgens de adsorptiemethode met correctie van de P_H was iets minder dan die der gelukte gezuiverde toxinen zonder correctie van de P_H .

De gemiddelde opbrengst van de gezuiverde anatoxinen volgens de adsorptiemethode met correctie van de P_H was echter belangrijk hoger dan die der gelukte gezuiverde anatoxinen volgens de adsorptiemethode zonder correctie van de P_H .

De gemiddelde zuiveringsfactor van de gezuiverde toxinen resp. anatoxinen volgens de precipitatiemethode is belangrijk lager dan die der gezuiverde toxinen, resp. anatoxinen, volgens de adsorptiemethode, met en zonder P_H correctie.

De gemiddelde opbrengst van de gezuiverde toxinen, resp. anatoxinen volgens de precipitatiemethode is daarentegen belangrijk hoger dan die der gezuiverde toxinen, resp. anatoxinen volgens de adsorptiemethode, met en zonder P_H correctie.

De antigeenwaarden der gezuiverde producten volgens de precipitatiemethode en adsorptiemethode nemen met de tijd ongeveer in gelijke mate, maar weinig, af.

De houdbaarheid der gezuiverde producten is dus voor beide methodes dezelfde.

Na de eerste inspuiting waren de locale reacties van ongezuiverd anatoxine en gezuiverd anatoxine volgens de precipitatiemethode het sterkst op den tweeden dag, na de tweede en derde inspuiting op den eersten dag na de inspuiting,

Na de eerste inspuiting waren de locale reacties der met gezuiverde anatoxine behandelde dieren sterker dan die der met ongezuiverd anatoxine ingespoten dieren, terwijl dit evenwel na de tweede en derde inspuiting omgekeerd het geval was.

Na alle 3 inspuitingen waren de locale reacties van het gezuiverde anatoxine vlugger verdwenen dan die van het ongezuiverde anatoxine.

De hier te lande door *Pondman* en *Tasman* uitgewerkte, verbeterde Römer-titratiemethode van *Glenny*, toegepast op de cavia en het konijn, bleek zeer betrouwbare uitkomsten te geven.

Bij vergelijking der gevonden antitoxinetiters der eerste serie immunisatieproeven, na inspuiting van ongezuiverd zwak anatoxine, ongezuiverd sterk anatoxine, gezuiverd zwak anatoxine en gezuiverd sterk anatoxine, komt men tot de meening, dat het *blijkbaar niet onverschillig is, uit welk product de gebruikte A.W.'s afkomstig zijn.*

De gezuiverde anatoxinen gaven in deze proeven de beste resultaten. Er zou dus een factor van kwalitatieven aard in het spel kunnen zijn, in welk geval de bindingswaarde niet parallel zou lopen aan de antigeenwaarde, in tegenstelling dus met hetgeen door *Ramon* wordt aangenomen.

Uit de verrichte proeven bleek, dat één enkele inspuiting slechter immuniseert en dat de voorkeur moet worden gegeven aan het toedienen van drie inspuitingen.

De Anantivlokken van het ongezuiverde- en van het gezuiverde anatoxine, in één keer ingespoten, geven een goede immuniteit, welke echter eerst na ongeveer 3 maanden duidelijk aan het licht treedt; na deze 3 maanden vermindert de antitoxinetiter van het serum slechts langzaam.

Wanneer er geen diphtherie-epidemie heerscht, zou het dus aanbeveling verdienen, voor de actieve onvatbaarmaking tegen diphtherie gebruik te maken van de depôtwerking der Anantivlokken.

Uit de tweede serie immunisatieproeven, waarbij in drie inspuitingen gelijke hoeveelheden A.W.'s van een ongezuiverd- en een gezuiverd anatoxine werden ingespoten, bleek dat het ongezuiverde anatoxine een betere immuniteit gaf dan het gezuiverde anatoxine, het verschil was evenwel niet groot.

De antitoxinetiter van het gezuiverde anatoxine scheen echter langer op een hooger niveau te blijven dan die van het ongezuiverde anatoxine.

Over het algemeen genomen is het verschil in antitoxinegehalte van het ongezuiverde- en het gezuiverde anatoxine, verkregen door middel van de precipitatiemethode, niet groot.

Stelt men als voornaamste opgave, ten aanzien van de zuivering van diphtherieanatoxine tot actieve onvatbaarmaking tegen diphtherie, de bereiding van zoover mogelijk gezuiverde producten, dan verdient de adsorptiemethode met behulp van aluminiumhydroxyde de voorkeur boven de precipitatie-methode met aluminiumsulfaat. *De bereiding der suspensies volgens Schmidt is echter zeer tijdroovend en vereischt zeer groote hoeveelheden gedestilleerd water. Bovendien moet, voorafgaande aan deze zuivering, steeds een P_H correctie van het uitgangproduct worden aangebracht.*

Geldt het daarentegen de concentratie en zuivering van groote hoeveelheden toxine en anatoxine van lage antigeenwaarde (die uit dien hoofde voor de menschelijke praktijk onbruikbaar zijn), dan zal men zich met voordeel bedienen van de zooveel eenvoudiger en rendabeler precipitatiemethode, waarbij geen P_H -correctie van het uitgangproduct noodig is.

