Onderzoekingen over "test"-sera ter bepaling der bloed-groepen

Onderzoekingen over „Test"-sera ter bepaling der bloedgroepen

W. C. P. STOUTENBEEK

ONDERZOEKINGEN OVER „TEST"-SERA TER BEPALING DER BLOEDGROEPEN

Diss Utrecht 1934

ONDERZOEKINGEN OVER „TEST"-SERA TER BEPALING DER BLOEDGROEPEN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS **DR. C. W. STAR BUSMANN,** HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER RECHTSGELEERDHEID, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN OP DINSDAG 24 APRIL 1934, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR DOOR

WILLEM CORNELIS PIETER STOUTENBEEK
ARTS
GEBOREN TE ZWIJNDRECHT.

1934
DRUKKERIJ NAAMLOOZE VENNOOTSCHAP
VOORHEEN F.A W. HOOGWERF Az. OUD-BEIJERLAND.

Aan mijn Ouders
Aan mijn Vrouw

Het verschijnen van dit proefschrift is mij een welkome gelegenheid U, Hoogleeraren, Oud-Hoogleeraren en Docenten der Medische en Philosophische Faculteit der Utrechtsche Universiteit, dank te zeggen voor het onderwijs, dat ik van U mocht ontvangen.

Hooggeleerde ALDERSHOFF, hooggeachte Promotor, wel grooten dank ben ik U verschuldigd voor uw hulp en aanmoediging bij het tot stand komen van dit proefschrift. Ik acht het een voorrecht onder Uw leiding mijn eerste stappen op het gebied van 't wetenschappelijk onderzoek te hebben mogen zetten. Uw hartelijke belangstelling zal mij steeds in dankbare herinnering blijven.

Zeergeleerde PONDMAN, voor de wijze waarop Ge mij in Uw groote kennis en ervaring op 't gebied van het bloedgroeponderzoek hebt laten deelen, ben ik U zeer dankbaar. Uw vriendschappelijke omgang werd door mij steeds op hoogen prijs gesteld.

U, Zeergeleerde TASMAN, ben ik in 't bijzonder erkentelijk. Uw voortdurende hulp en raadgevingen zijn voor mij van zeer groot belang geweest.

Ook U, Zeergeleerde TIMMERMAN, en U, Zeergeleerde BRANDWIJK, betuig ik mijn dank voor de medewerking, die ik van U mocht ondervinden.

Zeergeleerde BOELE, HEYSTER en HOEDEMAKER, ook op deze plaats wil ik U mijn hartelijken dank uitspreken voor de hulp, die Ge mij hebt verschaft door het verstrekken van bloed.

U, Mevrouw CORNELIS-de Graaff, dank ik voor de hulp, die U mij hebt verstrekt in den tijd, gedurende welken U op het R. S. I. werkzaam was.

Ook U, Mejuffrouw DE LIND VAN WIJNGAARDEN, betuig ik mijn dank voor Uw hulp bij het aanleeren van de Kjeldahl-methode.

Waarde DE JONGE, een woord van dank ook aan U voor de bereidwillige wijze, waarop Ge mij aan bloed van de Wassermann-reactie hielp.

Waarde DE CAES, gaarne betuig ik U mijn dank voor de verzorging der teekeningen.

Voorts dank ik het geheele personeel van het R. S. I. voor de vele en belangrijke hulp, die ik van allen mocht ontvangen.

INHOUD.

HOOFDSTUK III.

Immuniseeringsproeven.

HOOFDSTUK IV.

HOOFDSTUK V.

Over de houdbaarheid van „test"-sera.

INLEIDING

De ontdekking van de bloedgroepen bij den mensch door Landsteiner (1) in 1901 is het uitgangspunt voor talrijke onderzoekingen geworden, die voor de praktijk reeds belangrijke resultaten hebben opgeleverd.

Landsteiner vond dat, wanneer men bloedlichaampjes van een mensch brengt in het serum van een ander, vaak samenklontering (agglutinatie) der bloedlichaampjes optreedt. Dit verschijnsel doet zich niet steeds voor. Het gelukte Landsteiner een wetmatig verband te vinden, dat hem er toe bracht drie zoogenaamde bloedgroepen aan te nemen, waaraan door het werk van zijn leerlingen Sturli en von Decastello (2) en later van Jansky en Moss nog een vierde groep is toegevoegd.

We kunnen de bloedgroepen het best overzien door uit te gaan van de theorie, die ter verklaring van het verschijnsel der agglutinatie is opgesteld.

Volgens deze theorie komen in de roode bloedlichaampjes stoffen voor, *agglutinogenen* genaamd, en in het serum *agglutininen*.

Er zijn twee agglutinogenen, A en B en twee agglutininen α en β. Op A past alleen α, op B alleen β.

Wordt een agglutinine aan een daarbij passend agglutinogeen gebonden, dan treedt agglutinatie op.

De bloedgroepen zijn nu gekarakteriseerd doordat in

Groep I de bloedlichaampjes geen agglutinogenen bevatten, het serum beide agglutininen α en β.

Groep II de bloedlichaampjes het agglutinogeen A bevatten, het serum 't agglutinine β;

Groep III de bloedlichaampjes het agglutinogeen B bevatten, het serum 't agglutinine α ;

Groep IV de bloedlichaampjes beide agglutinogenen A en B bevatten, in het serum echter beide agglutininen ontbreken.

Men ziet, dat het serum steeds die agglutininen bevat, die mogelijk zijn naast de in de bloedlichaampjes aanwezige agglutinogenen, zonder dat agglutinatie in het bloed zelf optreedt.

Dit is de regel van Landsteiner.

Uit bovenstaande beschrijving is gemakkelijk de nomenclatuur van v. Dungern en Hirschfeld af te leiden, n.l.

Groep I $O_{\alpha\beta}$
Groep II A_{β}
Groep III B_{α}
Groep IV AB_{0}

waarbij de groote letters aangeven de agglutinogenen in de bloedlichaampjes, de kleine Grieksche letters de agglutininen, die in het serum voorkomen.

Uit dit schema volgt direct welke bloedlichaampjes in een gegeven serum worden geagglutineerd, n.l. die bloedlichaampjes, die 't agglutinogeen bevatten, dat past op het agglutinine, dat in het serum aanwezig is.

Het schema heeft den toets der kritiek gedurende meer dan dertig jaar kunnen doorstaan en mag tegenwoordig wel als vaststaand worden aanvaard.

Er zijn wel uitzonderingen beschreven, zoogen. defectgroepen, bijv. groepen O_{α} en B_{0} etc., maar een deel daarvan moet op rekening van een foutieve techniek van groepsbepaling worden gesteld. Werkelijke defectgroepen zijn zeer zeldzaam.

In het Rijks Serologisch Instituut zijn ze tot dusver niet waargenomen.

Het bepalen van de bloedgroep, waartoe iemand behoort, is een belangrijke in de praktijk veel gebruikte methode geworden, sinds het gebleken is, dat het aantal ongevallen

bij bloedtransfusie belangrijk kan worden verminderd, door rekening te houden met de groep waartoe gever en ontvanger behooren. Ook in de gerechtelijke geneeskunde vindt het meer en meer toepassing, nu de erfelijkheid der bloedgroepen volgens de wetten van Mendel is vastgesteld.

Het onderzoek is in principe zeer eenvoudig, maar toch blijken in de praktijk vaak vergissingen voor te komen.

't Is daarom noodzakelijk zoowel bloedlichaampjes als serum van den persoon, wiens groep men wil bepalen, afzonderlijk te onderzoeken.

Voor de techniek van dit onderzoek zij verwezen o.a. naar de handleiding van Pondman (3), waarin uitvoerig wordt uiteengezet, hoe dit onderzoek in het R. S. I. plaats heeft.

Voor het onderzoek zijn twee „test"-sera noodig, een A_β en een B_α serum, die daartoe door 't Rijks Serologisch Instituut ter beschikking worden gesteld.

In verband met het verstrekken van deze „test"-sera doen zich verschillende vraagstukken voor, waarvan in dit proefschrift eenige nader onder oogen worden gezien.

Het is niet gemakkelijk steeds over voldoende hoeveelheden serum te beschikken, daar 't hier tot dusver uitsluitend menschensera betreft en men dus afhankelijk is van de welwillendheid van gevers om hun bloed voor diagnostische doeleinden ter beschikking te stellen.

Door de statistische verdeeling der verschillende bloedgroepen over onze bevolking

n.l. Groep $O_{\alpha\beta}$ ± 40 %
„ A_β ± 40 %
„ B_α ± 15 %
„ AB_0 ± 5 %, geldt deze moeilijkheid voor de B_α sera nog in verhoogde mate.

Bovendien zijn niet alle sera geschikt om als testserum uitgegeven te worden, daar hieraan nog bepaalde eischen moeten worden gesteld en wel:

1e. *strenge groepspecificiteit;*

2e. *hooge titer;*

3e. *de titer moet lang behouden blijven;*

4e. *afwezigheid van remmingsverschijnselen.*

Door niet aan een van deze eischen te voldoen zijn vele sera ongeschikt.

Om een tekort aan serum te voorkomen kan men twee wegen inslaan, n.l.:

Menschensera, die ongeschikt zijn, bruikbaar te maken of dierensera te bereiden, die aan de gestelde eischen voldoen.

Over beide methoden zijn in dit proefschrift onderzoekingen vermeld. Aan de hand van een bespreking der bovengenoemde, aan een testserum te stellen eischen, zal een overzicht over de verrichte proeven gegeven worden.

ad 1. Aan de eerste eisch is voor de menschensera vrij gemakkelijk te voldoen. Men moet er op letten geen sera te gebruiken van personen met verhoogde bezinkingssnelheid der roode bloedlichaampjes, zooals dat bij zwangeren en bij lijders aan carcinoom, t.b.c. etc. voorkomt, daar hierbij pseudo-agglutinatie optreedt, veroorzaakt door de „geldrolvorming" der roode bloedlichaampjes. Wel kan men deze microscopisch onderscheiden van een echte agglutinatie; macroscopisch beschouwd, zooals dit gewoonlijk geschiedt, kunnen gemakkelijk vergissingen ontstaan.

Een echte niet-groepspecifieke agglutinatie kan voorkomen door de aanwezigheid van koude-agglutininen in een serum.

Gewoonlijk zijn deze uitsluitend werkzaam tusschen 0 en ± 5° C., in enkele gevallen evenwel kunnen deze agglutininen hun werkzaamheid nog by kamertemperatuur ontvouwen.

Men kan deze bron van fouten grootendeels voorkomen door het serum met de bloedkoek 24 uur bij 0° C. te laten staan, waardoor het grootste deel der koude-agglutininen gebonden wordt aan de eigen bloedlichaampjes, daar de werking van de koude-agglutininen niet specifiek is.

Omdat nog k-agglutinine achtergebleven kan zijn moeten de test-sera hierop nog gecontroleerd worden. Men brengt ze daartoe bij 10° C. samen met bloedlichaampjes van dezelfde bloedgroep of O-bloedlichaampjes. Hierbij mag geen agglutinatie worden waargenomen (Pondman (3).

Een andere niet groepspecifieke agglutinatie kan optreden in een serum, dat besmet is met bepaalde bacteriën. Om deze agglutinatie te voorkomen, dient op de steriliteit der haemotestsera nauwkeurig gelet te worden en is het aanbevelenswaardig een anti-septicum toe te voegen, dat de specificiteit natuurlijk niet mag beinvloeden, evenmin als de duurzaamheid van het serum. Hieromtrent heb ik enkele onderzoekingen ingesteld. De proeven ter verkrijging van zuiver groep-specifieke agglutineerende dierensera zijn in hoofdstuk III vermeld.

ad 2. De eisch van hoogen titer moet worden gesteld, omdat bij bloedlichaampjes de receptor zóó zwak ontwikkeld kan zijn, dat slechts met sterk agglutineerende sera agglutinatie kan worden verkregen. Ik wil hier wijzen op de A_2 en A_2B bloedlichaampjes. Het is n.l. door onderzoekingen van Landsteiner, Thomsen, Friedenreich e.a. (4) gebleken, dat men de A groep kan verdeelen in een A_1 en A_2 groep, waarbij de A_2 bloedlichaampjes zich van de A_1 onderscheiden door een veel zwakker ontwikkeling der A-receptor. Of 't verschil alleen quantitatief is of ook qualitatief is nog niet uitgemaakt.

Waarschijnlijk is er wel een qualitatief onderscheid. De A_2 groep komt minder vaak voor.

De AB groep kan op dezelfde wijze in een A_1B en A_2B groep worden verdeeld. En met name, hier kan de A_2 receptor gemakkelijk over 't hoofd worden gezien, daar de B receptor de manifestatie der A_2 receptor schijnt te remmen.

Ook bij zuigelingen zijn de receptoren vaak slechts zwak ontwikkeld en moeilijk aantoonbaar. Vele zooge-

naamde defectgroepen van vroegere onderzoekers zullen wel op rekening van te zwakke haemotestsera te schrijven zijn.

Om vergissingen te voorkomen is het dus gewenscht slechts sera met een behoorlijk hoogen titer te gebruiken. Als grens wordt in het R. S. I. gewoonlijk gesteld een minimum titer van $^1/_{16}$ (macroscopisch bepaald volgens de objectglasmethode, zie hoofdstuk I § 4).

In 't algemeen, hoe hooger titer hoe beter.

In de praktijk heeft men vaak de beschikking over matig agglutineerende sera. Het zou dus van belang zijn indien men een methode kon vinden den titer dezer sera te doen stijgen.

Naar analogie van de concentreering van antitoxinen door „serumzuivering" zijn in hoofdstuk II proeven beschreven om te trachten langs dezen weg tot een verhooging van den titer te komen.

Een andere methode, om over sera met hoogen titer de beschikking te krijgen, is te trachten groepspecifieke immuunagglutininen bij dieren op te wekken. Onderzoekingen hierover zijn beschreven in het derde hoofdstuk.

ad 3. Wat de duurzaamheid der testsera betreft schijnt het, dat sommige sera hun titer langen tijd behouden; bij andere schijnt de titer ineens belangrijk te kunnen verminderen. Regelmaat kon hierin niet gevonden worden.

Men zal er steeds op bedacht moeten zijn, dat een serum vrij plotseling zijn werkzaamheid kan verliezen, met name tegenover bloedlich. met zwak ontwikkelde agglutinogenen. Als het glas der ampullen veel alcali bevat, schijnt het agglutinine aangetast te kunnen worden. De sera mogen niet aan direct zonlicht worden bloot gesteld en moeten koel worden bewaard.

Bij onderzoekingen, ingesteld over de zich in den handel bevindende testsera, heeft Coca (5) te New-York gevonden, dat deze vaak geheel of gedeeltelijk onwerkzaam waren.

Forsmann en Beck (6) hebben dat eveneens opgemerkt. 't Is daarom noodig dat de testsera van datum voorzien en slechts gedurende beperkten tijd geldig zijn. Eenige gegevens over de duurzaamheid der sera zijn in dit proefschrift aangegeven in hoofdstuk V.

ad 4. Behalve de eisch van groepspecificiteit, hoogen titer en duurzaamheid moet ook die van afwezigheid van remmingsverschijnselen gesteld worden, waarop o.a. Pondman en Brandwijk (7) den nadruk hebben gelegd. Het is namelijk gebleken dat sommige sera, die hoogen titer bezitten, juist in hooge concentratie geen agglutinatie geven, maar eerst na verdunning.

Voor verdere gegevens verwijs ik naar het vierde hoofdstuk.

Ik meen met deze inleidende opmerkingen te kunnen volstaan.

Van een overzicht over de geheele literatuur van het bloedgroeponderzoek heb ik gemeend te moeten afzien.

In het *Handbuch der Blutgruppenkunde* (8) komt van de hand van Hesch een uitstekend overzicht voor en van denzelfden een zoo volledig mogelijke literatuuropgave tot Augustus 1931.

In kort bestek hiervan een herhaling te geven kwam mij vrij overbodig voor. Ik heb er de voorkeur aan gegeven alles wat niet direct met het onderwerp in verband stond te vermijden en liever bij elk hoofdstuk de daarop betrekking hebbende literatuur wat uitvoeriger te bespreken.

HOOFDSTUK I.

Beschrijving der gebruikte methoden bij 't bloedgroeponderzoek.

§ 1. Nomenclatuur.

In dit proefschrift is de door von Dungern en Hirszfeld ingevoerde benaming der bloedgroepen O, A, B en AB gebruikt, daar deze tegenwoordig wel algemeen aanvaard wordt, sinds zij in 1928 door de Hygiëne-Commissie van den Volkenbond is aangenomen. (Zie Aldershoff N. T. v. G. (9). De letters stellen voor welke agglutinogenen in de bloedlichaampjes der betreffende bloedgroep voorkomen. Het verdient aanbeveling ook de agglutininen, die in 't serum aanwezig zijn te vermelden. De benaming wordt dan $O_{\alpha\beta}$, A_{β}, B_{α} en AB_0. Om vergissingen te voorkomen kan men een A_{β} serum anti B-serum noemen en een B_{α} serum anti A, aangevende degroep, waarvan de bloedlichaampjes door dit serum worden geagglutineerd.

Ter vergelijking met de vroeger meer gebruikte schemata van Jansky en van Moss diene het volgende overzicht.

Jansky		Moss		von Dungern en Hirszfeld
Groep I	=	IV	=	$O_{\alpha\beta}$
Groep II	=	II	=	A_{β}
Groep III	=	III	=	B_{α}
Groep IV	=	I	=	AB_0

Als voortaan van O, A, B of AB bloedlichaampjes sprake is, worden menschenbloedlichaampjes bedoeld. Wanneer het bloedlichaampjes van dieren betreft, zal dit er steeds bij worden vermeld.