Het blijft echter nog een opgave de precipitatiemethode zoodanig te verbeteren, dat zij naast eenvoudigheid der uitvoering en goede opbrengst, producten van grootere zuiverheid oplevert.

Tenslotte de vraag stellend, heeft gezuiverd anatoxine voor-

deelen boven het ongezuiverde product, moet daarop worden geantwoord, dat al moge na de eerste inspuiting de reactie van het gezuiverde product iets sterker zijn dan van het ongezuiverde, dit bij de tweede en derde inspuiting omgekeerd het geval is; *voor de praktijk kan dit van waarde blijken, daar klachten over sterkere reactie na de tweede en derde inspuiting met ongezuiverd anatoxine niet zelden zijn.* Bovendien schijnt de antitoxinetiter na gebruik van gezuiverd anatoxine langer hoog te blijven.

GERAADPLEEGDE LITERATUUR

1. *Aldershoff, H.* Onderzoek omtrent verschillende methodes tot actieve onvatbaarmaking tegen diphtherie. Eerste mededeeling.
Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1924, 2de helft B, No. 14.
2. — — Onderzoek omtrent verschillende methodes tot actieve onvatbaarmaking tegen diphtherie. Tweede mededeeling.
Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1925, 2de helft B, No. 1.
3. — — Onderzoek omtrent verschillende methodes tot actieve onvatbaarmaking tegen diphtherie.
Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1926, No. 25.
4. — — De behandeling en voorkoming van diphtherie in de praktijk.
Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1928, No. 43.
5. — — Ongevallen na actieve onvatbaarmaking tegen diphtherie met toxine-antitoxinemengsels.
Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1928, 2de helft, No. 41, blz. 5064.
6. — — Toxine-antitoxinemengsels (T.A.U.) of anatoxine voor de actieve onvatbaarmaking tegen diphtherie?
Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1928, 2de helft, No. 31.
7. — — Het gevaar van bevroren T.A.-mengsels.
Ned. Tijdschr. v. Geneesk. van 3 Aug. 1929, Klinische les, blz. 3533.
8. — — Antwoorden van het Rijksserologisch Instituut op vragen van praktiseerende geneeskundigen.
Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1930, 1ste helft, No. 22, blz. 2710.
9. — — Verschillende entstoffen voor de actieve onvatbaarmaking tegen diphtherie hier te lande.
Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1931, 1ste helft, No. 9, blz. 974.
10. *Overbosch, J. L. C.* Immunisatie tegen diphtherie te Arnhem.
Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1931, No. 15, blz. 1514.
11. *Van der Walle, N.* De reactie van Schick bij Soendaneesche schoolkinderen te Bandoeng.
Mededeelingen van den Dienst der Volksgezondheid in Ned.-Indië. Anno 1929.

12. *Planteijdt-Dorrepaal, M. J.* Over diphtherie-immuniteit.
Academisch proefschrift, Leiden 1927.
13. *Smits, E.* Diphtherie-immuniteit bij Javanen, reactie van Schick.
Geneesk. Tijdschr. voor Ned.-Indië, Afl. 5, Deel 66, 1926.
14. *De Wolff, H. H.* Biochemische eigenschappen van de diphtherie- en van de pseudo-diphtheriebacterie.
Academisch proefschrift, Leiden 1927.
15. *Brandwijk, A. C.* Proeven ter verkrijging van een onschadelijke en zuivere entstof tegen diphtherie.
Academisch proefschrift, Utrecht 1926.
16. *Doyer, J. J. Th.* Uit kliniek en praktijk. Over de reactie volgens Schick en de voorbehoedende inenting tegen diphtherie.
Geneesk. Gids, 3de jaargang, Afl. 13 en 14, 1 en 8 April 1927.
17. — — Uit kliniek en praktijk. Eenige beschouwingen naar aanleiding van de voorbehoedende inenting tegen diphtherie in Mei-Juni 1924 in de gemeente Uitgeest. Geneesk. Gids, 1ste jaargang, Afl. 18 en 19, 1 en 8 Mei 1925.
18. *Kramer, P. H.* Over actieve immunisatie tegen diphtherie bij volwassenen.
Ned. Tijdschr. voor Geneesk. 1923, No. 14.
19. *Rapport sur: L'immunisation contre la diphtérie à l'aide de l'anatoxine* (G. Ramon, R. Debré, avec la collaboration de M. et G. Mozer, Mll. C. Petot, Mll. Prieur et de M. Nélis).
Société des Nations; Organisation d'Hygiène; Immunisation contre la scarlatine et la diphtérie.
C.H. 1040; Genève le 28 mai 1931.
20. *Rapport sur: La vaccination antidiphtérique par voie nasale et par voie cutanée.* (Première communication.)
H. Sparrow, M. Mayzner et R. Kaczynski; sous la direction du Professeur L. Hirsfeld-Varsovie; Société des Nations; Organisation d'Hygiène; Immunisation contre la scarlatine et la diphtérie.
C.H. 1047; Genève le 30 mai 1931.
21. *Rapport sur: Vaccination antidiphtérique par voie nasale et cutanée.* (Deuxième communication.)
Madame H. Sparrow et R. Kaczynski; Société des Nations; Organisation d'Hygiène; Immunisation contre la scarlatine et la diphtérie.
C.H. 1047; Genève le 30 mai 1931.
22. *Ramon, G.* La flocculation dans les mélanges de toxine et de sérum antidiphtérique.
Annales de l'Institut Pasteur 1923, tome XXXVII, No. 12, pag. 1001.
23. — — Sur l'immunisation antitoxique et la production des antitoxines.