§ 2. Bewaren der bloedlichaampjes.

Als testbloedlichaampjes werden gebruikt bloedsuspensies ter sterkte van ongeveer 5 %, d.w.z. 5 deelen bloed op 95 deelen verdunningsvloeistof. Deze verdunning werd, eenmaal vastgesteld zijnde, later op 't oog gemaakt. Eenige wisseling in concentratie der bloedsuspensie heeft geen invloed op het resultaat van 't onderzoek, zooals uit oriënteerende proeven bleek.

Men dient voor onderzoek van een serum steeds met verdund bloed te werken, daar anders zwakke agglutinaties onzichtbaar zijn en bovendien snel stolling op kan treden.

Als verdunningsvloeistof werd gebruikt physiologische keukenzoutoplossing waaraan ½ % natriumcitraat en 1 ‰ superol is toegevoegd. Het natriumcitraat dient om stolling tegen te gaan. De superol om infectie te voorkomen. Thomsen (10) heeft n.l. gevonden, dat bij besmetting met sommige bacterieën, (hij beschrijft een gram positief staafje M genaamd en een gram negatief staafje J) de bloedsuspensies niet-specifieke agglutinatie gaan vertoonen. Dit kan reeds na 24 uur het geval zijn. Deze niet-specifieke agglutinatie berust op het feit, dat door de inwerking der bacteriën op de bloedlichamen deze gevoelig worden voor een in vrijwel elk menschen- en dierenserum voorkomend agglutinine, dat evenwel onder normale omstandigheden zijn werking niet kan ontplooien. Deze Thomsensche agglutinatie, waarbij de bloedlich. in elk serum geagglutineerd worden, ook in het eigen serum komt vrij vaak voor.

De bloedsuspensies werden bewaard in de ijskast even boven 0°, daar bij lager temp. te snel haemolyse optreedt.

Ook bij kamertemp. blijven ze zoo lang goed. Dergelijke suspensies zijn wel langer dan twee weken bruikbaar.

De bloedlichaampjes krijgen wel langzamerhand een eenigszins bruine tint, maar blijven volkomen specifiek agglutineerbaar, hoewel de gevoeligheid geleidelijk gaat afnemen, wellicht doordat de groepstof in de verdunningsvloeistof oplost. Tenslotte treedt haemolyse op.

In 't algemeen gesproken is 't het beste zoo versch mogelijke bloedlich. te gebruiken.

§ 3. Bewaren der sera.

Deze werden in steriele buisjes met gummistoppen in de ijskast bewaard. Soms zonder conserveermiddel, soms met chloroform of superol.

Superol is goed bruikbaar. Ook chloroform heeft mij zeer goed voldaan. De sera werden hierbij in reageerbuizen of Wassermannbuisjes bewaard. Na het toevoegen van een geringe hoeveelheid chloroform werden de buizen met gummistoppen gesloten en eenige malen omgedraaid. De chloroform zinkt weer op den bodem. Op het scheidingsvlak serum-chloroform vormt zich op den duur een gering neerslag. Het serum erboven blijft steriel en meestal helder. Met een steriele pipet kan men er de verlangde hoeveelheden uit nemen. Daarbij moet men er zeer op letten geen chloroformdruppeltjes in de pipet op te zuigen, daar deze, indien ze niet uit het serum verdampt zijn, bij de proef haemolyse der bloedlichaampjes veroorzaken. Ondanks dit bezwaar is chloroform mij goed bevallen.

De agglutininetiter blijft lang behouden; voor zoover ik heb kunnen nagaan evenlang als in serum, dat zonder conserveermiddel werd bewaard.

Chloroform heeft het groote voordeel, dat het door verdamping (eventueel in vacuo) gemakkelijk te verwijderen is, wat met superol en dergelijke conserveermiddelen niet het geval is.

§ 4. Titerbepaling.

Om de agglutininetiter van een serum te bepalen werd een serie serumconcentraties gemaakt, die volgens een meetkundige reeks afdaalden.

Van een reeks buisjes worden in elk 10 dr. (druppels) physiol. zoutsolutie gebracht, behalve in het eerste buisje. Dit geschiedt met een Pasteurpipet met glad afgebroken punt. Daarna komen in het eerste en tweede buisje 10 dr. serum. Alles geschiedt met dezelfde pipet, die na elke manipulatie 3 × schoongespoeld wordt in physiologische zoutsolutie. De zich in 't 2e buisje bevindende druppels serum en zoutsolutie worden gemengd door ze drie maal in de pipet op te zuigen en uit te blazen. Hierna worden 10 dr. van het mengsel in het 3e buisje gebracht en gemengd met de daarin aanwezige 10 dr. zoutsolutie. Daarna van dit mengsel weer 10 dr. in 't 4e buisje enz. Men verkrijgt zoo een reeks buisjes met serumconcentraties:

$$1 \quad \tfrac{1}{2} \quad \tfrac{1}{4} \quad \tfrac{1}{8} \quad \tfrac{1}{16} \quad \tfrac{1}{32} \text{ enz.}$$

De pipet moet bij het druppelen steeds onder ongeveer dezelfde hoek worden gehouden om gelijke druppelgrootte te krijgen.

Bij bepalingen waarbij het er zeer op aan kwam om een quantitatief nauwkeurig resultaat te bereiken, werd tusschen deze reeks nog de reeks $\tfrac{1}{3}$ $\tfrac{1}{6}$ $\tfrac{1}{12}$ $\tfrac{1}{24}$ ingevoegd, zoodat de verdunningen dan waren 1 $\tfrac{1}{2}$ $\tfrac{1}{3}$ $\tfrac{1}{4}$ $\tfrac{1}{6}$ $\tfrac{1}{8}$ $\tfrac{1}{12}$ $\tfrac{1}{16}$ $\tfrac{1}{24}$ $\tfrac{1}{32}$ $\tfrac{1}{48}$ etc.

Nog kleinere verschillen te maken tusschen de opeenvolgende buisjes heeft geen zin, daar men dan binnen de foutengrens der techniek komt. De nauwkeurigheid neemt daardoor niet meer toe, daar de overgangen dan te vloeiend worden.

Heeft men de verdunningsreeks gemaakt dan wordt van elk buisje een druppel op objectglaasjes gebracht, die met paraffinestreepen in drieën zijn verdeeld om dooreenvloeien der druppels te voorkomen. Op ieder object-

glas kan men zoo drie serumverdunningen onderzoeken.

Bij elke druppel serumverdunning wordt een druppel van een bloedsuspensie gebracht. Serum en bloedsuspensie worden nu dooreen geroerd en op een plankje in schommelende beweging gehouden. Na 10 min. wordt afgelezen bij welke verdunning nog juist met 't bloote oog agglutinatie is waar te nemen. Voor het beoordeelen van een zeer zwakke agglutinatie is 't voordeelig deze bij schuin invallend sterk licht tegen een donkeren achtergrond te bekijken. Men krijgt zoo een soort donkerveldbelichting, waardoor soms een zwakke agglutinatie beter te zien is dan bij doorvallend licht tegen een witten achtergrond. Vindt men bijv. de zwakste nog juist zichtbare agglutinatie in de 5e druppel, dan is, daar de serumverdunning in het 5e buisje $^1/_{16}$ is, de titer $^1/_{32}$ daar door de bloedsuspensie nog eens een tweemalige verdunning wordt veroorzaakt.

In de literatuur wordt vaak de titer alleen naar de serumverdunning opgegeven; deze zou in dit geval dus genoemd worden $^1/_{16}$. Juister evenwel is als titer $^1/_{32}$ aan te nemen, wat in dit proefschrift steeds is geschied.

De bepaling geschiedt dus bij kamertemperatuur. De agglutinatie bij 37° C. te laten verloopen is minder juist. De werking der agglutinine wordt daardoor verzwakt, de titer is dan veel lager, een zwakke agglutinatie zou over 't hoofd kunnen worden gezien.

Ook de bepaling bij lager temperatuur dan kamertemp. moet verworpen worden, daar dan de koude-agglutininen in 't spel kunnen komen.

De nadruk moet er verder opgelegd worden, dat de gevonden titer slechts relatieve waarde heeft, daar de gevoeligheid van bloedlichaampjes afkomstig van verschillende personen, wisselt en eenzelfde serum dientengevolge daarmee verschillende titers geeft. We hebben bij dit proces twee veranderlijke factoren, waardoor een norm ontbreekt. Daar echter de wisseling der gevoeligheid van

de bloedlich., vooral als ze zoo versch mogelijk worden gebruikt, binnen zekere grenzen blijft, is er toch wel eenige waarde aan de hoogte van een titer toe te kennen. 't Beste is een gemiddelde te nemen van eenige bepalingen met verschillende bloedlichaampjes.

Bij de volgende onderzoekingen gaat het echter meestal om *titer-verhoudingen,* die zooveel mogelijk op denzelfden dag met dezelfde bloedlichaamjes bepaald zijn. Deze verhoudingen hebben dus wel een „absolute" waarde, onafhankelijk van de gevoeligheid der gebruikte test-bloedlichaampjes.

HOOFDSTUK II.

Concentreering van isohaemagglutinine door „Serumzuivering".

§ 1. Literatuuroverzicht.

In de inleiding is de vraag gesteld of het, naar analogie van de door „serumzuivering" bereikte concentreering der antitoxinen, mogelijk zou zijn ook de in normaal menschenserum voorkomende iso-agglutinine door dit proces te concentreeren.

De bedoeling bij de serumzuivering is om, door die eiwitfracties, waaraan geen (of weinig) antistof gebonden is te verwijderen, een gunstiger verhouding eiwit-antistof te verkrijgen. Men kan dan al naar 't doel dat men zich stelt een gezuiverd product met een lager eiwitgehalte dan 't oorspronkelijke serum bereiden of een product met gelijk of hooger eiwitgehalte en naar verhouding meer antistof. Waar 't bij een testserum voor diagnostische doeleinden van geen belang is een eiwitarm product te gebruiken, kunnen we dus bij de zuivering van agglutininehoudende sera een gezuiverd product bereiden met een hooger eitwitgehalte dan 't oorspronkelijke serum, waardoor de agglutinine titer des te hooger kan zijn. Men is echter aan een bepaalde eiwitconcentratie gebonden, aangezien bij overschrijding daarvan de vloeistof te viscueus en daardoor de agglutinatie belemmerd wordt.

Voorwaarde voor 't gelukken van een „serumzuivering" is, dat de verdeeling van de agglutininen over de serumeiwitten een ongelijke is.

Over deze verdeeling zijn voor de haemagglutininen nog slechts weinig onderzoekingen verricht. Alvorens deze te vermelden wil ik in 't kort eenige van de belangrijkste onderzoekingen, die over de verdeeling der antistoffen in 't algemeen over de eiwitfracties van 't bloedserum handelen, bespreken.

Allereerst iets over de verdeeling van de serumeiwitten in fracties. Door Hofmeister en zijn leerlingen zijn de globulinen uitvoerig bestudeerd en methoden aangegeven om ze te bereiden, vooral door uitzouten met neutrale zouten.

Kauder (11) heeft aangetoond, dat door ammoniumsulfaat de eiwitten van 't bloedserum in twee groepen neergeslagen kunnen worden, waarvan de bij halve verzadiging met ammoniumsulfaat neergeslagen fractie als globuline, de daarbij in oplossing blijvende fractie als albumine werd geidentificeerd.

Fuld en Spiro (12) hebben aangegeven, dat de globulinefractie nog weer in drie fracties kan worden verdeeld, waarbij de eerste fractie, die bij 28 % verzadiging neerslaat 't fibringlobulin van Hammersten en de bij $^1/_3$ verzadiging neergeslagen fractie 't euglobuline, de rest 't pseudoglobuline zou zijn.

Over de verdeeling der globulinefractie in eu- en pseudoglobuline, waarvan de eerste in zuiver water niet, de tweede wel oplosbaar zou zijn, is veel strijd gevoerd, die nog niet geheel ten einde is. Wel is komen vast te staan dat de eu- en pseudoglobulinefracties die volgens verschillende methoden (als dialyse, uitzouten, neerslaan met CO_2 of azijnzuur etc.) zijn bereid, niet geheel identiek zijn, wat deze vragen zeer ingewikkeld maakt en veel verschillende uitkomsten verklaart.

Zoo hebben Freund en Joachim (13) aangetoond, dat

't door uitzouten met ammoniumsulfaat verkregen eu- en pseudoglobuline beide een door dialyse neerslaand en een ondanks langdurige dialyse tegen gedestilleerd water in oplossing blijvend deel bevatten. De door ammoniumsulfaat verkregen splitsing der globulinefractie is dus een andere dan die verkregen door dialyse.

Sörensen (14) heeft aangetoond, dat de uit serum verkregen eu- en pseudoglobuline nòch door gefractioneerd uitzouten, nòch door dialyse volledig te scheiden zijn.

Voor een verder overzicht van deze kwesties verwijs ik naar 't in 1927 verschenen in het Rijks Serologisch Instituut bewerkte proefschrift van Verveen (15) en naar 't boek van Spiegel-Adolf „Die Globuline" (16).

Pick (17) heeft als eerste, gebruik makend van ammoniumsulfaat, de verdeeling der antistoffen over de serumeiwitten nagegaan.

Hij vond de antistoffen steeds in de globulinefractie, niet in de albuminefractie van 't serum.

Wat de verdeeling over de globulinefractie zelf betreft, Pick vond deze voor verschillende antistoffen en voor verschillende diersoorten zeer verschillend.

Typhusagglutinine bijv. bleek bij geiten, Guineesche biggetjes en konijnen aan de euglobulinefractie gebonden. In paardeserum aan de pseudoglobuline.

Choleraagglutinine daarentegen vond hij bij paard en geit aan de euglobulinefractie.

Diphtherieantitoxine bij 't paard aan de pseudoglobuline, bij de geit aan de euglobuline gebonden.

Andere onderzoekers kwamen evenwel tot andere resultaten, tenminste wat de verdeeling over eu- en pseudoglobuline betreft. De albuminefractie werd steeds vrij van antistoffen gevonden.

Porges en Pribram (18) bijv. vonden de verschillen tusschen geite- en paardeserum niet constant bij diphtherieantitoxine, maar afhankelijk van den tijd gedurende welken 't serum bewaard was geworden.

Landsteiner en Calvo (19) vonden geen merkbare verschillen tusschen (bacterie)agglutinine gehalte van eu- en pseudoglobuline.

Went (20), die serum met dialyse, CO_2 en verdund HCl behandelde, vond in 't hierdoor ontstane neerslag (euglobuline) geen (bacterie)agglutinine. Door neerslaan met ammoniumsulfaat, magnesiumsulfaat of natriumsulfaat kreeg hij fracties, die wel agglutinine bevatten.

Ruppel (21) vond, dat pseudoglobulineoplossingen, die door electro-dialyse werden bereid, de grootste hoeveelheid antistof bevatten. Door 't verwijderen der euglobulinefractie gaat 15 à 20 % van de antistof verloren, wat gezien de verhouding der hoeveelheden eu- en pseudoglobuline, wijst op een ongeveer gelijkmatige verdeeling van de antistof over de fracties.

Kapsenberg en Rispens (22) kwamen voor verschillende bacterieagglutininen tot de conclusie, dat deze gelijkmatig over de globuline verdeeld zijn. Zij pasten de methode van gefractioneerd uitzouten met ammoniumsulfaat toe, waarna zij de oplossingen der eiwitfracties zoodanig aanvulden, dat 't gehalte aan globuline in de euglobuline-, pseudoglobuline- en totaal-globuline-oplossingen gelijk was. Zij vonden dan ook een nagenoeg gelijken titer voor alle oplossingen. De albuminefractie bevatte geen agglutinine. Vele der in de literatuur bestaande tegenspraken meenen zij te moeten wijten aan 't feit, dat de meeste onderzoekers de oplossingen der fracties tot 't volume van 't oorspronkelijk serum hebben aangevuld, waardoor in die fracties, die weinig eiwit bevatten, de verdunning te groot wordt om de antistof nog te kunnen aantoonen. Door de verschillende hoeveelheden euglobuline, die bij de verschillende bereidingsmethoden neerslaan, zouden dan de verschillende resultaten te verklaren zijn.

Na dit korte overzicht, dat slechts eenige punten aangestipt heeft, zullen de onderzoekingen, die betrekking hebben op de verdeeling der haemagglutininen in menschen-

serum over de serumeiwitten wat uitvoeriger worden besproken.

Schütz en Wöhlisch (23) geven aan de isoagglutininen in de globulinefractie gevonden te hebben.

Rona en Krebs (24) kregen niet steeds dezelfde resultaten. Zij gebruikten om de serumeiwitten in fracties te splitsen de electrodialyse. In totaal werden door hen drie sera onderzocht.

't Eerste serum, een $O_{\alpha\beta}$ serum, bevatte 't α-agglutinine in de serumrest, die na verwijdering der euglobuline door electrodialyse overbleef. De titer was hiervan lager dan van 't oorspronkelijke serum. Het euglobulineneerslag werd niet onderzocht.

Bij twee A_β sera vonden zij 't β-agglutinine in beide fracties, doch de eene maal hoofdzakelijk in 't euglobuline, de andere maal hoofdzakelijk in 't pseudoglobuline + albuminegedeelte. (Deze laatste werden niet gescheiden).

We mogen dus conculdeeren, dat volgens Rona en Krebs 't agglutinine zich waarschijnlijk in beide fracties, zoowel in 't eu- als in 't pseudoglobuline bevindt. De eene maal echter grootendeels in de eene, een andere maal in de andere fractie.