Les mélanges d' antigène spécifique et de substances non spécifiques (tapioca, chlorure de calcium, etc.).

Annales de l' Institut Pasteur 1931, tome XLVII, No. 4, pag. 339.

24. *Ramon, G.* L' anatoxine diphtérique, ses propriétés, ses applications.
Annales de l' Institut Pasteur, Sept. 1928, No. 9.

25. — — L' anatoxine diphtérique.

Ned. Tijdschr. voor Hygiene, Microbiologie en Serologie.

26. — — Sur la toxine et sur l' anatoxine diphtériques. Pouvoir flocculant et propriétés immunisantes.

Annales de l' Institut Pasteur, jan. 1924, pag. 1.

27. — — A propos de la production et des propriétés de l' antitoxine diphtérique.

C.R. des séances de la Soc. de Biol. 1930, pag. 842.

28. — — Sur la transformation des toxines et anatoxines.

C.R. des séances de la Soc. de Biol., July 1930, pag. 942.

29. — — A propos des propriétés essentielles de l' anatoxine diphtérique.

C.R. des séances de la Soc. de Biol., July 1930, pag. 938.

30. — — Sur l' affinité de l' antitoxine diphtérique pour l' antigène, spécifique (toxine ou anatoxine).

C.R. des séances de la Soc. de Biol. 3 et 10 mai 1930, pag. 31 et 141.

31. — — Sur l' appréciation des différentes propriétés spécifiques de l' anatoxine diphtérique, par la méthode de flocculation.

C.R. des séances de la Soc. de Biol., 3 et 10 mai, pag. 31 et 141.

32. — — A propos du titrage in vitro du sérum antidiphtérique par la flocculation.

C.R. des séances de la Soc. de Biol. 1922, pag. 813.

33. — — Pouvoir flocculant et pouvoir toxique de la toxine diphtérique.

C.R. des séances de la Soc. de Biol., 2 juin 1923, pag. 2.

34. — — L' anatoxine diphtérique dans son application à l' immunisation active de l' homme et à la prophylaxie de la diphtérie.

Annales de l' Institut Pasteur, sept. 1930.

35. — — Sur le parallélisme entre le „pouvoir flocculant” de l' anatoxine diphtérique et son „pouvoir dissociant” vis à vis du complexe toxine-antitoxine.

C.R. des séances de la Soc. de Biol., 18 oct. 1930, pag. 173.

36. — — Essais sur l' immunité antitoxique.

Ned. Tijdschr. voor Hygiëne, microbiologie en serologie.

37. — — Sur les propriétés essentielles de l' anatoxine diphtérique.

Annales de l' Institut Pasteur, mai 1931, No. 5.

38. *Ramon, G.* et *Debré, R.* Valeur et durée de l' immunité conférée par

- l' anatoxine diphtérique. (Dosage de l' antitoxine dans le sérum des enfants vaccinés.)
Bull. de l' académie de médecine, 25 Febr. 1930, No. 8.
39. *Ramon, G. et Debré, R.* Avec collaboration de Mozer, M. et G., et Pichot, Mll. G. Sur la teneur en antitoxine spécifique du sérum des sujets vaccinés par l' anatoxine diphtérique.
Annales de l' Institut Pasteur, Sept. 1930, pag. 326.
40. *Ramon, G., Debré, R., Mozer, M. et G.* Influence des doses d' anatoxine diphtérique dans l' immunisation active chez l' homme.
C.R. des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 107, No. 18, pag. 485.
41. *Ramon, G. et Debré, R.* Immunité antitoxique rapidement produite chez le cheval par l' injection sous-cutanée de doses minimales de germes diphtériques vivants.
C.R. des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 107, No. 23, pag. 1084.
42. *Ramon, G. et Nélis, P.* Essais d' immunisation active chez l' homme au moyen d' une anatoxine diphtérique de valeur antigène élevée.
C.R. des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 107, No. 18, pag. 487.
43. *Ramon, G., Legroux, R. et Schoen, M.* Extraction de l' anatoxine diphtérique du flocculat spécifique. Conséquences.
C.R. des séances de la Soc. de Biol. 1931, No. 7, tome CVI, pag. 525.
44. *Ramon, G., Legroux, R. et Schoen, M.* Sur l' anatoxine diphtérique extraite du flocculat spécifique. Ses propriétés.
C.R. des séances de la Soc. de Biol. 1931, No. 10, tome CVI, pag. 779.
45. *Bessemans, A.* Considérations sur l' application de la vaccination antidiphtérique en Belgique.
Annales de la Société scientifique de Bruxelles, 1926.
46. — — A propos de deux accidents mortels survenus par méprise en Belgique au cours de vaccinations antidiphtériques préventives.
Revue Belge des Sciences Médicales;
Extrait tome I, No. 7, juillet—août, 1929.
47. *Besserman, A., Ramon, G. et de Potter, F.* Sur l' apparition et l' évolution de certains anticorps chez des chevaux injectés par différentes voies au moyen de divers antigènes diphtériques.
Annales de l' Institut Pasteur, 1931, tome XLVII, No. 4, pag. 358.
48. *De Potter, Fr.* La vaccination antidiphtérique au moyen de l' anatoxine diphtérique dans un milieu scolaire.
Extrait du Bulletin de la Société royale de médecine de Gand, 1926.
49. *Van Boeckel, L.* Rapport sur les renseignements et les résultats acquis en Belgique concernant les diverses méthodes d' immunisation artificielle active contre la diphtérie.
Annales de l' Institut Pasteur, Sept. 1928, No. 9.

50. *La lutte antidiphtérique en Belgique*. Etude expérimentale, statistique et épidémiologique. Par le Docteur A. Bessemans, Inspecteur Principal d'Hygiène du Gouvernement, Chargé de cours à l'Université de Gand. Communiquée au Comité de l' Office-International d' Hygiène publique, dans sa session d' Octobre 1925, par M. O. Velghe, Secrétaire général du Ministère de l' Interieure et de l' Hygiène, Délégué de la Belgique.
Office International d'Hygiène publique.
(Extrait du Bulletin mensuel de l' Office International d' Hygiène publique, tome XVIII, Année 1926, fasc. No. 2).
51. *Martin, L., Loiseau, G., Laffaille, A.* L'immunisation antidiphtérique par l'anatoxine chez l'homme. Applications à la prophylaxie de la diphtérie (Dec. 1923—Mai 1928).
Annales de l'Institut Pasteur, Sept. 1928, No. 9, pag. 1010.
52. — — Quatre ans d' immunisation antidiphtérique à l' ecole primaire départementale de Vitry (Jan. 1926—Nov. 1929).
Extrait du Bulletin de l' Académie de médecine, 19 Nov. 1929, No. 37.
53. — — Contrôle de l'immunisation antidiphtérique.
Extrait du Bulletin de l' Académie de Médecine, 18 Mars 1930, No. 11.
54. *Legroux, R., Ramon, G., Debré, R., et Thiroloix, P.* Mode de préparation d'un sérum antidiphtérique obtenu par l'injection au cheval de germes vivants, récemment isolés chez des malades.
C. R. des séances de la Soc. de Biol. 1931, No. 4, pag. 279.
55. — — Etude expérimentale d'un sérum antidiphtérique obtenu par l' injection au cheval de germes vivants récemment isolés chez des malades.
C. R. des séances de la Soc. de Biol. 1931 No. 4, pag. 282.
56. *Leulier, A., Sédallian, P., et Clavel, Mme.* A propos de la purification de la toxine diphtérique.
C.R. des seances de la Soc. de Biol. 1931, tome 107, No. 23, pag. 1136.
57. *Darré, H., Loiseau, G., et Laffaille, A.* De l'immunisation antidiphtérique par l' anatoxine diphtérique.
Extrait des Bulletins et Mémoires de la Société médicale des Hôpitaux de Paris (Séance du 16 Mai 1924, No. 17).
58. *Roubinovitch, J., Loiseau, G., et Laffaille, A.* Immunisation antidiphtérique chez l'enfant avec l'anatoxine diphtérique. Extrait des Bulletins et Mémoires de la Société médicale des Hôpitaux de Paris. (Séance du 23 Mai 1924, No. 18.)

59. *Zoeller, M. Chr.* La vaccination par l' anatoxine diphtérique chez l'adulte.
Extrait des Bulletins et Mémoires de la Société médicale des Hôpitaux de Paris.
(Séance du 9 Mai 1924, No. 16).
60. *Velluz, Léon.* Sur l' adsorption de la toxine tétanique par les hydroxydes d' aluminium.
C.R. des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 106, No. 11, pag. 887.
61. — — Sur les propriétés des hydrates d'aluminium vis à vis de la toxine tétanique.
C.R. des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 107, No. 20, pag. 674.
62. *Mozer, M.* et *G.* Quatre années de vaccination par l' anatoxine diphtérique à l'hôpital maritime de Berck.
Presse Médicale. 27 Nov. 1929, No. 95.
63. *Fitz—Gérald, J. G.* L'anatoxine diphtérique dans la prévention de la diphtérie au Canada.
Annales de l' Institut Pasteur, Sept. 1928, No. 9.
64. *Nechtchadiménho, M. P.* L' action préventive de l' anatoxine diphtérique vis à vis de l' injection diphtérique par la trachée l' animal d' expériences.
Annales de l' Institut Pasteur, Sept. 1928, No. 9.
65. *Schmidt, M. S.* Médecine expérimentale. Contribution à l' étude du processus de neutralisation entre toxines et antitoxines (Diphtérie et Tétanos).
Comptes Rendus des séances de l' académie des Sciences, 14 Nov. 1927 tome 185, pag. 1080.
66. *Besredka, A.* De la vaccination antidiphtérique par la voie cutanée.
Annales de l' Institut Pasteur, Mai 1931, No. 5.
67. *Bie, Valdemar.* Influence de doses massives de sérum antidiphtérique sur la mortalité dans la diphtérie pharyngée.
C. R. des séances de la Soc. de Biol., 1 Dec. 1921, pag. 1189.
68. Les accidents de la vaccination antidiphtérique. *Revue Médicale de Louvain*, 1925, No. 23.
69. *Lanfranchi, Floriano.* Essai de vaccination antidiphtérique des cobayes par la voie cutanée.
Annales de l' Institut Pasteur 1931, tome XLVII, No. 4, pag. 445.
70. *Moersch, J. R.* La réaction de Ramon. Le principe flocculant de la toxine diphtérique.
C. R. des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 108, No. 31, pag. 558.