Bleyer (25) vond de agglutininen van zes menschensera, die evenwel een lagen titer hadden, wat voor dit onderzoek ongunstig is, voornamelijk in de euglobulinefractie, hoewel in vijf van de zes sera ook de pseudoglobuline nog duidelijk agglutineerend vermogen had. Bleyer ging als volgt te werk. De sera werden na $^1/_3$ verzadiging met ammoniumsulfaat gecentrifugeerd en 't neerslag 24 uur gedialyseerd om 't zout te verwijderen. De rest van 't serumeiwit werd door halve verzadiging met ammoniumsulfaat in pseudoglobuline en albumine gesplitst. Ook deze fracties werden 24 uur gedialyseerd. Werd een neerslag in de dialysezakken opgemerkt, dan werd dit vervolgens afgecentrifugeerd en bij de euglobulinefractie gevoegd.

Een der sera werd bovendien door electro-ultrafiltratie

volgens Bechhold-Rosenberg gefractioneerd, wat gelijke resultaten gaf. De verkregen oplossingen werden geconcentreerd op Bechhold-König filters (10 % ijsazijn collodium ultrafilters) tot 't oorspronkelijk serumvolume bereikt was. Na de oplossingen isotonisch gemaakt te hebben, werd de titer bepaald.

Bleyer vond bij zijn verschillende sera een 2 tot 8 × hooger titer in de euglobulineoplossing, dan in de pseudoglobuline, behalve bij een serum, waar de pseudoglobulineoplossing in 't geheel geen agglutinatie vertoonde. Bij beschouwing der quantitatieve verhoudingen blijkt evenwel, dat in dit serum een verlies van ongeveer 60 % aan agglutinine opgetreden is.

Vera Schröder (26), die door electro-utrafiltratie volgens Bechhold en Rosenberg de euglobulinefractie isoleerde en deze oploste in een volume gelijk aan 't oorspronkelijke serumvolume, vond de agglutininetiter hiervan gelijk aan die van 't serum bij verschillende $O_{\alpha\beta}$, A_{β} en B_{α} sera. De rest van de sera vertoonde geen agglutinatie.

We zien dus, dat ook voor de isohaemagglutininen de verschillende onderzoekers niet tot overeenstemmende resultaten gekomen zijn.

Eigen onderzoek

§ 2. Algemeene opmerkingen.

Zooals reeds is opgemerkt, berust de mogelijkheid van een concentratie der agglutininen door middel van serumzuivering op de ongelijke verdeeling van de agglutininen over de verschillende serumeiwitten respect. eiwitfracties.

De onderzoekingen over deze verdeeling, die tot dusver zijn verricht, spreken elkaar in vele opzichten tegen.

Bovendien is gebleken, dat de methode, volgens welke het serumeiwit in fracties wordt verdeeld, in belangrijke mate invloed heeft op het resultaat. Om deze redenen

moest dus, alvorens aan de zuivering te kunnen beginnen, worden nagegaan, hoe bij neerslaan door middel van ammoniumsulfaat de verhouding tusschen agglutinine en eiwit is.

De bedoeling van de hier volgende onderzoekingen is geenszins de theoretische vraag te beantwoorden aan welke eiwitfracties 't agglutinine gebonden is; 't gaat er hier alleen om of het uitzouten met ammoniumsulfaat, zooals dat praktisch toegepast kan worden, de mogelijkheid biedt, gezuiverde sera met hoogen titer te bereiden.

§ 3. Uitzoutingsproeven met paardeserum.

1. Daar bij dit onderzoek groote hoeveelheden serum noodig zijn, heb ik, teneinde de werkwijze te leeren beheerschen, eerst met paardeserum gewerkt.

Bij paardebloed heeft men soortgelijke verhoudingen gevonden, als bij den mensch. Men schijnt bij paarden vier bloedgroepen te kunnen onderscheiden analoog aan 't schema van Landsteiner. Evenwel berichten de meeste onderzoekers, dat er steeds enkele individuen voorkomen, die niet in 't schema passen.

Thomoff (27) vond in 1930 evenwel bij een nauwkeurig onderzoek over 100 paarden, dat deze alle in een viertypeschema konden worden gerangschikt, analoog aan dat van den mensch. Wel is een agglutinine vaak zóó zwak, dat 't niet aangetoond kan worden. Soms kon in plaats van 't agglutinine 't overeenkomstige haemolysine worden aangetoond. Deze onderzoeker vond geen „nevengroepen".

Pondman heeft in 't R.S.I. een uitvoerig nog niet gepubliceerd onderzoek over 92 paarden verricht. Hij komt hierbij tot 't resultaat, dat er inderdaad 4 bloedgroepen zijn, waarin alle paarden konden worden gerangschikt. Deze 4 bloedgroepen staan geheel los van die van den mensch.

't Onderzoek hierover is nog niet afgesloten. Voor mijn proeven kwam 't er echter slechts op aan een iso-agglu-

tinine in paardebloed te concentreeren. De kwestie van de bloedgroep waartoe dit behoort doet hierbij verder niet ter zake.

Twee paardesera werden onderzocht. Serum p. 72 van een paard geimmuniseerd met gasphlegmone-toxine en serum p. 77 van een paard geimmuniseerd met diphterietoxine. Voor testbloedlichaampjes werden gebruikt bloedsuspensies van de paarden 57, 66, 71, 73, 74, 75, 76 en 81.

De bloedsuspensies reageerden met de sera als volgt:

TABEL 1

bloedsuspensies	57	66	71	73	74	75	76	81
serum p. 72	—	—	+	+	+	+	+	+
serum p. 77	—	+	+	+	+	+	+	+

De titer der sera was laag, voor de verschillende bloedsuspensies wisselend tusschen $^1/_3$ en $^1/_4$. Men vindt bij paardesera bijna steeds een lagen titer.

2. Voor 't scheiden der eiwitfracties werd gebruikt gemaakt van ammoniumsulfaat.

Om een overzicht te krijgen werden de serumeiwitten eerst, door 't serum half te verzadigen met ammoniumsulfaat, gescheiden in globuline en albuminefractie. De eerste slaat neer, de laatste blijft in oplossing. Na 't ammoniumsulfaat door dialyse verwijderd te hebben, werd nagegaan in welke fractie de agglutinine aanwezig was.

Bij 420 cc. versch paardeserum (p. 72) werd 420 cc. van een verzadigde ammoniumsulfaat oplossing gebracht en ermee gemengd. Na een uur (later bleek deze tijd wat kort te zijn en liet ik 't serum met de ammoniumsulfaat oplossing gemengd een nacht staan) werd het mengsel op filters van gehard filtreerpapier gebracht en gefiltreerd tot het filtraat volkomen helder doorliep. Het filter met het neerslag werd daarna met half verzadigd ammoniumsulfaatoplossing gewasschen, open gevouwen en uitgespreid.

Een droog filter werd erop gelegd en dit geheel tusschen vellen filtreerpapier gebracht en deze zoo dikwijls verwisseld, tot er geen vocht meer uit het neerslag kwam, waarna het onder druk (van pers of zware gewichten) verder werd gedroogd. 't Gedroogde neerslag werd met een spateltje van het filtreerpapier geschrapt, in wat aq. dest. opgelost en in een cellophaanzak tegen stroomend leidingwater gedialyseerd. Een kleine hoeveelheid chloroform werd toegevoegd als conserveermiddel. Het verkregen filtraat, dat de albumine bevat, werd met vast ammoniumsulfaat volkomen verzadigd, waardoor de rest van het eiwit (het albumine) neerslaat. Dit neerslag werd weer afgefiltreerd, gedroogd, in wat aq. dest. opgelost en op dezelfde wijze als de vorige fractie gedialyseerd.

De voortgang der dialyse werd met Nessler's reagens nagegaan. Het bleek dat na 5 à 6 dagen dialyseeren de vloeistof in den dialysezak met Nessler's reagens slechts een zwak gele verkleuring meer gaf, zoodat nog slechts geringe sporen ammoniumsulfaat aanwezig waren. Dan werd de vloeistof uit den zak genomen, de hoeveelheid gemeten en vast keukenzout toegevoegd tot isotonie.

Ammoniumsulfaat in niet te hooge concentratie schaadt de agglutinatie niet. 't Is hiervoor dus niet noodzakelijk zoo lang te dialyseeren.

Het was evenwel de bedoeling bij latere proeven 't eiwitgehalte der gedialyseerde fracties te bepalen volgens de Kjeldahl-methode en daarbij zou nog aanwezig ammoniumsulfaat foutieve waarden geven. Om er ervaring over te krijgen, na hoeveel tijd het ammoniumsulfaat verdwenen is, werd de dialyse zoo lang voortgezet.

Van de 420 cc. serum paard 72 werd op deze wijze na de dialyse verkregen 354 cc. globulineoplossing en 266 cc. albumineoplossing.

3. Bij onderzoek bleek de globulineoplossing agglutinine te bevatten. De albumineoplossing daarentegen gaf

met geen enkele bloedsuspensie ook maar een spoor agglutinatie.

Hierna werd de globulineoplossing aangevuld tot 420 cc. en de titer ten opzichte van verschillende bloedsuspensies bepaald.

TABEL 2.

Bloedsuspensies	p. 57	p. 66	p. 73	p. 74	p. 75	p. 76	p. 81
serum p. 72	—	—	1/4	1/3	1/3	1/3	1/4
globuline p. 72	—	—	1/4	1/3	1/3	1/3	1/4
albumine p. 72	—	—	—	—	—	—	—

We zien dus dat de agglutinine quantitatief in de globulinefractie aanwezig is. Door deze werkwijze schijnt niet veel verlies aan agglutinine plaats te hebben. Uit de tabel blijkt tevens, dat de globulineoplossing specifiek agglutineert. De bloedlich. van p. 57 en p. 66, die door 't serum niet geagglutineerd werden, worden dit ook niet door de globulineoplossing. De specificiteit blijft bij 't uitzouten dus behouden, zooals ook verder zal blijken.

Met 325 cc. serum van paard 77 is hetzelfde onderzoek verricht. Ook hier bleek de agglutinine uitsluitend in de globulinefractie aanwezig.

De albuminefractie vertoonde geen spoor van agglutinatie.

Na aanvulling tot het oorspronkelijk serum-volume was ook hier de titer gelijk aan dien van het serum.

TABEL 3.

Bloedsuspensies	p. 57	p. 71	p. 73	p. 76
serum p. 77	—	1/2	1/2	1/2
globuline p. 77	—	1/2	1/2	1/2
albumine p. 77	—	—	—	—

Nu kan men hieruit nog niet de conclusie trekken, dat

het albumine geen agglutinine bevat. De agglutininetiter is daarvoor te laag. Een klein gedeelte van het agglutinine aan de albuminefractie gebonden, zou niet aangetoond kunnen worden. Wel is het agglutinine schijnbaar quantitatief teruggevonden, maar de techniek van de titerbepaling is tot dusver niet nauwkeurig genoeg om fouten van minstens 25 % te vermijden. Daarom zijn deze paardesera met lagen titer voor dit soort onderzoekingen eigenlijk weinig geschikt.

Zou bijv. $^1/_8$ deel van het agglutinine aan de albuminefractie gebonden zijn, dan zou dit bij een serum met lagen titer beneden de grens van aantoonbaarheid liggen; bij een serum met hoogen titer daarentegen nog duidelijk aantoonbaar zijn.

Om dezelfde reden is dan ook de albumineoplossing, zooals die uit den dialysezak komt, niet direct tot het oorspronkelijk serumvolume aangevuld. De oplossingen moeten zoo geconcentreerd mogelijk gebruikt worden, daar anders zwakke agglutinatie aan de aandacht ontsnapt. Soms kan het noodig zijn een oplossing door indampen in een vacuum-exsiccator nog te concentreeren om een zwak agglutinine aan 't licht te brengen.

§ 4. Concentreering der globulineoplossingen in den vacuum-exsiccator.

Doordat in normaal paardeserum ± 50 à 60 % van het eiwit globuline is, kan men door een globulineoplossing te maken van gelijk eiwitgehalte als 't oorspronkelijke serum, theoretisch $1^1/_2$ à 2 malige concentraties bereiken.

Bij geimmuniseerde paarden is meestal de hoeveelheid globuline ten opzichte van de hoeveelheid albumine vermeerderd, zoodat dan de voorwaarden voor de zuivering minder gunstig zijn.

De globulineoplossing zooals die uit den dialysezak komt, is door instroomend water tijdens de dialyse verdund.

Daarom werd getracht deze oplossingen door waterontrekking te concentreeren.

Hiertoe werden schaaltjes met de globulineoplossing gebracht in een vacuum-exsiccator, d.i. een glazen klok, waarin zich op den bodem calciumchloride bevindt met een rooster er boven, waarop de schaaltjes met de te concentreeren oplossing kunnen worden geplaatst. De klok wordt aan een waterstraalpomp verbonden, die voor luchtverdunning zorgt. Hierdoor wordt een snelle verdamping bereikt, waarbij de waterdamp door het calciumchloride gebonden wordt.

Men kan zoo bij kamertemperatuur betrekkelijk snel een oplossing concentreeren.

100 cc. van de globulineoplossing van serum p. 72 (zonder keukenzout) werd geconcentreerd tot 50 cc. Hierbij trad eenig verlies op, doordat een deel van de globuline aan den rand van het schaaltje indroogde. Hierna werd keukenzout toegevoegd tot 0,85 % en de titer bepaald.

Titer der geconcentreerde globulineoplossing van p. 72:

met bloedlich. p. 76 $^1/_6$
„ „ p. 73 $^1/_8$
„ „ p. 81 $^1/_8$

Ten opzichte van het oorspronkelijk serum was de titer dus 2 × zoo hoog geworden. Met bloedlich. p. 57 en p. 66 gaf ook deze geconcentreerde globuline-oplossing geen agglutinatie.

De globulineoplossing van serum p. 77 werd op dezelfde wijze geconcentreerd, en wel zóó, dat van de oorspronkelijke 325 cc. serum 100 cc. globulineoplossing verkregen werd. De titer was nu met bloedlich. p. 76 $^1/_4$. Hiermede is dus eveneens een tweemalige concentratie bereikt.

Men kan natuurlijk door meer water te onttrekken de oplossingen nog verder concentreeren. Dan wordt echter de vloeistof zoo viscueus, dat de agglutinatie hierdoor bemoeielijkt en vertraagd wordt. Men schiet dan over het

doel, dat immers is krachtig en snel agglutineerende sera te verkrijgen, heen.

We moeten bij deze concentratieproeven twee factoren uit elkaar houden en wel de *zuivering* bereikt door díe eiwitfracties, die geen agglutinine bevatten, te verwijderen en de *concentreering door wateronttrekking*. Door de zuivering bereikt men dat een „gezuiverd serum" bij gelijk eiwitgehalte hooger agglutininetiter heeft. Door wateronttrekking bereikt men hooger titer, maar gepaard aan een hooger eiwitgehalte.

Om een goede beoordeeling van het resultaat mogelijk te maken dient men echter de factoren uit elkaar te houden en is het gewenscht de *zuiveringsfactor* op te geven.

Dit is de verhouding:

$$\frac{\dfrac{\text{agglutininetiter}}{\text{eiwitgehalte}}\ \text{gezuiverd product}}{\dfrac{\text{agglutininetiter}}{\text{eiwitgehalte}}\ \text{van het oorspronkelijk serum}}$$

Alleen deze zuiveringsfactor geeft aan of een zuivering geslaagd is en kan vergelijkingen tusschen de verschillende methodes toelaten.

Geeft men alleen de verhouding der agglutininetiters van gezuiverd product en oorspronkelijk serum op, dan spelen daarbij zoowel wateronttrekking als zuivering een rol en kan men schijnbaar goede zuivering bereikt hebben, die in waarheid alleen op indikking der oplossing berust.

Om na te gaan of de albumineoplossing sporen agglutinine bevat werd die van serum p. 72 en p. 77 in de vacuumexsicator 2 maal geconcentreerd, waarbij dus de viscositeitsgrens niet werd overschreden, gezien het voorgaande resultaat bij de concentratie van de globulinefractie. Ook na de concentratie was evenwel geen agglutinatie aan te toonen met de bloedsuspensies p. 76, p. 73 en p. 57.

§ 5. **Uitzoutingsproeven met menschenserum.**

Nadat bij paardeserum gebleken was, dat 't isoagglutinine aan de globulinefractie gebonden is, werd nagegaan of dit ook bij menschenserum het geval is. Doordat hier met kleiner hoeveelheden serum gewerkt moest worden, werd de techniek eenigszins gewijzigd.

Bij 't met aqua dest. verdunde serum werd een gelijke hoeveelheid verzadigd ammoniumsulfaatoplossing gebracht, goed gemengd en na eenige uren staan in een gesloten kolf (meestal gedurende den nacht) gefiltreerd door een klein filter van gehard filtreerpapier. Na afloop van 't filtreeren werd 't neerslag gewasschen met half verzadigde ammoniumsulfaatoplossing. Daarna werd 't filter opengevouwen en weer om een middellijn dubbel gevouwen, zoodat de geringe hoeveelheid neerslag zich tusschen de helften van 't filtreerpapier bevond. Dit werd weer tusschen bladen filtreerpapier gedroogd en tenslotte onder druk droog geperst. Het dubbel gevouwen filtreerpapier met 't neerslag er tusschen werd hierna in reepjes geknipt en in den dialysezak gebracht met wat aqua dest. Gedurende het dialyseeren lost dan vanzelf het neerslag aanvankelijk in 't naar binnenstroomde water op. Later, als de zoutconcentratie sterk verlaagd is, slaat het in oplossing gegane eiwit weer gedeeltelijk neer (euglobuline).

Nadat 't ammoniumsulfaat uit de oplossing verdwenen was, hetgeen met Nessler's reagens gecontroleerd werd, werd de oplossing uit den dialysezak genomen en de filtersnippers uitgeperst. De globulineoplossing is na lang dialyseeren troebel en de reactie zuur. De troebeling door uitgevlokt (eu)globuline verdwijnt meestal na isotonisch maken met NaCl. Vaak blijft een lichte opalescentie achter. Een enkele maal is de oplossing niet helder te krijgen, ook niet door de reactie neutraal te maken. Ik keeg den indruk, dat dit meestal voorkwam na langdurig dialyseeren. Dialyseert men niet langer dan 2 à 3 dagen, dan heeft men hiervan minder last.

Een enkele opmerking nog over den zuurgraad. Geringe verschillen in zuurgraad der globulineoplossingen storen de agglutinatie niet. Enkele malen echter werd bij een globulineoplossing opgemerkt, dat de agglutinatie op 't oog in de onverdunde oplossing zwak was en toch na hooge verdunning nog werkzaam. De oorzaak hiervan werd gevonden in een sterke zuurgraad der niet verdunde oplossing, waarvan de P_H 4.88 bedroeg. Na neutraliseeren met verdunde loog bleek de agglutinatie krachtiger op te treden. Het is begrijpelijk, dat waar bij de titerbepaling door de verdunning met neutrale vloeistof de zuurgraad afnam, na de verdunning de titer niet lager werd gevonden. Bij de serumzuivering dient er dan ook op gelet te worden, dat 't eindproduct ongeveer geneutraliseerd wordt.

Bij 't onderzoek werd daarom in 't vervolg elke globulineoplossing geneutraliseerd.

Op de bovenbeschreven wijze werden meerdere menschensera behandeld. De globulineoplossing werd meestal tot 't volume van 't oorspronkelijke serum aangevuld, daar de titer hoog genoeg was. De albumineoplossingen werden zoo geconcentreerd mogelijk onderzocht.

De resultaten zijn in tabel 4 aangegeven.

We zien dus dat de globuline quantitatief vrijwel alle agglutinine bevat. De iets lager titer zal wel aan eenig verlies bij de zuivering te wijten zijn. Dat enkele malen de titer der globulineoplossing gelijk gevonden wordt aan dien van 't serum beteekent niet, dat geen verlies is opgetreden. Een verlies van 10 % b.v. kan nog niet in den titer tot uitdrukking komen. Eerst verschillen van meer dan 25 % zijn merkbaar. Daardoor blijft alle quantitatieve werk slechts ruw benaderend. Bij deze onderzoekingen moeten serum- en globulinetiter op denzelfden dag met dezelfde testbloedlichaampjes bepaald worden.

De albumineoplossing bevat geen agglutinine. Een uitzondering vormt schijnbaar 't tweede $O_{\alpha\beta}$ serum waarbij de albumineoplossing voor A bloedlich. een titer $^1/_2$ ver-

TABEL 4.

Onderzochte sera	titer serum		titer globuline oploss.		titer albumine oploss.	
	α	β	α	β	α	β
$O_{\alpha\beta}$	$^1/_{192}$	$^1/_{16}$	$^1/_{192}$	$^1/_{16}$	0	0
B_α	$^1/_{12}$	—	$^1/_8$	—	0	—
A_β	—	$^1/_{32}$	—	$^1/_{24}$	—	0
A_β	—	$^1/_{48}$	—	$^1/_{32}$	—	0
$O_{\alpha\beta}$	$^1/_{256}$	$^1/_{64}$	$^1/_{192}$	$^1/_{48}$	$^1/_2$	0
$O_{\alpha\beta}$	$^1/_{12}$	$^1/_8$	$^1/_8$	$^1/_6$	0	0
B_α	$^1/_{36}$	—	$^1/_{36}$	—	0	—
A_β	—	$^1/_{48}$	—	$^1/_{48}$	—	0
$O_{\alpha\beta}$	$^1/_{192}$	$^1/_{48}$	$^1/_{128}$	$^1/_{36}$	0	0

toont. Ik zou dit willen verklaren, door aan te nemen, dat in dit serum niet alle globuline bij half verzadiging met ammoniumsulfaat is neergeslagen. Dit serum heeft een hoogen titer voor A bloedlich.; een geringe hoeveelheid globuline, die in 't filtraat is achter gebleven, is in staat een zwakke agglutinatie te veroorzaken.

Voor de B bloedlichaampjes, die minder sterk geagglutineerd worden, was de titer te gering om aangetoond te kunnen worden.

Deze veronderstelling vindt steun in het in § 8 vermelde onderzoek.

§ 6. De verdeeling der agglutininen over de verschillende globulinefracties.

1. Algemeene opmerkingen.

Gebleken is, dat de agglutininen uitsluitend aan die

eiwitfracties gebonden zijn, die bij halfverzadiging van 't serum met ammoniumsulfaat neerslaan.

Het is nu verder van belang na te gaan, of de verdeeling van het agglutinine over de verschillende globulinefracties gelijkmatig is of niet. Is dit niet 't geval, dan is hierin een uitgangspunt voor verdere zuivering gevonden.

Door de concentratie van 't ammoniumsulfaat trapsgewijs te laten stijgen, is 't mogelijk verschillende globulinefracties te verkrijgen. We kunnen deze fracties van elkaar afzonderen en bepalen hoeveel eiwit en hoeveel agglutinine in elke fractie aanwezig is.

Door eiwitgehalte en agglutininetiter graphisch voor te stellen kunnen we twee curven verkrijgen, een *eiwit-* en een *agglutinine-curve,* uit welker verhouding alle gegevens zijn af te lezen.

Alvorens aan de vermelding der proeven zelf te beginnen ga hier een beschrijving der werkwijze vooraf.

2. Beschrijving der werkwijze.

Aan 't serum werden zoodanige hoeveelheden van een geneutraliseerde verzadigde ammoniumsulfaatoplossing toegevoegd, dat het percentage verzadiging telkens met $6\,^1/_4$ % steeg. In 8 trappen wordt zoodoende een halve verzadiging bereikt. Dit getal van 8 trappen werd gekozen, omdat dit wel 't minimum aantal punten verschaft, waarmee een curve te construeeren is, daar men, zooals verder zal blijken, met deze 8 trappen 5 fracties verkrijgt. De globuline in meer fracties te verdeelen stuit op 't bezwaar, dat van menschenserum meest slechts geringe hoeveelheden ter beschikking stonden, zoodat de porties neergeslagen eiwit dan te klein werden.

't Serum werd, na met een gelijk volume aq. dest. gemengd te zijn, door toevoeging van $^1/_{15}$ volume verzadigd ammoniumsulfaatoplossing tot $^1/_{16}$ verzadigd. Na omschudden werd 't mengsel in een gesloten kolf weggezet tot den

volgenden dag. Deze tijd van inwerking bleek noodzakelijk, daar anders het aanvankelijk heldere filtraat later weer troebel werd, doordat nog steeds eiwit neersloeg. Het door de toevoeging van ammoniumsulfaat eventueel ontstane neerslag werd dus den volgenden dag afgefiltreerd en zoo vaak doorgeschonken tot een helder filtraat verkregen werd. 't Is vaak moeielijk een volkomen helder filtraat te verkrijgen; doch meestal gelukt dit tenslotte wel, vooral als 't serum-ammoniumsulfaat-mengsel lang genoeg gestaan heeft. 't Neerslag werd gewasschen met een verdunde ammoniumsulfaatoplossing van de sterkte, die dan bereikt is en daarna gedroogd op de wijze zooals in § 3 beschreven is en gedialyseerd. De hoeveelheid filtraat werd gemeten en hieraan weer zooveel ammoniumsulfaatoplossing toegevoegd, dat de verzadiging weer met 6 $^1/_4$ % steeg. Weer liet ik 't mengsel een nacht staan. 't Neerslag werd gewasschen, gedroogd en gedialyseerd enz. en 't proces zoo vervolgd tot halve verzadiging bereikt was.

Een enkele maal werd de bepaling nog iets verder voortgezet, zoodat ook het eiwit, dat bij $^9/_{16}$ en $^{10}/_{16}$ verzadiging neersloeg onderzocht werd. Men bereikt zoodoende de halve verzadiging in 8 trappen. In de eerste drie fracties slaat evenwel zoo weinig eiwit neer, dat hierover geen bepalingen zijn verricht. Er werden dus 5 eindfracties verkregen.

Nadat al het ammoniumsulfaat door dialyse verwijderd was, hetgeen na 5 tot 6 dagen het geval was, werden de oplossingen uit de dialysezakken genomen en van elke oplossing de hoeveelheid gemeten en het eiwitgehalte bepaald.

Daarna werden de oplossingen met keukenzout isotonisch gemaakt en met verdunde loog geneutraliseerd. Tenslotte werd de agglutinatietiter bepaald.

Men krijgt zoo dus een overzicht over de hoeveelheid eiwit in elke fractie aanwezig en de agglutininetiter. De

gevonden waarden werden na correctie in curve gebracht.

De oplossingen der globulinefracties werden onderzocht in de concentraties, zooals ze uit de dialysezakken kwamen. Ze werden meestal niet tot eenzelfde volume aangevuld om verdunning te vermijden. De agglutininetiter van de sera toch is niet hoog en zooals reeds hiervóór werd uiteengezet, is in sommige fracties de hoeveelheid eiwit reeds zóó gering, dat een zwakke agglutinatie bij verdunning niet meer aantoonbaar zou zijn.

Bij de berekening werd natuurlijk met de verschillende concentratie rekening gehouden.

De gebruikte methode om de globuline in verschillende fracties te scheiden is wel niet zeer nauwkeurig, maar alle bepalingen moesten met één betrekkelijk kleine portie serum geschieden. Toch is het resultaat voor het beoogde doel bruikbaar.

't Gaat er hier niet om een zoo juist mogelijke eiwitcurve van het serum te bepalen, maar uitsluitend om de verhouding tusschen eiwit en agglutinine. En waar de methode om de agglutininetiter te bepalen slechts grove verschillen van minstens 25 % aangeeft en de agglutininecurve dus slechts ruw te bepalen is, zou 't geen zin hebben voor deze onderzoekingen de eiwitcurve met de uiterste nauwkeurigheid vast te stellen.

3. De eiwitbepaling der fracties.

De eiwitbepaling der fracties geschiedde volgens de Kjeldahl-methode, die op het R. S. I. in eenigszins gewijzigden vorm wordt toegepast. Eigenlijk meet men hiermede het totaal stikstofgehalte. Door dit met 6.25 (een conventioneele factor) te vermenigvuldigen, verkrijgt men de *eiwitgehalten*.

De bepaling geschiedt als volgt:

In een Kjeldahl-kolf van 500 cc. wordt een schepje van een mengsel 97.5 % K_2SO_4 en 2.5 % $CuSO_4$ gebracht.

Hierbij wordt met een geijkte pipet 2,5 of 10 cc. van de te onderzoeken vloeistof gebracht, al naar de te verwachten hoeveelheid eiwit.

Daarna wordt er 20 cc. geconcentreerd H_2SO_4 bijgemengd. Na goed omschudden wordt de kolf verhit, totdat de organische stoffen geheel geoxydeerd zijn. Het kopersulfaat draagt de zuurstof over op de te oxydeeren stoffen en gaat daarbij van cupri- in cuproverbinding over. De cuproverbinding wordt weer door de zuurstof uit de lucht en het zwavelzuur tot cupriverbinding geoxydeerd.

Door de verhitting worden de stikstofhoudende organische stoffen ontleed, waarbij de stikstof steeds in den vorm van ammoniak vrij komt. Deze verbindt zich met het zwavelzuur tot ammoniumsulfaat. Het einde van dit proces kondigt zich aan, doordat de vloeistof helder wordt en een licht blauwgroene kleur aanneemt.

Nu laat men de vloeistof afkoelen en verdunt daarna met 250 cc. leidingwater, voegt eenige stukjes puimsteen toe, om regelmatig koken te verkrijgen, waarna met 50 à 60 cc. 50 % natronloog de vloeistof alkalisch wordt gemaakt en de ammoniak vrij komt. Door overdestilleeren vangt men deze op in een Erlenmeyerkolf, waarin zich bevindt een schepje boorzuur, 90 cc. gedestilleerd water en 5 druppels eener 0,5 % oplossing van broomkresolgroen in alcohol als indicator. Men destilleert ± 150 cc. over. De ammoniak wordt door het boorzuur volledig gebonden. De vloeistof wordt donkerblauw.

Hierna wordt getitreerd met 0,1 N. HCl oplossing, totdat de blauwe kleur in een lichtgroene tint overgaat.

Men kan het aan boorzuur gebonden ammoniak direct terugtitreeren, omdat ammoniumboraat zich weer gemakkelijk hydrolyseert.

De hoeveelheid van 't gebruikte boorzuur behoeft men niet te kennen, alleen moet er overmaat aanwezig zijn. Boorzuur geeft ook geen moeilijkheden bij 't omslaan van den indicator.

Een blanco proef, waarbij men van zuivere stikstofvrije glucose uitgaat, wordt op de bekende wijze in rekening gebracht.

De bepalingen worden steeds in duplo uitgevoerd en het gemiddelde als de juiste waarde aangenomen.

De hoeveelheid reststikstof (= niet-eiwitstikstof) werd niet in aanmerking genomen, daar de fout van ± $2^1/_2$ %, die dit geeft, binnen de foutengrens van de gevolgde methode ligt.

§ 7. De agglutininecurve bij paardeserum.

495 cc. paardeserum (p. 72) werd op bovenbeschreven wijze behandeld. De eerste drie fracties bevatten zóó weinig eiwit, dat dit niet werd bepaald. De uitkomsten der overige fracties zyn in tabel 5 vermeld.

TABEL 5.

Fractie's	Hoeveelheden oploss. na dialyseeren	Grammen eiwit per fractie	Agglutinine titer	% eiwit na correctie	% agglutinine na correctie
IV	134	2.00	0	4	0
V	130	16.50	$^1/_8$	38	65
VI	90	10.9	$^1/_2$	33	15
VII	35	2.4	0	9	0
VIII	12	0.5	0	2	0

Titer oorspronkelijke serum $^1/_4$. Eiwitgehalte 11 %.
(Dit bijzonder hooge eiwitgehalte is na herhaalde contrôle vastgesteld.)

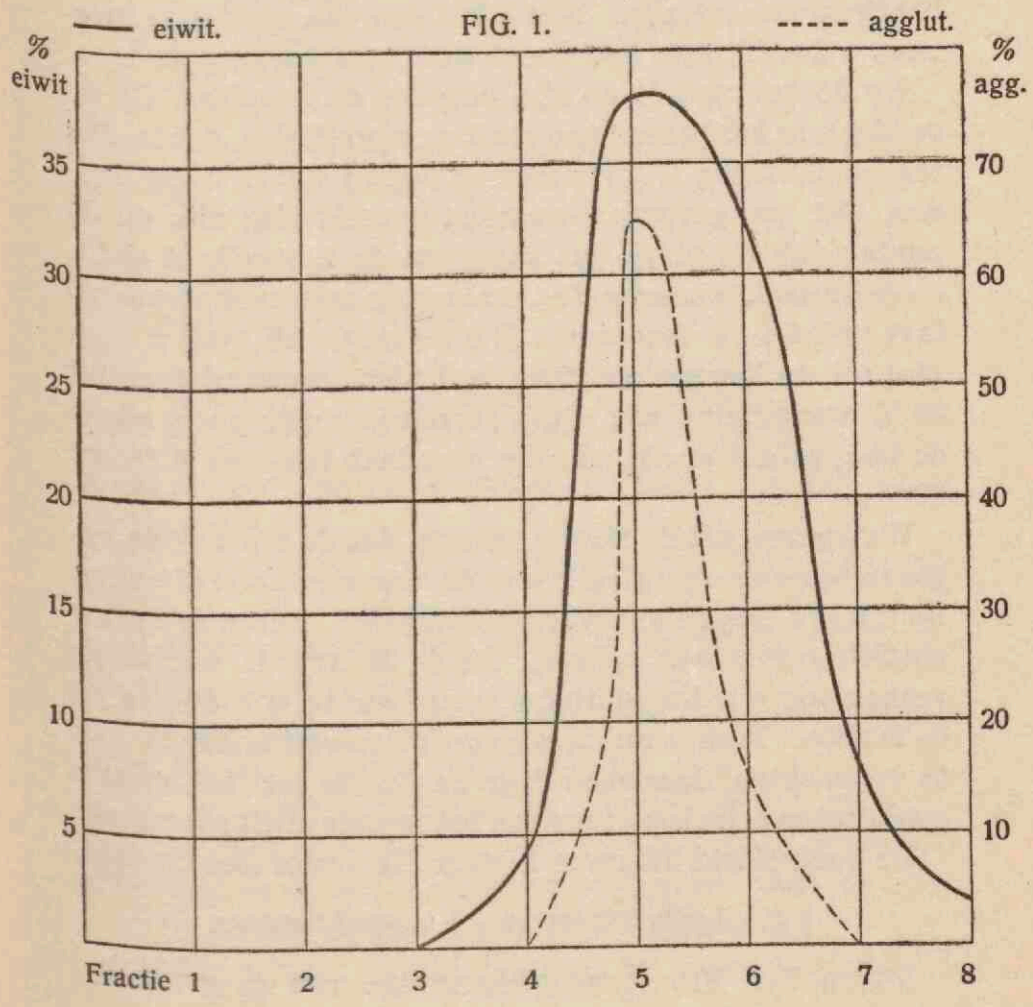
De tweede kolom van de tabel geeft aan de hoeveelheid oplossing van elke fractie, die na 't dialyseeren verkregen is.