71. — — Le principe flocculant du sérum antidiphthérique.
C. R. des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 108, No. 31, pag. 562.
72. — — La réaction de Ramon. Propriété flocculante de la toxine et de l' antitoxine diphthériques.
C.R. des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 108, No. 31, pag. 545.
73. *Moersch, J. R., et Schmidt, S.* Sur la relation entre le pouvoir antigène intrinsèque de la toxine diphthérique et la vitesse de flocculation entre toxine et antitoxine.
C.R. des séances de la Soc. de Biol. 1930, tome 103, pag. 1293.
74. *Seligmann, E.* Vergleichende Untersuchungen zur aktiven Immunisierung gegen Diphtherie.
D. M. Wochenschr. 1931, Nummer 37, S. 1573.
75. *Siegl, Josef.* Zum Problem der Immunität bei der Diphtherie. Archiv für Hygiene und Bakteriologie, 1931, Band 106, Heft 1/2, Seite 32—101.
76. *Jakopp, R., und Streit, A.* Ueber Immunisierungsversuche mit der Löwenstein'schen Diphtherieschutzsalbe mitten in einer Diphtherie-epidemie.
Wien. klin. Wochenschr. 1930, No. 10.
77. *Willstätter, Richard, und Kraut, Heinrich.* Zur Kenntnis der Tonerdehydrate.
(I Mitteilung über Hydrate und Hydrogele).
Berichte der Deutsch. Chem. Gesellschaft 1923, Band 56, S. 149.
78. — — Über ein Tonerde-Gel von der Formel $Al(OH)_3$.
(II Mitteilung über Hydrate und Hydrogele).
Berichte der Deutsch. Chem. Gesellschaft 1923, Band 56, S. 1117.
79. — — Hydroxyde und ihre Hydrate in den verschiedenen Tonerde-Gelen.
(V Mitteilung über Hydrate und Hydrogele).
Berichte der Deutsch. Chem. Gesellschaft 1924, Band 57, S. 1082.
80. *Böhme, W., und Biebold, G.* Ein Weg aktiver Schutzimpfung gegen Diphtherie.
Münch. Med. Wochenschr. 1924, No. 8, S. 232.
81. *Schmidt, H., und Scholz, W.* Studien zur Kenntnis der Eigenschaften von Diphtherie Toxin—Antitoxin Gemischen.
III. Die Beziehung der direkten Giftwirkung des Diphtherie-toxins zu seiner Bindungsfähigkeit mit Antitoxin. Zugleich ein Beitrag zur Vorstellung über die Natur des Diphtherietoxins.
Archiv für Hygiene, Bd. 95, 1925.

82. — — Studien zur Kenntnis der Eigenschaften von Diphtherie Toxin-Antitoxin Gemischen.
IV. Die Bedeutung der Zone bei der Ausflockung von Diphtherie Toxin-Antitoxin Gemischen.
Archiv für Hygiene, Bd. 95, 1925.
83. — — Studien zur Kenntnis der Eigenschaften von Diphtherie Toxin-Antitoxin Gemischen.
V. Die immunisierende Wirkung der bei der Diphtherie Toxin-Antitoxinbindung auftretenden Flocken.
Archiv für Hygiene Bd. 96, 1926.
84. — — Studien zur Kenntnis der Eigenschaften von Diphtherie Toxin-Antitoxin Gemischen.
VI. Zur Kenntnis des Flockungsvorganges in Diphtherie Toxin-Antitoxin Gemischen.
Archiv für Hygiene Bd. 96, 1926.
85. Schmidt, H. Zur Kenntnis der Natur der Diphtherie Toxin-Antitoxin Flockung.
Zschr. f. Imm.forsch. und exp. Ther. Band 48, 1926.
86. Otto, R., und Sachs, H. Ueber Dissociationserscheinungen bei der Toxin-Antitoxin-Verbindung.
Zschr. f. exp. Path. und Ther. 1906.
87. Eberhard, Hans Achim. Beiträge zur aktiven Diphtherieimmunisierung.
Zschr. f. Hygiene und Inf. krankh. 1926, Band 105, Heft 3/4.
88. Opitz, Immunisierungsversuche gegen Diphtherie beim Menschen.
Monatsschrift f. Kinderheilkunde, Nov. 1921, Band 22, Heft 2.
89. Opitz, H., und Meyer, G. Kombinierte aktive und passive Immunisierung gegen Diphtherie.
Archiv. f. Kinderheilkunde 1927, Band 82, Heft 1.
90. Bäcker, St., Kraus, R., und Löwenstein, E. Zur Frage der aktiven Schutzimpfung gegen Diphtherie mittels Toxoide.
Zschr. f. Imm.forsch. und exp. Ther. 1926, Band 45, S. 86.
91. Felix, K., und Engel, C. Ein Beitrag zur Reinigung der Toxine.
Zschr. f. Imm.forsch. und exp. Ther. 1931, Band 70, Heft 1/2, S. 41.
92. Loewenthal, W. Zur Methodik der aktiven Diphtherieimmunisierung.
Zschr. f. Imm.forsch. und exp. Ther. 1924, Band 39, Heft 4.
93. Friedemann, U. Das Diphtherieproblem.
Klinische Wochenschrift 1928, Jahrg. 7, Nr. 10 S. 433 und Nr. 11 S. 481.

94. — — Die Bedeutung der latenten Infektionen für die Epidemiologie (Theoretische Infektketten—Lehre).
Centralbl. f. Bakt., Orig., Beiheft zu Band 110.
95. Kissin, D., und Bronstein, L. Zur Frage der Bildung der Anatoxine.
Zschr. f. Imm. forsch. und exp. Ther. 1928, Band 56, S. 11.
96. Dserzgowsky, S. K. Ueber die aktive Immunisierung des Menschen gegen Diphtherie (Inst. f. exper. Med. Petersburg).
Russky Wratsch, 1910, Nr. 22, S. 753.
Zschr. f. Imm. forsch., 1910, Ref. 2, S. 602.
97. von Behring, E. Ueber ein neues Diphtherieschutzmittel.
Deutsche Med. Wochenschr., Nr. 19, S. 873.
98. Dold, H. Über Methoden, Möglichkeiten und Grenzen der Schutzimpfung gegen Diphtherie.
Arbeiten aus dem Reichsgesundheitsamte, Band 57, 1926.
99. Marcuse, Kurt. Studien über die Virulenz des Diphtheriebazillus. II Mitteilung: Bedingt die aktive Diphtherieschutzimpfung eine Auslese besonders virulenter Diphtheriestämme.
Zentralblatt f. Bakt., Orig. 1931, Band 121, Heft 3/4, S. 232.
100. Bunney, William Edward. The Action of formaldehyde on diphtheria toxin.
The Journal of Immunology, 1931, Vol. XX, No. 1, page 47.
101. Bunney, William E., Cianciarulo, J., and Kiamil, Mumtaz. A Study of the acid precipitation of diphtheria toxin.
The Journal of Immunology, 1931, Vol. XX, No. 6, page 417.
102. Sommer, E., Wagner, Sommer, H., and Meyer, K. F. The purification of Botulinum toxin.
The Journal of Infectious Diseases, 1926, Vol. 39, No. 5, page 345.
103. Dudley, Sheldon F. The Schick test, Diphtheria and Scarlet fever. A Study in epidemiology.
Medical Research Council 1923, Special Report Series, No. 75.
104. Banzhaf, Edwin J. The gradual decrease of the active immunizing value of toxin—antitoxin mixtures stored during one year.
The Journal of Immunology Vol. IX, No. 6, Nov. 1924.
105. — — The preparation of 0,1 L₁ toxin—antitoxin mixture.
The Journal of Immunology Vol. IX, No. 6, Nov. 1924.
106. Bayne—Jones, Stanhope. The titration of diphtheria toxin and antitoxin by Ramon's flocculation method.
The Journal of Immunology Vol. IX, No. 6, Nov. 1924.
107. Hirszfeld, Hanna, Hirszfeld, L., and Brokman, H. On the susceptibility to diphtheria (Schick test positive) with reference to the inheritance of blood groups.
The Journal of Immunology Vol. IX, No. 6, Nov. 1924.

108. *Leonard, George F.* A comparison of methods for determination of potency as observed on a group of horses immunized against diphtheria.
The Journal of Immunology 1931, Vol. 21, No. 2, page 117.
109. *Moncton Copeman S., O'Brien, R. A., Eagleton, A. J., and Glenny A. T.* Experiences with the Schick test and active immunization against diphtheria.
The British Journal of Experimental Pathology, Vol. 3, No. 1, Febr. 1922.
110. *Sudmersen, H. J., and Glenny, A. T.* Immunity of guinea-pigs to diphtheria toxin and its effect upon the offspring.
The Journal of Hygiene, Vol. XI, No. 2, 5 Aug. 1911.
Vol. XI, No. 3, 3 Nov. 1911.
Vol. XII, No. 1, 3 May 1912.
111. *O'Brien, R. A., Okell, C. C., and Parish, H. J.* (From the Wellcome Physiological Research Laboratories Beckenham, Kent).
„Diphtheria” in Schick—negative Reactors.
The Lancet, 19 Jan. 1929, page 149.
112. *Glenny, A. T.* A Modification of diphtheria antitoxin.
The Journal of Hygiene, Vol. 13, No. 1, 30 April 1913.
113. — — Insoluble precipitates in diphtheria and tetanus immunization.
The British Med. Journal 16 Aug. 1930.
114. *Glenny, A. T., and Barr, Mollie.* The precipitation of diphtheria toxoid by potash alum.
The Journal of Pathology and Bacteriology 1931, Vol. 34, page 131.
115. — — Alum—toxoid precipitates as antigens.
The Journal of Pathology and Bacteriology 1931, Vol. 34, No. 1, page 118.
116. *Glenny, A. T., and Hopkins, Barbara E.* Duration of passive immunity.
The Journal of Hyg., Vol. 21, No. 2, 7 Dec. 1922.
Vol. 22, No. 1, 31 Oct. 1923.
Vol. 22, No. 1, 31 Oct. 1923.
Vol. 22, No. 2, 15 Jan. 1924.
117. — — Diphtheroid toxoid as an immunizing agent.
The British Journal of Experimental Pathology 1923, Vol. 4, page 283.
118. *Glenny, A. T., Hopkins, Barbara E., and Pope, C. G.* Further Notes on Modification of Diphtheria Toxin by Formaldehyde.
The Journal of Pathology and Bacteriology, 1924, Vol. 27.