De derde kolom 't aantal grammen eiwit in elke fractie aanwezig voor correctie.

De vierde kolom de agglutininetiter der oplossingen zooals ze uit den dialysezak kwamen (na zouttoevoeging tot 0,85 %).

De vijfde kolom het percentage eiwit, in elke fractie aanwezig, in percenten van het totaal eiwit van 't uitgangsproduct, na correctie.

De zesde kolom het percentage agglutinine van elke fractie in percenten van het totaal aanwezige agglutinine van 't uitgangsproduct.



Uit de tabel blijkt, dat het agglutinine uitsluitend in de 5e en 6e fractie gevonden is. Uit het verloop der curve (fig. 1) blijkt echter dat men hieruit in dit geval niet de conclusie mag trekken, dat de andere fracties geheel vrij van agglutinine zijn. De titer van dit serum is n.l. zóó laag, dat de hoeveelheid agglutinine in de 6e fractie aanwezig de geringste hoeveelheid is, die volgens de gevolgde methode aangetoond kan worden (titer $^1/_2$) en, waar uit 't verloop van de curve blijkt, dat eventueel in de 4e en 7e fractie aanwezig agglutinine een lageren titer zal hebben dan de 6e fractie, moet dit beneden de grens van aantoonbaarheid gelegen zijn. Met 't trekken van conclusies moeten we dus bij sera met lagen titer voorzichtig zijn.

Op de horizontale as zijn uitgezet de fracties. Op de verticale as het percentage eiwit en agglutinine, dat in elke fractie aanwezig is. We moeten hierbij wel in 't oog houden, dat de gevonden waarden gemiddelden zijn en de punten van de curve dus aangeven de hoeveelheid eiwit, die neerslaat, wanneer de verzadiging met ammoniumsulfaat met $6^1/_4$ % toeneemt. Dat de curve bij punt 8 bijv. niet tot de horizontale daalt, wil niet zeggen, dat er bij 50 % verzadiging nog eiwit neerslaat, maar geeft alleen de hoeveelheid eiwit aan, die neerslaat tusschen $43^3/_4$ en 50 %.

We kunnen uit de figuur aflezen, dat de top van de agglutininecurve samenvalt met de top van de eiwitcurve. De curve's loopen ongeveer evenwijdig. Alleen is de agglutininecurve wat spitser. In de 5e fractie schijnt de verhouding eiwit-agglutinine gunstiger te zijn dan in de 6e fractie. Toch is een zeer gunstige zuiveringsfactor niet te verwachten, daar men door de fractie met het meeste agglutinine te isoleeren meteen het meeste eiwit meeneemt.

De hoeveelheid albumine is voor dit serum niet bepaald.

§ 8. **Agglutininecurve bij menschenserum.**

Serum VI. 210 cc. menschenserum van de groep A

werd op dezelfde wijze behandeld als het paardeserum in de vorige paragraaf beschreven.

De uitkomsten van de verschillende bepalingen zijn in tabel 6 aangegeven.

Dit serum was afkomstig van een zwangere met tweelingen, lijdende aan hydramnion, bij wie wegens zwangerschapsintoxicatie venaesectie was verricht.

TABEL 6.

Fractie's	Hoeveelheden oploss. na dialyseeren	Grammen eiwit per fractie	Agglutinine titer	% eiwit na correctie	% agglutinine na correctie
IV	70 cc	0.53	1/4	4.3	4
V	100 „	1.09	1/16	9.9	24
VI	70 „	1.40	1/24	13.4	26
VII	70 „	0.82	1/24	8.6	28
VIII	70 „	0.22	1/8	2.4	10

Titer serum 1/32. Eiwitgehalte serum 5.9 %.

De hoeveelheid albumine in 't laatste filtraat is ook bepaald en bedroeg na omrekening 47.8 % van het totaal eiwitgehalte.

Het agglutinine blijkt in geen enkele fractie te ontbreken.

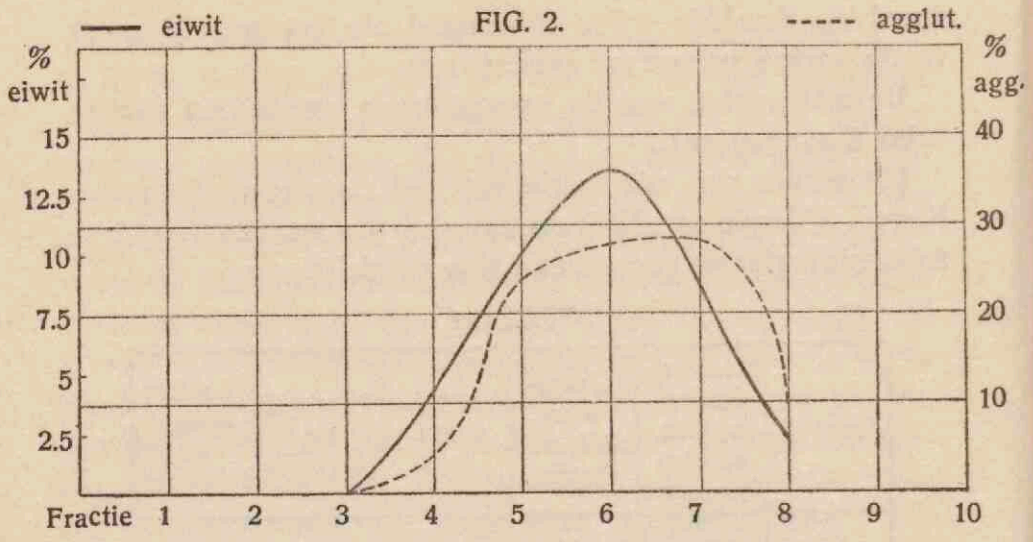
De eerste 3 fracties bevatten zoo weinig neerslag, dat dit niet werd bepaald.

Van het agglutinine is ongeveer 90 % teruggevonden, gebonden aan ongeveer 40 % van het eiwit.

Van het eiwit is in totaal na 't proces 86.4 % teruggevonden. Een betrekkelijk groot verlies, wat echter te begrijpen is na de vele manipulaties die ermee verricht zijn.

In fig. 2 zijn de gegevens in curve gebracht.

Een principieel verschil tusschen de verschillende eiwit-



fracties in hun verhouding tot het agglutinine doet zich niet voor.

Alle fracties bevatten agglutinine. In 't algemeen stijgt de titer met het eiwitgehalte.

De 7e en 8e fracties schijnen een iets gunstiger verhouding agglutinine-eiwit te hebben dan de overige. Dit verschil is echter bij de andere sera niet teruggevonden, zoodat er geen conclusie uit kan worden getrokken.

Isoleeren van de 7e en 8e fractie te zamen zou een wat gunstiger zuiveringsfactor opleveren dan isoleering van de geheele globulinefractie. Aan 11 % van het eiwit gebonden zou men dan echter met een opbrengst aan agglutinine van 38 % genoegen moeten nemen.

Terwijl bij isoleering der globulinefractie in zijn geheel aan 40 % van het eiwit 90 % agglutinine gebonden is.

Serum 194. Op dezelfde wijze werd gezuiverd 172 cc. van dit $O_{\alpha\beta}$-serum (194).

Dit was een normaal serum, dat reeds eenige weken had gestaan.

De gegevens van dit serum zijn in tabel 7 vermeld.

De 7e fractie vertoonde na het dialyseeren een neerslag, dat door NaCl-toevoeging tot 0.85 % en neutraliseeren

TABEL 7.

Fractie's	Hoeveelheid oploss. na dialyseeren	Grammen eiwit per fractie	Agglutinine titer		% eiwit na correctie	% Agglutinine	
			α	β		α	β
IV	41 cc	0.31	1/8	1/3	2.7	3	3
V	54	1.21	1/48	1/16	10.9	25	23
VI	75	1.18	1/32	1/12	12	26	26
VII	41	0.95	1/16	1/12	10.6	8	15
VIII	44	0.69	1/16	1/12	8.2	9	17

Eiwitgehalte oorspronkelijk serum 6.9 % titer α 1/64 β 1/24.

met verdunde loog niet geheel tot oplossing was te brengen. Dit heeft op de eiwitbepaling geen invloed, wel echter is te verwachten, dat hierdoor de agglutininetiter te laag gevonden is, hetgeen ook met het verloop van de curve overeenkomt.

De hoeveelheid albumine is niet bepaald. Ook niet of deze nog agglutinine bevatte. Misschien was het in dit verband wel van belang geweest.

In totaal is hier 70 % van het α- en 80 % van het β-agglutinine teruggevonden, gebonden aan 34 % van het eiwit.

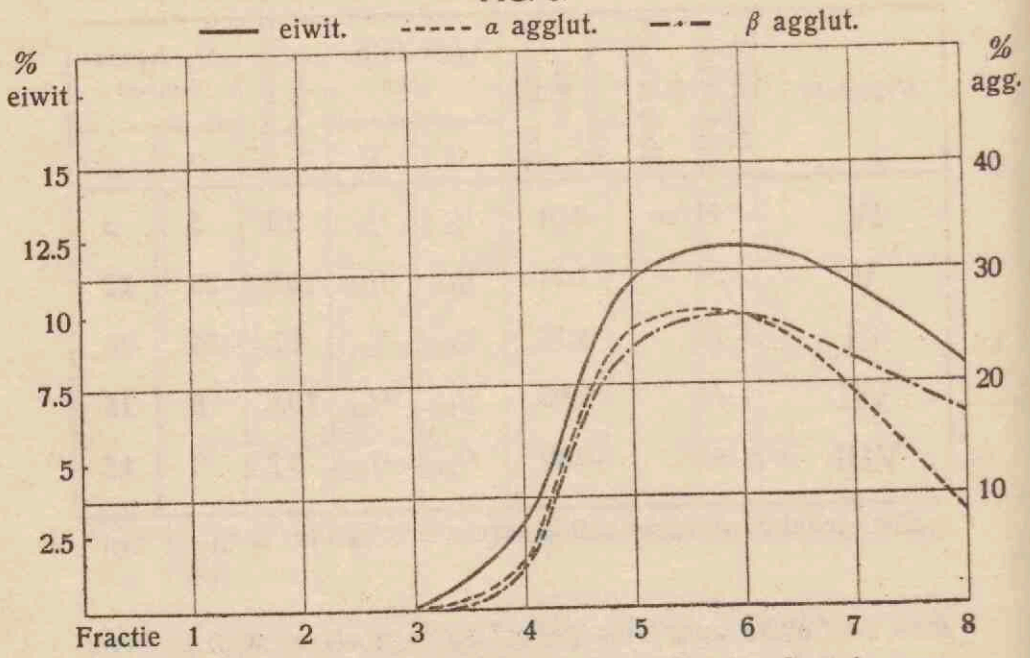
De curve van dit serum is in fig. 3 afgebeeld.

Daar het agglutininegehalte in de 7e fractie waarschijnlijk te laag is gevonden, is de curve doorgetrokken naar punt 8.

α- en β-agglutinine blijken op analoge wijze aan het eiwit gebonden te zijn. Het verschil in curve berust waarschijnlijk voor 't grootste deel op de onmogelijkheid nauwkeurige titerbepalingen te verrichten.

Ook hier bevatten alle eiwitfracties agglutinine.

FIG. 3.



De agglutininecurven blijken zelfs vrij nauwkeurig evenwijdig te loopen met de eiwitcurve.

Bij dit serum is dus van een splitsing van het globuline in fracties geen gunstiger zuiveringsfactor te verwachten. Men kan evengoed de globulinefractie in haar geheel isoleeren.

De gedaanten van de curven zijn iets afwijkend van wat we verwachtten.

De 8e fractie bevat naar verhouding meer eiwit en agglutinine, dan bij de overige sera. 't Maakt den indruk, dat niet al het globuline is neergeslagen.

Of de oorzaak hiervan aan een technische fout te wijten of in het serum zelf gelegen is, is niet gemakkelijk uit te maken.

Onmogelijk is het geenszins, dat de uitzoutingsgrenzen door een of andere omstandigheid verschoven zijn. Het uitzoutingsproces kan immers door velerlei factoren, als ouderdom van het serum, P_H, blootgesteld zijn aan bestraling enz. beinvloed worden.

Waar 't hier echter op aankomt is, dat de verhouding van eiwit en agglutinine een zoodanige is, dat van onderverdeeling der globuline in fracties geen gunstiger resultaat kan worden verwacht. En deze conclusie mag uit de curve wel getrokken worden.

Serum W. Een derde menschenserum, dat op dezelfde wijze gezuiverd werd, behoorde tot de A_β-groep en was afkomstig van een zwangere, bij wie wegens eclampsie venaesectie was verricht. 't Serum werd in verschen toestand onderzocht. De hoeveelheid was 200 cc.

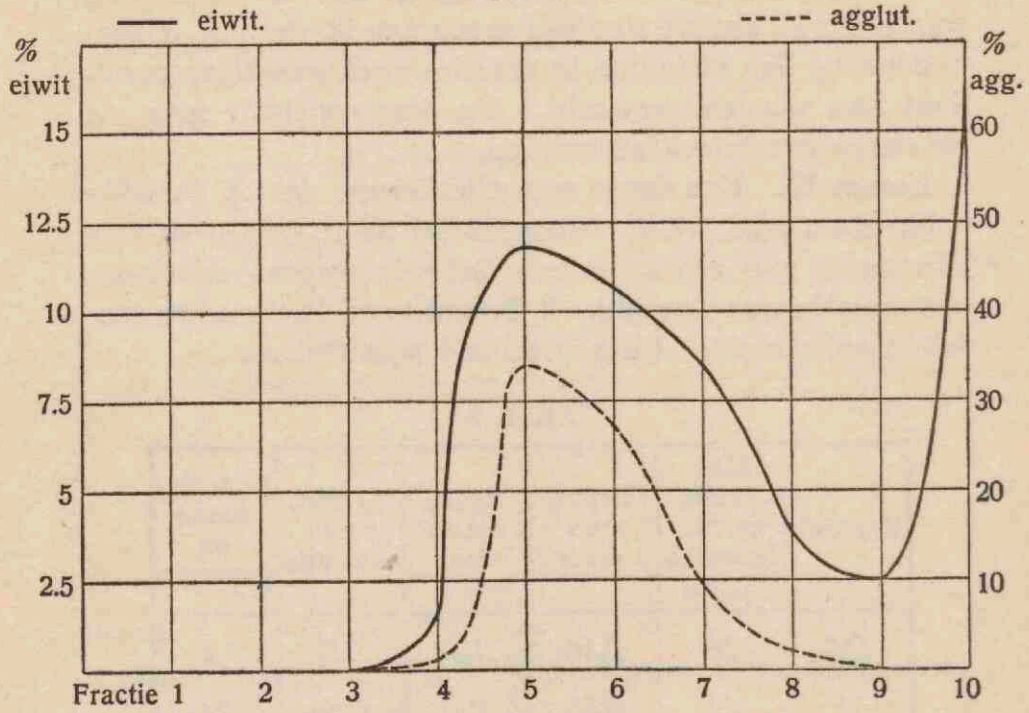
TABEL 8.

Fractie's	Hoeveelh. na dialyseeren in cc	Grammen eiwlt	Agglutinine titer	% eiwit na correctie	% agglutinine na correctie
IV	26	0.18	1/2	1.5	1
V	40	1.35	1/48	11.9	34
VI	42	1.07	1/32	9.8	27
VII	30	0.88	1/16	8.6	9
VIII	30	0.37	1/3	3.7	2
IX	25	0.24	0	2.5	0
X	75	1.52	0	16.6	0

Titer serum W. 1/16 eiwitgehalte 6.1 %

Dit serum werd na halfverzadiging met ammoniumsulfaat nog verder in fracties uitgezouten, eveneens met 6 1/4 % verzadiging opklimmend. De bedoeling was, na te gaan, of zich in de 9de fractie soms nog agglutinine bevond, dat in de totale hoeveelheid albumine niet kan worden aangetoond. 't Bleek echter, dat de 9de fractie, evenals de volgende, geen spoor agglutinatie vertoonde, ook niet microscopisch bekeken.

FIG. 4.



De curve van 't serum is in fig. 4 afgebeeld.

Bij punt 10 gaat de curve weer omhoog, wat 't neerslaan van de albumine aangeeft.

We zien weer, dat alle globulinefracties agglutinine bevatten en dat de agglutininecurve ongeveer evenwijdig loopt aan de eiwitcurve.

Na de zuivering is 73 % van het agglutinine gebonden aan 35 % van het eiwit teruggevonden.

Bij dit serum is in een afzonderlijk gedeelte nog bepaald het percentage globuline, dat het bevat.

't Serum had een eiwitgehalte van 6.1 % en bevatte 2.6 % globuline.

Bij het gefractioneerd uitzouten is in totaal gevonden (na correctie) 4.4 gram globuline. De 200 cc. serum bevatte 5.2 gram globuline. Dus is teruggevonden 85 % van het globuline. Het verlies is dus gelijk aan dat bij het eerste serum.

Overzien we de bereikte resultaten, dan kunnen we constateeren, dat van een onderverdeeling der globuline in fracties geen groot resultaat te verwachten is. Wel is waar is bij serum Vl. (fig. 2) in de 7e en 8e fractie een wat gunstiger verhouding tusschen eiwit en agglutinine gevonden, maar dit is bij de andere sera in 't geheel niet het geval.

Bij de sera 194 en W is van een onderverdeeling geen enkel resultaat te verwachten.