119. *Glenny, A. T., Allen, K., and Hopkins, Barbara, E.* Testing the antigenic value of diphtheria toxin—antitoxin mixtures.
The British Journal of Experimental Pathology, Vol. 4, No. 1, Febr. 1923.
120. *Glenny, A. T., Buttle, G. A. H., and Stevens, Muriel F.* Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea-pigs: toxoid precipitated with alum.
The Journal of Pathology and Bacteriology 1931, Vol. 34, No. 2, page 267.
121. *Glenny, A. T., and Llewellyn-Jones, Mona.* The intracutaneous method of testing diphtheria toxin and antitoxin.
The Journal of Pathology and Bacteriology, 1931, Vol. 34, No. 2, page 143.
122. *Linderström-Lang, K., and Schmidt, S.* On the purification of toxins and antitoxins.
Comptes Rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg, 18me Volume, No. 3, 1930.
123. — — Sur la purification de la toxine diphtérique.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1930, tome 103, pag. 620.
124. *Schmidt, S.* Sur le titrage du sérum antidiphtérique.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol., 2 Jan. 1923, pag. 105.
125. — — Le phénomène de floculation des toxines diphtérique et tétanique vis à vis de leurs antitoxines.
Annales de l' Institut Pasteur, Jan. 1928, pag. 63.
126. — — Sur l' adsorption de la toxine diphtérique par l' hydroxyde d' aluminium.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1930, tome 103, pag. 1296.
127. — — Untersuchungen über die spezifischen (immunologischen) Eigenschaften gereinigter Toxine.
Zschr. f. Imm.forsch. und exp. Ther. 1931, Band 71, Heft ½, S. 101—128.
128. — — Sur la stabilité du complexe toxine—antitoxine diphtériques.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 106, No. 7, pag. 583.
129. — — Dissociation du floculat toxine—antitoxine diphtériques.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 106, No. 7, pag. 586.

130. — — Sur l'effet immunisant de l'anatoxine diphtérique additionnée d'hydrate aluminique.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, No. 9, pag. 765.
131. — — Immunisation des Chevaux avec des toxines et anatoxines purifiées.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, No. 9, pag. 767.
132. — — Sur la production de la toxine diphtérique.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, No. 4, pag. 308.
133. — — Sur le mode de préparation des toxines et anatoxines diphtériques purifiées et hyperconcentrées.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, No. 17, pag. 327.
134. — — Sur la toxicité des toxines additionnées d'hydrate d'aluminium ou de tapioca.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, No. 17, pag. 330.
135. — — Production de sérum antidiphtérique.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, No. 4, pag. 311.
136. — — Influence de quelques amines et amides aliphatiques sur la toxine diphtérique.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 108, No. 31, pag. 536.
137. — — Influence de quelques dérivés du benzène sur la toxine diphtérique.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 108, No. 31, pag. 537.
138. Schmidt, S., et Hansen, A. Sur la purification de la toxine et de l'anatoxine diphtériques par adsorption combinée avec de l'hydrate d'aluminium et du charbon animal.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1930, tome 103, pag. 1305.
139. — — Über die Reinigung und Konzentrierung von Diphtherietoxin und Diphtherieanatoxin, mit besonderem Hinblick auf die aktive Immunisierung von Menschen.
Biochem. Zschr. 1930, Band 228, S. 263—290.

140. — — Sur l'adsorption de la toxine et de l'anatoxine tétaniques au moyen de l'hydrate d'aluminium.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, No. 4, pag. 314.
141. Schmidt, S., Hansen, A., et Poulsen, K. A. Adsorption de la toxine scarlatineuse au moyen de l'hydrate d'aluminium.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, No. 4, pag. 319.
142. Schmidt, S., en collaboration avec Hansen, A., et Kjaer, K. A. Purification et concentration de la toxine et de l'anatoxine diphtériques.
Annales de l'Institut Pasteur 1931, No. 2, pag. 202.
143. Schmidt, S., et Kjaer, K. A. Sur la purification de la toxine diphtérique par précipitation au moyen d'un acide.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1930, tome 103, pag. 1307.
144. — — Reinigung und Konzentrierung von Diphtherietoxin und Diphtherieanatoxin durch Ausfällung mit Säuren.
Biochem. Zschr. 1930, Band 228, S. 291.
145. Schmidt, S., et Jensen, Claus. Propriétés flocculantes des sérums antidiphtériques provenant de diverses espèces d'animaux producteurs d'antitoxine.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 108, No. 31, pag. 566.
146. Hansen, A. Adsorption de l'antitoxine diphtérique sur l'hydrate d'aluminium.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 108, No. 31, pag. 570.
147. — — Dissociation du flocculat anatoxine—antitoxine diphtérique.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 108, No. 31, pag. 573.
148. — — Adsorption de la toxine dysentérique au moyen de l'hydrate d'aluminium.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, No. 4, pag. 316.
149. — — Essais de purification de divers venins de serpents.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, No. 4, pag. 322.