Het aantal onderzochte sera is slechts gering, maar de resultaten wijzen in dezelfde richting: *er is geen fractie aan te wijzen, waarbij veel agglutinine aan weinig eiwit gebonden is.*

Misschien is bij enkele sera van een verdeeling van het globuline in fracties een gunstiger zuiveringsfactor te verkrijgen. Dit is evenwel niet bij bepaalde fracties het geval en zal van te voren door een curvebepaling moeten worden uitgemaakt. In zoo'n geval is bovendien nog het verlies van agglutinine zeer groot; zeker grooter, dan door de verhooging van den zuiveringsfactor wordt gewettigd.

In vele gevallen zal zelfs bij 't bepalen van eiwit- en agglutininecurve nog geen gunstiger zuiveringsfactor kunnen worden bereikt.

Tusschen de binding van α- en β-agglutinine aan de verschillende fracties van het serumglobuline werd geen verschil gevonden.

Evenmin wees mijn onderzoek in de richting van een verschillend gedrag der agglutininen ten opzichte van eu- en pseudo-globuline. In de 4e en 5e fractie slaat dat deel van de globuline neer, dat men gewoonlijk euglobuline noemt.

De 6e, 7e en 8e fractie tezamen komen vrijwel overeen met wat men onder pseudo-globuline verstaat. De curve's geven geen aanleiding tusschen deze fracties verschil te maken.

§ 9. Splitsing van globuline in eu- en pseudo-globulinefractie.

Ter nadere bevestiging kunnen nog de volgende proeven dienen. Van een serum werd de globuline in 2 fracties gesplitst; één fractie werd verkregen bij $33^1/_3$ % verzadiging (euglobuline), de tweede fractie door 't filtraat van de eerste half te verzadigen met ammoniumsulfaat (pseudoglobuline).

De neerslagen werden gewasschen respectievelijk met $^1/_3$ en met halfverzadigde ammoniumsulfaat oplossing.

Na de neerslagen gedroogd en gedialyseerd te hebben, werden de oplossingen isotonisch gemaakt en geneutraliseerd met verdunde loog. Nu werd van beide fracties de titer bepaald en het eiwitgehalte.

Van 200 cc. A_β-serum, met een eiwitgehalte van 5.8 %, bevatte de eerste fractie 1.3 gram eiwit, d.i. 30 % van het teruggevonden globuline en 38 % van het agglutinine; de 2de fractie bevatte 3 gram eiwit, d.i. 70 % van het teruggevonden globuline en 62 % van het agglutinine.

Het albumine bevatte geen agglutinine.

Ook hier blijkt dus de verdeeling van het agglutinine over de eiwitten een regelmatige te zijn.

Een B_α serum werd op dezelfde wijze in fracties gescheiden. De oplossingen der fracties werden na het dialyseeren tot het oorspronkelijke serumvolume aangevuld en de titer, benevens die van 't serum, bepaald.

Van 70 cc, serum B_α, titer $^1/_8$ werd verkregen:

70 cc. fractie I titer $^1/_3$
70 cc. fractie II titer $^1/_2$
70 cc. albumineoploss. titer O.

De hoeveelheid eiwit werd niet bepaald.

Ook hier dus is agglutinine in beide fracties aanwezig en ongeveer in gelijke sterkte.

Het onderzoek van deze beide sera past dus goed bij de resultaten verkregen bij het in curve brengen van boven beschreven sera.

Onze *eindconclusie* kan dus luiden:

Bij het uitzouten door middel van ammoniumsulfaat wordt een vrijwel gelijkmatige verdeeling van 't agglutinine over de globulinefracties gevonden. Men kan dus bij de zuivering van bloedgroepensera volstaan met de geheele globulinefractie te isoleeren.

Daar menschenserum een globulinegehalte bevat schommelend om 35 %, zal men dus theoretisch een zuiveringsfactor kunnen verkrijgen van ongeveer 2 à 3. Rekening houdende met het verlies, dat niet te vermijden is, zal praktisch de zuiveringsfactor wel nooit boven de 2 stijgen.

Dit resultaat komt overeen met dat van onderzoekingen in 't R. S. I., verricht over serumzuivering van antitoxinehoudende sera met behulp van ammoniumsulfaat.

't Is echter niet uitgesloten, dat met andere methodes een gunstiger zuiveringsfactor is te bereiken.

§ 10. Enkele toepassingen van de serumzuivering.

De serumzuivering werd dus zóó toegepast, dat de globulinefractie in zijn geheel werd neergeslagen door bij 't serum een gelijk volume verzadigd ammoniumsulfaatoplossing te voegen, dit een nacht te laten staan en het neerslag af te filtreeren.

Het neerslag wordt gewasschen met half verzadigd ammoniumsulfaat, gedroogd en droog of in weinig aq. dest. opgelost, in dialysezakken gebracht en 2 dagen gedialyseerd. Langer dialyseeren is niet noodig, want een geringe hoeveelheid ammoniumsulfaat stoort de agglutinatie geheel niet. Na het dialyseeren wordt de oplossing isotonisch gemaakt en een te hooge zuurgraad opgeheven. Deze globulineoplossing is het gezuiverde serum.

De titer van het gezuiverde serum werd vergeleken met dien van het oorspronkelijke.

		gezuiverde serum	toename titer	zuiverings-factor
Serum $O_{\alpha\beta}$				
Titer α	$^1/_{192}$	$^1/_{288}$	$1^1/_2 \times$	—
β	$^1/_{16}$	$^1/_{24}$	$1^1/_2 \times$	
Serum A_β				
Titer $^1/_{16}$		$^1/_{32}$	$2 \times$	1.5
Serum A_β				
Titer $^1/_{16}$		$^1/_{32}$	$2 \times$	1.6

Verder zij nog verwezen naar de in § 4 beschreven paardesera.

Regelmatig kan dus uit een serum een gezuiverd product met 2 × hooger titer worden bereid, hoewel dit ten deele bereikt is, doordat het gezuiverde serum wat hooger eiwitgehalte heeft dan het ongezuiverde.

De zuiveringsfactor is n.l. slechts ongeveer 1.5.

§ 11. **Eigenschappen der globulineoplossingen** („gezuiverde sera").

De globulineoplossingen gedragen zich, wat den aard van hun agglutineerend vermogen betreft, volkomen als de oorspronkelijke sera. De groepspecificiteit blijft, zooals bij vele proefnemingen bleek, volkomen behouden.

Een globulineoplossing bereid uit een A_β serum agglutineert slechts B en AB bloedlich., een globulineoplossing uit een B_α serum, slechts A en AB bloedlich. enz. Bij een gezuiverd $O_{\alpha\beta}$ serum blijft de verhouding tusschen de α- en β agglutinine gelijk aan die in het oorspronkelijk serum.

Bij een globulineoplossing, die een 2 × hooger titer heeft, dan het oorspronkelijke serum, zien we de agglutinatie in de onverdunde oplossing ook sneller optreden, dan in het serum.

Wat de duurzaamheid der globulineoplossingen betreft, daarover heb ik geen systematisch onderzoek verricht. Bij enkele terloops verrichte bepalingen kreeg ik den indruk,

dat de duurzaamheid wisselend is, evenals dat bij de onbehandelde sera kan worden waargenomen.

Sommige globulineoplossingen blijven maandenlang goed. Bij andere neemt de titer na eenige weken af. Waarschijnlijk zijn de globulineoplossingen niet duurzamer dan de uitgangssera; eerder wat minder goed houdbaar.

De globulineoplossingen werden bewaard met chloroform als conserveermiddel, daar dit mij bij het bewaren van sera goed voldaan had. De voor- en nadeelen hieraan verbonden zijn reeds in Hoofdstuk I § 3 besproken, zoodat met verwijzing daarnaar kan worden volstaan.

HOOFDSTUK III.

Immuniseeringsproeven.

§ 1. Literatuuroverzicht.

1. Algemeene opmerkingen.

Nadat uit de onderzoekingen over gefractioneerd uitzouten van serum door middel van ammoniumsulfaat gebleken was, dat hiermede in 't algemeen niet meer dan een tweemalige concentratie is te bereiken, werd getracht langs een geheel anderen weg tot groepspecifiek-agglutineerende sera met hoogen titer te komen en wel langs dien van immuniseering van geschikte diersoorten. Het is gebleken, dat door bijv. konijnen in te spuiten met bloedlichaampjes groepspecifieke agglutininen ontstaan. Wel is waar zijn in konijneserum vrijwel steeds soortspecifieke agglutininen aanwezig, d. w. z. agglutininen die menschenbloedlichaampjes onafhankelijk van de groep waartoe ze behooren agglutineeren en hiervan kan de titer door de immuniseering stijgen. Deze soortspecifieke agglutininen zijn echter gemakkelijk te verwijderen door het konijneserum met O bloedlichaampjes samen te brengen, waardoor alle soortspecifieke agglutininen verwijderd worden. De eventueel aanwezige groepspecifieke agglutininen blijven in het serum achter.

Behalve met bloedlichaampjes als antigeen is 't met tal van andere substanties gelukt groepspecifieke immuun-

agglutininen bij proefdieren op te wekken, zooals met extracten uit bloedlichaampjes, lichaamsvochten als serum en speeksel.

We zullen de belangrijkste pogingen afzonderlijk bespreken.

2. Immuniseering met intacte bloedlichaampjes.

v. Dungern en Hirszfeld (28) hebben bij honden in enkele gevallen min of meer groepspecifieke agglutininen verkregen.

De eersten, wien 't overtuigend gelukt is zuiver groepspecifieke immuunsera te verkrijgen, waren Hooker en Anderson (29). Van vijf met A-bloedlichaampjes ingespoten konijnen reageerde één met de vorming van groepspecifieke anti-A-agglutininen, de andere alleen met stijging van de soortspecifieke agglutininen.

Van 3 met B-bloedlich. ingespoten konijnen, gaf eveneens één konijn een positief resultaat.

Van 3 met AB bloedlich. ingespoten konijnen gaven twee een positief resultaat.

In totaal gaven dus van 11 konijnen, 4 een positief en 7 een negatief resultaat.

Ook voor de O groep meenden zij het bestaan van een groepspecifiek hetero-agglutinine gevonden te hebben. Dit schijnt tegen het schema van Landsteiner te pleiten. Men bedenke evenwel, dat dit schema, volgens welk O bloedlich. geen groepspecifiek antigeen zouden bevatten, opgesteld is voor de verhoudingen, zooals die tusschen menschenbloedlich. en -serum bestaan, dus voor iso- en niet voor hetero-agglutininen.

Kolmer en Trist (30) verkregen bij hun pogingen om bij konijnen groepspecifieke agglutininen te verkrijgen slechts negatieve resultaten, waarschijnlijk tengevolge van een foutieve techniek.

Zij absorbeerden n.l. ter verwijdering van de soortspe-

cifieke agglutininen, in plaats van uitsluitend met O roode bloedlichaampjes, met een mengsel van de bloedlich. der 3 overige bloedgroepen, waardoor dus niet alleen de soortspecifieke, maar ook de groepspecifieke agglutininen verwijderd worden.

Kirihara (31) verkreeg eveneens een vrijwel negatief resultaat.

Amzel, Halber en Hirszfeld (32) hebben in enkele gevallen bij konijnen met inspuiten van A en B bloedlich. succes gehad. Zij deelen mede, dat het echter maar zelden gelukt.

Ook Schiff en Adelsberger (33), Landsteiner, van der Scheer en Witt (34), Hirszfeld, Thomsen en anderen is het gelukt anti-A-immuun-sera te verkrijgen. Anti-B-immuun-agglutininen schijnen niet zoo gemakkelijk bij konijnen te ontstaan.

Mogelijk zijn andere diersoorten hiervoor beter geschikt. 't Is namelijk gebleken, dat de lichaams- en bloedcellen der konijnen een factor der B-stof (hiermee wordt bedoeld het agglutinogeen dat in de bloedlich. der B groep voorkomt) bevatten, waardoor deze niet als antigeen voor het konijn fungeert.

Het anti B-serum dat men door immuniseering bij 't konijn verkrijgt, bevat waarschijnlijk een anti-stof tegen dien factor der B-stof, die niet in 't lichaam van 't konijn voorkomt, [Friedenreich en With (35)].

Ook A-stof schijnt nog al eens bij konijnen voor te komen, niet zoozeer in de bloedlich. [Hara (36)] als wel in de organen en in 't serum [Witebsky (37), Mai (38)]. Misschien is hierin een der oorzaken te zoeken voor de individueel verschillende geschiktheid van konijnen anti-A-agglutinine te vormen.

Aanwezigheid van anti-A-agglutinine in 't konijneserum kan erop duiden, dat het dier de A-stof in zijn organen mist [Dölter (39), Witebsky (37), Hara (36)]. Ook komt het echter voor, dat konijnen, die geen anti-A-

agglutinine in 't serum herbergen, toch goede anti-A-sera geven.

Hoewel 't eenigszins buiten het verband valt, wil ik hier nog even de aandacht vestigen op de mogelijkheid uitsluitend tegen de A (en AB) groep een groepspecifiek agglutineerend serum te verkrijgen door injecties van schapenbloedlich. bij konijnen.

Schiff en Adelsberger (33) hebben aangetoond, dat er verwantschap bestaat tusschen A en AB bloedlich. van menschen en schapenbloedlich. Dit berust op de aanwezigheid van een factor van 't heterogenetisch antigeen (Forssman antigeen) in A en AB bloedlich.

Deze schapenbloed-immuun-sera zijn volgens Sachs en Dölter zeer goed bruikbaar om de A-stof aan te toonen.

3. Immuniseering met extracten uit bloedlichaampjes.

Men heeft getracht de antigenen uit de bloedlich. te extraheeren, om deze zoo in zuiverder vorm te verkrijgen. Ze zijn aanwezig in het stroma der bloedlichaampjes (Bordet, Nolf, Ottensooser).

De haemoglobine speelt bij deze processen geen rol.

Aanvankelijk heeft men 't geprobeerd met:

a. Alcoholische extracten.

Bang en Forssman (40) hebben door injectie van alcoholextract van erythrocyten, soortspecifieke haemolyseerende immuun-sera verkregen. Zij concludeerden, dat de lipoiden van de bloedlich. dus de dragers van de antigeenfuncties zijn.

Dit wordt echter niet door allen aanvaard, daar het extract zwak werkt in vergelijking met de intacte bloedlich. en er bovendien na de extractie in de rest een groot deel der antigeeneigenschappen achter blijft.

Daar bovendien de actieve substantie uit het extract

niet geisoleerd is in zuiveren toestand, moet de benaming lipoiden voor de antigeenfactor een voorloopige zijn.

Landsteiner en Van der Scheer (41) uitgaande van Landsteiner's theorie over het Forssman-antigeen, dat dit n.l. een complex antigeen zou zijn, bestaande uit *hapteen* (een substantie die wel specifiek bindend vermogen heeft, maar geen of zwak immuniseerend vermogen „half antigeen" en eerst verbonden met proteine tot een „vol-antigeen" wordt) en een proteine, kennen aan de stof in het alcoholisch extract hapteenkarakter toe. Zij hebben door injectie van alcoholisch extract + varkensserum (als „Schlepper") sera verkregen met matig soortspecifiek agglutineerend en haemolyseerend vermogen. Hun conclusie is, dat deze sera verschillen van die verkregen door inspuiting met bloedlich. zelf.

Wat *groep*specifieke antigenen betreft hebben Schiff en Adelsberger (33) in alcohol-extract van A bloedlich. een deel der A stof aangetoond, dat zij A I noemen en wat identiek zou zijn met een factor van het Forssman-antigeen, dat in schapebloedlich. voor zou komen.

Dölter heeft dit bevestigd. Volgens hem zou ook een deel der B stof in alcohol oplosbaar zijn, daar het met B-antiserum komplementbindingsreactie geeft. Dit staat evenwel nog niet vast.

Men heeft nu deze alcoholische extracten, gecombineerd met een soortvreemd eiwit (varkensserum) als „Schlepper" om 't hapteen tot vol-antigeen te maken, bij dieren ingespoten (Witebsky (37), Dölter (39) en anderen).

Deze pogingen hebben tot resultaat gehad, dat de zoo verkregen konijnen-immuunsera zich in belangrijke opzichten van normale iso-sera onderscheiden. Ze geven n.l. wel groepspecifieke vlokkings- en komplementbindingsreacties met de alcoholische extracten, maar geen of slechts zeer zelden agglutinaties met de betreffende roode bloedlichamen.

Deze weg belooft dus niet veel resultaat. Bovendien

heeft Kamada (42) aangetoond, dat waterig extract van de rest, die na extractie met alcohol overblijft, in staat is rijkelijke productie van haemolysine te geven.

Tevens is volgens Schiff een dergelijk extract in staat groepspecifiek haemolysine en komplement te binden. Door alcoholextractie, gewoonlijk, hoewel niet volkomen juist, „lipoidextractie" genoemd, worden dus geenszins de antigenen uit de bloedlich. verwijderd.

Het was dus van belang primair waterige extracten uit de bloedlich. of stromata te onderzoeken.

Deze hebben inderdaad betere resultaten opgeleverd.

b. Waterige extracten.

Schütz en Wöhlisch (23) hebben aangetoond, dat door bloedlich. herhaaldelijk te wasschen met phys. NaCl, deze van hun groepspecifieke eigenschappen kunnen worden beroofd.

In 't waschwater kan dan groepspecifieke stof worden aangetoond door het specifiek bindend vermogen.

Hallauer (44) kon dit geheel bevestigen. Tevens is 't hem gelukt door het waschwater bij konijnen in te spuiten groepspecifiek agglutineerende immuunsera te verkrijgen. Hierbij steeg de titer voor soortspecifieke agglutinine slechts weinig.

Ook anti B-sera bleken zeer goed verkrijgbaar te zijn.

Davidsohn (45) bevestigde de onderzoekingen van Hallauer, wat de uitwaschbaarheid van de groepstof betreft

Gedda en Pecorella (46), Plattner en Hintner (47) evenwel kwamen tot een tegenovergesteld resultaat. Ook Hamburger (48) gelukte het niet de groepstof uit te wasschen.

Hallauer (49) wijst er echter op, dat de uitwaschbaarheid meestal slechts partieel is en men dus de agglutinabiliteit quantitatief moet nagaan en niet zooals Gedda, Pecorella, Plattner en Hintner gedaan hebben, slechts microscopisch waarnemen of er agglutinatie optreedt of niet.

Plattner en Hintner (47) bevestigen het bindend ver-

mogen van het waschwater. Zij meenen echter, dat dit aan stromabrokstukken is toe te schrijven. Door sterk centrifugeeren van 't waschwater bleek n.l. een sediment op te treden, dat uit stromabrokstukken bestond en na verwijdering hiervan was 't bindend vermogen „zoo goed als geheel" verdwenen.

Hallauer heeft evenwel aangetoond, dat electief groepstof in 't waschwater overgaat.

Soortspecifieke AI stof en, volgens Davidsohn, ook koude-agglutinine worden niet uitgewasschen.

Ook bleek bij AB bloedlich. de B-stof eerder uitwaschbaar dan de A-stof en zoo eenigermate van de A-stof te scheiden te zijn, hetgeen Davidsohn bevestigt. Dit is niet te rijmen met stromadeeltjes.

Vreemd is evenwel, dat pogingen om de verarming der uitgewasschen bloedlichaampjes aan groepstof, door hun verminderd absorptievermogen ten opzichte van een bepaalde hoeveelheid serum aan te toonen, mislukten. De voor volkomen neutralisatie van 0.5 cc. serum benoodigde hoeveelheid erythrocyten was voor gewasschen en ongewasschen bloedlich. nagenoeg gelijk.

Ottensooser en Zurukzoglu (50) hebben dit eveneens gevonden. Zij nemen daarom aan dat „agglutinabele" en „bindende groepstof" niet identiek zijn.

In later gepubliceerde onderzoekingen houden Ottensooser en Lenzinger (51) aan deze opvatting vast, ondanks de kritiek erop geoefend door Hallauer e.a.

Daar het vaak moeilijk is de groepstof uit te wasschen, heeft Hallauer getracht met extracten uit bloedlich. volgens Dold en Rosenberg (52) 't zelfde doel te bereiken.

Hallauer kon groepstof in het extract aantoonen en door inspuiting groepspecifieke agglutininen en praecipitinen verkrijgen.

Plattner en Hintner verkregen een extract uit stromata, die met kwartszand verwreven werden, met sterk groepspecifiek bindingsvermogen voor agglutininen.

Ottensooser (53) verkreeg door extractie van gezuiverde stromata met sterk verdunde alcali volgens v. Euler en Brunius (54) de groepstof in oplossing.

Door Schiff (55) is verband gelegd tusschen het in alcohol oplosbare en het in water oplosbare deel van het lysinogeen van schapebloed door aan te toonen, dat de lipoïdevorm in de in water oplosbare vorm kan overgaan.

Uit het bovenstaande blijkt wel, dat de groepstof of althans een belangrijke fractie ervan in water oplosbaar is en in waterige extracten van erythrocyten over gaat.

Ook uit andere orgaancellen, die zooals gebleken is uit onderzoekingen van Witebsky en Okabe (56), Kritschewsky en Schwarzmann e.a. (57), de groepstof bevatten, gelukt het door uitwasschen de groepstof te isoleeren, zooals Schwarzmann en Joukoff-Werejnikoff (58) aangetoond hebben.

4. Immuniseering met lichaamsvochten.

Behalve in de cellen is de groepstof ook aanwezig in verschillende lichaamsvloeistoffen als bloedserum, speeksel, maagsap, gal, melk, urine etc. De A groepstof speciaal is in het dierenrijk zeer verbreid.

Door Brahn, Schiff en Weinmann (59) is zij geisoleerd uit pepsine. Zij gingen daarbij uit van het feit, dat maagsap en ook de maag zelf rijk is aan groepstof. Bepaalde handelspreparaten uit *dieren*maag (bijv. pepsine) geven nog in hooge verdunningen de A reactie.

Door verschillende onderzoekingen is aangetoond, dat dit de groepspecifieke A reactie is. Uit pepsine hebben zij een zeer werkzaam preparaat geisoleerd, dat geen eiwit, geen lipoid en geen koolhydraat is, wel bevat het stikstof en geeft pentose-reacties.

Ook pepton bevat vaak groepstof. Ottensooser (60) vond in aansluiting op de onderzoekingen van Brahn, Schiff en Weinmann, dat Martinbouillon bereid met varkensmaag rijkelijk A stof bevat.

Ook in diphterietoxine en vooral in anatoxine Ramon vond hij belangrijke hoeveelheden A-stof.

Brahn en Schiff (61) geven aan, dat men door immuniseering met A en B speeksel specifieke anti-A- respectievelijk anti-B sera kan bereiden.

Ook Lehrs (62) zou met A en B speeksel groepspecifieke anti-A respect. anti-B sera verkregen hebben. Hij spoot zijn konijnen 2 cc. gecentrifugeerd speeksel in de oorvenen om de 3—4 dagen.

In totaal gaf hij 4 tot 8 injecties.

Opmerkelijk is, dat *alle konijnen,* met B speeksel ingespoten, reageerden met de vorming van groepspecifieke anti-B-agglutininen. Lehrs verklaart dit doordat speeksel in vergelijking met bloedlichaampjes weinig begeleidende stoffen bevat, en wijt de slechte resultaten bij injectie van de intacte bloedlichaampjes aan „Konkurrenz der Antigene". Volgens hem zou zijn resultaat erop wijzen, dat de individualiteit van het konijn niet zoo'n grooten invloed heeft als meestal wordt aangenomen.

Eigen onderzoek

§ 2. Proeven ter verkrijging van een groepspecifiek waterig extract van bloedlichaampjes.

1. Pogingen de groepstof uit te wasschen.

Na eenige oriënteerende onderzoekingen bleek het mij zeer moeilijk de groepstof uit te wasschen. 50 cc. versch gedefibrineerd bloed der B-groep werd gecentrifugeerd, de bovenstaande vloeistof afgeschonken, de bloedlichaampjes met physiol. NaCl oplossing opgeschud en weer gecentrifugeerd. Het waschwater werd afgeschonken en met sulfosalicylzuur op eiwit onderzocht. Dit proces werd zoolang herhaald tot de eiwitreactie negatief was, hetgeen na 3 tot 4 wasschingen meestal het geval bleek.

Daarna werden de zoo van plasma bevrijde bloedlich.

in 20 cc. 0.85 % NaCl oplossing gesuspendeerd en 2 uur in een schud-apparaat geschud bij kamertemperatuur. Toen werd gecentrifugeerd en het schud-waschwater afgeschonken. Na de bijvoeging van nieuw physiol. NaCl oplossing werd weer 2 uur geschud. Dit werd herhaald.

Telkens na 2 wasschingen werd de sterkste serumverdunning bepaald, waarin de bloedlich. nog juist geagglutineerd werden. Vóór 't wasschen werden ze nog juist door een 64-malige verdunning van een A-serum geagglutineerd; na de 10de schud-wassching nog door dezelfde verdunning.

Hierna trad door 't schudden zoodanige haemolyse op, dat de proef werd gestaakt.

Twee verschillende soorten A bloedlich. (367 en 668) vertoonden evenmin na 10 maal gewasschen te zijn een merkbare afname der agglutinabiliteit. De haemolyse werd dan zeer sterk.

Daar langs dezen weg de extractie der groepstof dus op groote moeilykheden bleek te stuiten, werd beproefd of de extractie volgens Dold-Rosenberg, waartoe ook Hallauer overgegaan was, meer kans op succes bood.

2. Extract volgens Dold en Rosenberg.

Een versche bloedkoek werd geschud met physiol. NaCl oplossing en de zoo verkregen bloedlich. suspensie 3 tot 4 maal gewasschen, tot de eiwitreactie negatief was. De waschvloeistof werd dan zooveel mogelijk afgepipetteerd en de bloedlich. met een 20-voudige hoeveelheid steriel aq. dest. een kwartier omgeroerd, waardoor haemolyse optrad. Daarna werd vast NaCl toegevoegd tot 0.85 % (de kleine hoeveelheid phys. NaCl oplossing, die nog in 't sediment aanwezig was, werd verwaarloosd). Hierdoor wordt het afcentrifugeeren der stromata zeer bevorderd.

Daarna werd sterk gecentrifugeerd, de bovenstaande haemoglobinehoudende vloeistof afgepipetteerd en de stromata in physiol. NaCl oplossing gesuspendeerd en

15 uur bij- 8 tot- 10° C. in de ijskast gezet. Den volgenden dag werd deze bevroren suspensie in een waterbad bij 50° C. snel ontdooid en de stromata afgecentrifugeerd. Hiervoor is krachtig centrifugeeren noodzakelijk.

De bovenstaande vloeistof, die licht rood gekleurd is, is het extract.

Men verkrijgt zoo een licht troebel extract, dat in staat is krachtig specifiek het overeenkomstige agglutinine te binden, hetgeen blijkt uit de volgende waarnemingen.

Een B_a (anti A)-serum werd verdund respectievelijk met phys. NaCl oplossing en A-extract op de in de tabel aangegeven wijze. Na een half uur serum en extract op elkaar te hebben laten inwerken werd nu het agglutineerend vermogen voor A bloedlich. bepaald van het met extract verdunde serum in vergelijking met het met physiol. NaCl verdunde serum.

TABEL 9.

buisje	serum B_a	phys. NaCl	Agglut. van A bll.	serum B_a	extract A_1	Agglut. van A bll.
I	5 druppels	+ 1 dr.	+++	5 druppels	+ 1 dr.	(+)
II	4 „	+ 2 „	++	4 „	+ 2 „	—
III	3 „	+ 3 „	+	3 „	+ 3 „	—
IV	2 „	+ 4 „	+	2 „	+ 4 „	—
V	1 „	+ 5 „	(+)	1 „	+ 5 „	—

Hiertoe werd een druppel uit elk buisje op een objectglaasje gebrpacht en een druppel erythrocytensuspensie A toegevoegd, 10 min. geschommeld en afgelezen.

We zien dus dat 2 druppels extract in staat zijn al het agglutinine uit 4 druppels van dit serum B_a te binden.

Dat deze werking zuiver groepspecifiek is blijkt hieruit, dat het agglutineerend vermogen van een A_β (anti B)

serum in 't geheel niet door het extract verminderd wordt.

TABEL 10.

buisje	serum A_β	phys. NaCl	Agglut. van B bll.	serum A_β	extract A_1	Agglut. van B bll.
I	5 drupp.	+ 1 dr.	++++	5 drupp.	+ 1 dr.	++++
II	4 „	+ 2 „	++++	4 „	+ 2 „	++++
III	3 „	+ 3 „	+++	3 „	+ 3 „	+++
IV	1 „	+ 4 „	+++	2 „	+ 4 „	+++
V	1 „	+ 5 „	++	1 „	+ 5 „	++
VI	1 „	+ 11 „	+	1 „	+11 „	+
VII	1 „	+ 23 „	(+)	1 „	+23 „	(+)

De agglutinatie van B bloedlich. is in het met A extract verdunde serum A_β even sterk, als in het met physiol NaCl oplossing verdunde serum. Op de agglutinatie voor de B bloedlich. heeft A-extract dus geen invloed.

Hieruit blijkt dus, dat uitsluitend het agglutinine α gebonden wordt door het A-extract.

Deze specifiek bindende werking blijkt ook hieruit, dat in een $O_{\alpha\beta}$ serum met een juiste hoeveelheid A-extract het α agglutinine geheel gebonden kan worden, zoodat alleen het β agglutinine overblijft en het serum zich als een A_β serum gedraagt.

Uit het bovenstaande blijkt dus, dat het A-extract een stof bevat, die in staat is specifiek het α agglutinine te binden, wat dus het agglutinogeen A of althans een factor ervan moet zijn.

Bekijken we zoo 'n A-extract onder de microscoop, dan blijkt het nog vele brokstukken van stromata te bevatten. Men zou kunnen meenen, dat deze de dragers zijn van het

specifiek bindend vermogen van het extract, zooals Ottensooser en anderen ook beweerd hebben.

Hiertegen pleit echter dat, als men zoo'n A-extract filtreert door een Chamberlandkaars, waarna een glasheldere vloeistof verkregen wordt, waarin microscopisch niets meer te zien is, de bindende werking van het extract quantitatief onveranderd gebleven is. We moeten dus wel aannemen, dat deze werking niet zetelt in de stromata, maar in de vloeistof zelve.

Een B-extract gedraagt zich op analoge wijze. 't Verzwakt specifiek de werking van het β agglutinine.

Twaalf A-extracten en twee B-extracten op boven aangegeven wijze bereid, reageerden op dezelfde wijze. Het gelukt vrijwel steeds een goed werkzaam extract te krijgen. Een enkele maal bleek, dat na het wasschen en haemolyseeren (dus vóór 't bevriezen) de stromata een groot gedeelte van hun agglutinogeen verloren hadden, zoodat ze in 't overeenkomstig serum niet duidelijk geagglutineerd werden. Hier was dus de groepstof „uitgewasschen". Werd dan toch nog getracht hieruit een extract te maken, dan vertoonde dit slechts een zeer zwakke werking.

§ 3. Immuniseering van konijnen met A-extract.

Nadat aldus de aanwezigheid van agglutinogeen in de extracten vastgesteld was, werd getracht konijnen ermee te immuniseeren op de wijze zooals Hallauer die aangegeven heeft (44).

Van de konijnen werd eerst eenig bloed afgetapt om de vóór de proef in 't konijneserum aanwezige agglutinine quantitatief te bepalen. Daarna kregen ze 4 intraveneuse injecties van 2 cc. telkens met 4 dagen tusschenruimte. Acht dagen na de laatste injectie werd weer bloed afgenomen en de agglutininetiter t.o.v. A, B en O bloedlich. bepaald.

De A-extracten werden gedurende de proef in de ijskast bewaard en bleken na de laatste injectie nog goed werkzaam.

De geringe hoeveelheid haemoglobine in 't extract aanwezig, kan 't resultaat niet beinvloeden, daar gebleken is, dat de antigenen der bloedlich. in het stroma aanwezig zijn en 't haemoglobine slechts een geringe antigeenfunctie bezit. Haemoglobine-antisera zijn niet in staat bloedlich. te agglutineeren of te haemolyseeren, zooals in 1929 nog door Yasui (63) is aangetoond.

TABEL 11.

Konijnen	ingespoten met extract	Chamberland L_1	titer vóór de proef t.o.v. bl.lich.			titer na de inj. t.o.v. bloedlich.			na absorptie met O bloedlich. titer t.o.v. bloedlich.		
			A	B	O	A	B	O	A	B	O
75 g	A_3	gefiltreerd	1/2	1/2	1/2	1/32	1/8	1/32	1/2	0	0
74 g	A_6	„	1/4	1/2	1/2	1/64	1/64	1/64	1/2	1/2	1/2
385 f	A_7	niet gefiltr.	niet bepaald			1/256	1/512	1/256	1/16	1/8	1/8
151 g	A_{11}	gefiltreerd	1/8	1/4	1/4	1/1024	1/8	1/16	1/1024	1/2	1/4
98 g	A_{11}	„	1/8	1/8	1/4	1/2048	1/8	1/8	1/1024	0	1/2
132 g	A_{11}	„	1/2	1/2	1/2	1/1024	1/4	1/2	1/1024	0	0
134 g	A_{11}	„	1/32	1/8	1/8	1/512	1/8	1/8	1/512	1/2	1/2

Ter vergelijking waren tegelijk met de konijnen 151 g, 98 g, 132 g en 134 g, vier andere konijnen 133 g, 191 g, 108 g, 95 g met de intacte A_{11} bloedlich. ingespoten (zie tabel 12). Deze konijnen kregen een intraveneuse injectie van 2 cc. en daarna ter vermijding van shock 6 intraperitoneale injecties van 2 cc. A_{11} bloedsuspensie om de 2 dagen. Na een week werd bloed afgenomen en het serum onderzocht.

TABEL 12.

Konijn.	Ingespoten met bloedlich.	titer voor proef t.o.v. bloedlich.			titer na inject. t.o.v. bloedlich.			Na absorptie met O bll. titer t.o.v. bl.lich.		
		A	B	O	A	B	O	A	B	O
133 g	A_{11}	1/4	1/4	1/2	1/64	1/16	1/16	1/64	1/2	1/2
91 g	A_{11}	1/2	1/2	1/2	1/128	1/256	1/128	1/4	1/4	1/8
108 g	A_{11}	1/4	1/2	1/2	1/64	1/16	1/8	1/32	0	0
95 g	A_{11}	1/4	1/2	1/2	1/128	1/16	1/16	1/64	1/2	1/2

Bij beschouwing der verkregen resultaten van tabel 11, blijkt dus bij het serum der konijnen 75 g, 74 g en 385 f de titer voor alle soorten bloedlich. gestegen te zijn. Werden deze sera echter met een dichte suspensie van O bloedlich. behandeld, waardoor de soortspecifieke agglutinine verwijderd werd, dan bleek ook de titer voor A bloedlich. in dezelfde mate verminderd te zijn. Van vorming van groepspecifieke agglutininen is hier dus geen sprake.