150. *Kjaer, T.* Dissociation du complexe toxine—antitoxine tétanique au moyen de l'anatoxine tétanique.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, No. 17, pag. 333.
151. *Jensen, Claus.* Préparation des lapins destinés à l'intradermoréaction diphtérique.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, No. 17, pag. 337.
152. — — Immunisation antidiphtérique des enfants par une injection unique d'anatoxine diphtérique purifiée et concentrée.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 108, No. 31, pag. 528.
153. — — Durée de l'immunité après une injection unique d'anatoxine purifiée et concentrée.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 108, No. 31, pag. 532.
154. — — Rapport entre la réaction de Schick et le taux d'antitoxine dans le sang.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 108, No. 31, pag. 539.
155. — — Réaction de Schick et taux d'antitoxine chez des enfants vaccinés par une injection unique d'anatoxine diphtérique purifiée et concentrée.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 108, No. 31, pag. 543.
156. — — Sur l'importance de la réaction de Schick positive chez des enfants non immunisés et des enfants immunisés avec l'anatoxine diphtérique.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 108, No. 31, pag. 552.
157. — — Sur l'importance de la réaction de Schick négative chez des enfants non immunisés et des enfants immunisés avec l'anatoxine diphtérique.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 108, No. 31, pag. 555.
158. — — Réaction de Schick et taux d'antitoxine du sang d'enfants ayant été soumis trois ans auparavant à une vaccination par l'anatoxine diphtérique.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 108, No. 31, pag. 577.

159. — — Etude comparative des réactions de Schick vis à vis de deux toxines différentes, et de la relation entre ces réactions et le titre antitoxique, chez des enfants soumis à une immunisation avec l'anatoxine diphtérique.
Comptes Rendus des séances de la Soc. de Biol. 1931, tome 108, No. 31, pag. 579.
160. *Vanicek, Frantisvek.* Concentration de la toxine diphtérique de flocculation au moyen de la dialyse dans une solution de sucre.
Trav. Inst. Hyg. Tchécoslovaque 1930, No. 4.
161. *Tasman, A. und Pondman, A. B. F. A.* Zur Reinigung des Diphtherietoxins und -Anatoxins. I.
Zschr. f. Imm.forsch. und exp. Ther. 1931, Band 72, Heft ¾, S. 245.
162. *Pondman, A. B. F. A., und Tasman, A.* Reinigung von Diphtherietoxin und -Anatoxin. II.
Zschr. f. Imm.forsch. und exp. Ther. 1931, Band 73, Heft ½, S. 117.
163. *Tasman, A., und van Waasbergen, J. P.* Reinigung von Diphtherietoxin und -Anatoxin. III.
Vergleichende Reinigungen durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd-Suspension und Fällung mit Aluminiumsulfat.
Zschr. f. Imm.forsch. und exp. Ther. 1932, Band 75, Heft ½, S. 163.
164. *Smit, Jan.* Vom Wasser, Band 2, 1928, S. 173.

STELLINGEN

I.

Voor de vroegtijdige diagnose van de darminvaginatie bij zuigelingen is het röntgenonderzoek na het geven van een lavement van bariumpap een waardevol hulpmiddel.

II.

Bij chronische tonsillitis is de tonsillectomie te verkiezen boven de behandeling met thermocoagulatie.

III.

Voor de behandeling van dementia paralytica en andere aandoeningen is pyrifer in bijna alle gevallen te verkiezen boven de behandeling met malaria.

IV.

De methode van Ogino en Knaus ter voorkoming van zwangerschap, is niet voldoende zeker om haar als absoluut betrouwbaar aan het publiek aan te bevelen.

V.

Bij een met zenuwafwijkingen verlopend geval van pernicioze anaemie is vooral parenterale toediening van leverextract aangewezen.

VI.

In twijfelgevallen bij congenitale pylorospasmus kan röntgenonderzoek zekerheid verschaffen.

VII.

Bij de dubbelzijdige operabele seniele cataract is gelijktijdige lensextractie te vermijden.

VIII.

Bij het vaststellen van verstikkingsdood door smoren kan het aantoonen van vreemde bestanddeelen in longsap en maaginhoud vaak zekerheid verschaffen.

IX.

Indien een wond, welke men van tetanusinfectie verdenkt, na 8—14 dagen nog ettert of reactieverschijnselen vertoont dan is een tweede prophylactische inspuiting van antitetanus-serum gewenscht.

X.

Als routinemethode voor de zuivering van diphtherietoxine en -anatoxine is de precipitatiemethode te verkiezen boven de adsorptiemethode.