De sera der konijnen 151 g, 98 g, 132 g en 134 g evenwel vertoonden na de injecties hooger titer voor A bloedlich., dan voor de andere bloedlich. De titer voor B en O bloedlich. bleek na de injecties zelfs weinig gestegen. Na absorptie met O of B bloedlich. was de titer voor A bloedlich. onveranderd gebleven. Voor B en O bloedlich. vrijwel tot 0 gedaald.

Hier is dus groepspecifiek anti-A-agglutinine opgetreden. Deze immuunsera gedragen zich na de absorptie als B_a iso-sera.

Opmerkelijk is, dat de vier konijnen, die goed gereageerd hebben op de inspuiting met extract alle met A_{11} extract behandeld waren.

Dit extract schijnt een goed groepspecifiek immuniseerend vermogen gehad te hebben. Vergelijken we hiermee de uitkomsten, die de met intacte A_{11} bloedlich. ingespoten konijnen opgeleverd hebben, dan zien we dat 3 van de 4 konijnen ook hier anti- A agglutininen gevormd hebben, wat een goed resultaat is.

Of 't mislukken der drie overige gevallen 75 g, 74 g en 385 f aan 't extract of aan de proefdieren gelegen heeft, is moeilijk na te gaan.

Het is bekend, dat niet alle konijnen goede antistof producenten zijn. Van de factoren, die daaraan ten grondslag liggen is nog weinig bekend. Wellicht kunnen de onderzoekingen van Hara, Witebsky, Mai en Dölter e.a. over het voorkomen van A-stof in de organen van sommige konijnen, die dan geen geschikte producenten voor anti-A-serum zouden zijn, meer licht in deze vragen brengen.

Ik wil hier tevens nog even de aandacht vestigen op de noodzakelijkheid bij deze en dergelijke onderzoekingen quantitatief te werk te gaan.

Nemen we bijv. serum kon. 75 g (tabel 11) dan zien we dat na absorptie met O bll. alleen nog agglutinatie met A bll. optreedt. Men zou dit, niet quantitatief onderzoekende, voor groepspecifiek anti-A-agglutinine kunnen houden, terwijl 't toch, blijkens de quantitatieve verhoudingen alleen een gevolg is van 't feit, dat niet alle *soort*-specifiek agglutinine door de absorptie met O bll. verdwenen is en de A bll. hiervoor toevallig het meest gevoelig zijn. Van *groep*specifiek agglutinine is hier geen sprake.

§ 4. Eigenschappen der immuun-agglutinine bevattende sera.

De immuun-anti-A-sera reageeren na absorptie der soortspecifieke agglutinine zuiver groepspecifiek en munten boven iso-sera uit, door een zeer hoogen titer. De gewone iso-sera hebben een titer van ongeveer $^1/_{32}$ (be-

paald met de hiervoor beschreven macroscopische objectglasmethode). Een titer van $^1/_{128}$ is al zeer hoog en behoort tot de uitzonderingen.

Deze anti-A-immuunsera agglutineeren krachtig A en AB bloedlich., B en O bloedlich. niet (na absorptie der soortspecifieke agglutinine).

Dat de werking volkomen specifiek is, blijkt uit de contrôle met ruim honderd verschillende bloedsuspensies, tot alle groepen behoorend, waarbij geen enkele niet-specifieke reactie voorkwam.

Deze ruime contrôle is noodig om een bron van verwarring, waarmee rekening gehouden moet worden, te kunnen uitsluiten, n.l. dat door de inspuitingen agglutininen zouden kunnen ontstaan, tegen de M, N en P groep, die juist door immuniseering bij konijnen optreden. Immers is 't niet ondenkbaar dat het antigeen hiervan in het extract over zou gaan.

Voor inspuitingen met bloedlich. geldt hetzelfde.

Hallauer heeft deze mogelijkheid niet voldoende in 't oog gehouden.

Immuniseert men namelijk een konijn met een A-extract, dat bijv. het M-antigeen zou bevatten, dan ontstaat anti-M-agglutinine. Titreert men nu later zoo'n serum met een A-bloedsuspensie, die ook M-antigeen bevat, dan treedt agglutinatie op en heeft men toevallig O- en B-bloedlich. zonder M, dan kan het schijnen, dat het serum anti A-agglutinine bevat terwijl het in werkelijkheid anti-M is.

't Is dus niet voldoende een serum met één soort A-, B- en O-bloedlich. te onderzoeken.

Krijgt men bij een serie A-suspensies zonder uitzondering goede agglutinatie, dan kan men deze mogelijkheid wel uitsluiten, hetgeen bij alle verkregen anti-A-immuunsera het geval was.

Daar het agglutineerend vermogen streng specifiek is en de titer zeer hoog, zijn de anti-A-immuunsera goed bruikbaar voor het bepalen der bloedgroepen. Men moet

dan evenwel zeer nauwkeurig de soortspecifieke agglutininen verwijderen.

Absorbeert men eenige malen met een sediment van O- of B-bloedlich. en verdunt men, na de bloedlich. afgecentrifugeerd te hebben, de sera bijv. 10 ×, dan is ook voor zeer gevoelige bloedlich. een niet groepspecifieke agglutinatie wel uitgesloten. De opbrengst aan serum wordt 10 × vergroot en men heeft als eindproduct een serum met een titer van ± 100, wat nog een hooge titer is, die snelle en krachtige agglutinatie waarborgt.

Ik heb de houdbaarheid dezer sera nog aan een nader onderzoek onderworpen.

TABEL 13.

Konijneserum	Titer voor A-bloedlichaampjes		
	15-7-'33	16-8-'33	19-12-'33
ser. 151 g	1/1024	1/1024	1/2048
ser. 151 g 10 × verdund	1/128	1/128	1/256
108 g	1/2048	1/1024	1/2048
132 g	1/1024	1/512	1/1024
134 g	1/1024	1/512	1/1024

Deze sera zijn alle in steriele reageerbuizen met chloroform als conserveermiddel bewaard bij kamertemperatuur.

De geringe verschillen in titer zijn te wijten aan de verschillende gevoeligheid der erythrocyten.

Nog na 5 maanden is de titer dus onveranderd gebleven voor alle sera.

Ook het 10 × verdunde serum 151 g blijkt even goed houdbaar als 't onverdunde serum.

Wat de toepassing in de praktijk van deze immuunsera betreft, dient men rekening te houden met 't feit, dat immuun-agglutininen en iso-agglutininen niet identisch zijn. Onderzoekingen van v. Dungern en Hirszfeld (28), van

Brockmann (64), van Landsteiner en Miller (65), van Friedenreich en With (35), van Marberg (66) e.a. hebben aangetoond, dat immuunagglutinine en iso-agglutinine wel nauw verwant zijn, maar toch verschillen.

Konijnebloedlichaampjes zijn n.l. in staat β-agglutinine uit vele menschen-iso-sera geheel te absorbeeren.

Het immuun-anti-B-agglutinine uit konijneserum wordt door konijnebloedlichaampjes niet geabsorbeerd.

Anti-B-iso-agglutinine verschilt dus van anti-B-immuunagglutinine in gedrag ten opzichte van konijnebloedlichaampjes. Ten opzichte van menschenbloedlichaampjes gedragen ze zich, voor zoover dit bekend is, gelijk.

Wil men immuunsera voor de groepsbepaling bij den mensch gaan gebruiken, dan dient eerst een groote ervaring verkregen te worden over 't gedrag van bloedlichaampjes van allerlei individuen, zieke en gezonde, ten opzichte van deze sera. De niet-identiteit van immuun- en isoagglutinine maakt, dat men niet zonder meer immuunsera in de plaats van isosera zal mogen uitgeven.

Wel wijzen vele onderzoekingen erop, dat inderdaad een juiste groepsbepaling onder allerlei omstandigheden wordt verkregen, maar deze dienen nog op uitgebreide schaal bevestigd en onze inzichten in dit gebied verruimd te worden.

§ 5. Immuniseering met groepstof uit urine.

Door de proeven van Hallauer, die ik heb kunnen bevestigen, is komen vast te staan, dat groepstof los van de erythrocyten als antigeen kan werken.

Ook Lehrs, Brahn en Schiff hebben door immuniseering met speeksel, dat veel groepstof bevat, immuunsera kunnen verkrijgen.

Daar aangetoond is, dat ook urine groepstof bevat, is het niet onwaarschijnlijk, dat door injecties met urine van personen, die tot de A-groep behooren, anti-A-, en van per-

sonen van de B-groep, anti-B-agglutininen kunnen ontstaan. Schiff vermeldt, dat dit Akune gelukt is, hoewel hij geen verdere gegevens verstrekt (55).

Daar men over urine van personen der A en B groep wel steeds gemakkelijk zal kunnen beschikken, is het van practisch belang dit nader te onderzoeken.

De urine moet hiertoe eerst zekerheidshalve ter verwijdering van eventueel aanwezige cellen gecentrifugeerd en daarna geconcentreerd worden. Doordat Brahn en Schiff aangetoond hebben, dat de groepstof thermostabiel is (en zelfs 1 uur verhitting op 120° C. kan verdragen), kan de urine door koken ingedampt worden.

750 cc. urine van een persoon, die tot de A groep behoorde, werd gecentrifugeerd en tot 75 cc. ingedampt, het ontstane neerslag weer afgecentrifugeerd en de urine 2 dagen gedialyseerd in een cellophaanzak met chloroform als conserveermiddel.

Hierna werd de urine weer ingedampt tot 60 cc. om het tijdens het dialyseeren ingestroomde water te verwijderen en keukenzout in substantie toegevoegd om de vloeistof isotonisch te maken. De zoo behandelde urine werd nu op de aanwezigheid van groepstof onderzocht.

TABEL 14.

Agglutinatie van A bloedlich. in B_α serum verdund met					
physiolog. NaCl oploss.			A urine		
B_α ser. drupp. +	phys. NaCl drupp.	sterkte der agglut.	B_α ser. drupp. +	A urine drupp.	sterkte der agglut.
5	1	++++	5	1	+
4	2	++++	4	2	—
3	3	+++	3	3	—
2	4	+++	2	4	—
1	5	++	1	5	—

Daartoe werd nagegaan, of en zoo ja, hoe de agglutininen uit A en B serum door de urine werden geabsorbeerd. Zie tabel 14.

De urine oefent dus op de agglutinatie van A-bloedlich. in B-serum een sterk remmende werking uit, zoodanig, dat 2 druppels urine 4 druppels B-serum geheel onwerkzaam maken.

TABEL 15.

Agglutinatie van B bloedlich. in A_β serum verdund met					
physiolog. NaCl oploss.			A urine		
A_β ser. drupp. +	phys. NaCl drupp.	sterkte der agglut.	A_β ser. drupp. +	A urine drupp.	sterkte der agglut.
5	1	++++	5	1	++++
4	2	++++	4	2	++++
3	3	+++	3	3	+++
2	4	+++	2	4	++
1	5	++	1	5	++

De agglutinatie van B-bloedlich. in een A-serum daarentegen wordt niet merkbaar geremd in deze concentratie. Gaan we nog sterker verdunning van A-serum met urine onderzoeken, dan blijkt wel een, maar slechts geringe, niet specifieke remming voor te komen.

Nu aldus aangetoond was, dat de geconcentreerde urine A-groepstof in aanmerkelijke hoeveelheid bevatte, werden 4 konijnen hiermee op dezelfde wijze behandeld als de met A-extract uit bloed ingespoten konijnen.

Van te voren was de agglutinatietiter van A-, B- en O-bloedlich. in het serum der nog niet behandelde konijnen bepaald. Daarna kregen deze 4 intraveneuse injecties van 2 cc. met interval van 4 dagen. Na de 4e injectie werd een week gewacht en dan weer de agglutininetiter bepaald.

TABEL 16.

Konijnen.	Titer vóór inject. t.o.v. bloedlich.			Titer na inject. t.o.v. bloedlich.			na absorptie met O bloedlich. titer t.o.v. bl.lich.		
	A	B	O	A	B	O	A	B	O
191 ♂	1/64	1/16	1/64	1/32	1/16	1/16	1/2	sp.	1/2
192 ♂	1/8	1/8	1/8	1/64	1/32	1/32	sp.	—	—
193 ♂	1/4	1/4	1/4	1/32	1/16	1/16	1/4	1/4	1/2
194 ♂	1/4	1/8	1/8	1/32	1/16	1/16	1/2	1/2	1/2

Er blijkt dus door de injecties een geringe stijging der soortspecifieke agglutininen te hebben plaats gevonden, maar er is geen vorming van groepspecifieke agglutininen waar te nemen.

Het resultaat is dus tegen de verwachting in volkomen negatief.

Ook met urine van een persoon tot de B-groep behoorend werd een proef genomen.

TABEL 17.

Agglutinatie van B bloedlich. in A_β serum verdund met					
physiol. NaCl oploss.			B urine		
A_β ser. drupp. +	phys. NaCl drupp.	sterkte der agglut.	A_β ser. drupp. +	B urine drupp.	sterkte der agglut.
5	1	++++	5	1	+
4	2	++++	4	2	(+)
3	3	+++	3	3	—
2	4	+++	2	4	—
1	5	++	1	5	—

TABEL 18.

Agglutinatie van A bloedlich. in B_a serum verdund met					
physiol. NaCl oploss.			B urine		
B_a ser. drupp. +	phys. NaCl drupp.	sterkte der agglut.	B_a ser. drupp. +	B urine drupp.	sterkte der agglut.
5	1	++++	5	1	++++
4	2	++++	4	2	++++
3	3	++++	3	3	++++
2	4	+++	2	4	+++
1	5	+++	1	5	+++

750 cc. urine werd weer gecentrifugeerd, tot 75 cc. ingedampt, gecentrifugeerd en gedialyseerd. Na de dialyse tot 60 cc. ingedampt en isotonisch gemaakt.

De B-groepstof kon hierin ook weer aangetoond worden.

Deze B-urine remt sterk de agglutinatie van B-bloedlich., maar in het geheel niet die van A-bloedlich. (Zie tabel 17 en 18).

Ook met deze urine werden 4 konijnen op de bovenbeschreven wijze ingespoten.

TABEL 19.

Konijnen.	titer vóór de injecties t.o.v. bloedlich.			titer na de injecties t.o.v. bloedlich.			na absorptie met O bloedlich. titer t.o.v. bl.lich.		
	A	B	O	A	B	O	A	B	O
187 g	1/4	1/8	1/2	1/32	1/32	1/32	1/4	1/4	1/4
188 g	1/64	1/4	sp.	1/128	1/64	1/64	1/2	1/2	1/2
189 g	1/8	1/4	sp.	1/64	1/32	1/32	sp.	1/2	1/2
190 g	1/32	1/16	1/8	1/64	1/64	1/64	1/2	1/4	1/2

Het serum van konijn 188 g bleek vóór de behandeling groepspecifiek anti-A-agglutinine te bevatten, daar na absorptie met O-bloedlich. de agglutinatie voor A-bloedlich. bleef bestaan ($A^1/_{32}$ B_0 O_0).

Ook deze proef leverde dus een negatief resultaat op. Het geringe aantal van 8 konijnen laat geen definitieve gevolgtrekkingen toe. Dat het negatieve resultaat uitsluitend aan individueele ongeschiktheid der konijnen om antistoffen te produceeren, te wijten is, lijkt onwaarschijnlijk.

De verkregen resultaten schijnen erop te wijzen, dat in de op bovenbeschreven wijze geconcentreerde urine de groepstof wel bindende, maar geen antigeeneigenschappen bezit, zich dus volgens de opvattingen van Landsteiner als een hapteen gedraagt. 't Zou in dit verband interessant zijn na te gaan of de geconcentreerde urine gecombineerd met een soort-vreemd proteine wel in staat zou zijn agglutininen op te wekken.

Mogelijk is, dat door 't koken de groepstof zoodanig is ontleed, dát wel de bindende, maar niet de agglutinogene functie is behouden gebleven.

Ottensooser en Lenzinger verdedigen de opvatting, dat bindende, agglutinabele en agglutinogene stof niet identiek zijn.

De uitkomsten bij de in deze paragraaf beschreven proeven verkregen, schijnen wel in deze richting te wijzen.

HOOFDSTUK IV.

Over agglutinatieremming

Bij onderzoek van 't serum van konijn 385 f bleek, dat dit in onverdunde toestand met A, B en O bloedlichaampjes geen agglutinatie gaf; wel echter na verdunning.

TABEL 20.

Bloed-lich.	Serum konijn 385 f									
	Onv.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
A	—	+	++	+++	++++	+++	++	+	—	—
B	—	+	++	+++	++++	++++	+++	++	+	—
O	—	+	++	+++	++++	+++	++	+	—	—

Dit serum vertoont dus agglutinatieremming.

In de literatuur is den laatsten tijd door Holzer, Pondman en Brandwijk de aandacht op dit verschijnsel gevestigd.

Holzer (67) beschrijft een serum van een persoon, wiens bloedlichaampjes niet agglutinabel waren, van de groep $O_{\alpha\beta}$ dus, welk serum in onverdunden toestand alleen A-bloedlichaampjes agglutineerde. Na verdunning bleek echter, dat ook B-bloedlich. geagglutineerd werden. Holzer gebruikte de objectglasmethode. Bij verdunning van 1/8

werd 't eerst agglutinatie zichtbaar. 't Sterkst was deze bij verdunning $^1/_{16}$, nog juist zichtbaar bij $^1/_{64}$. Het β agglutinine ontbrak dus niet, maar kwam eerst bij aanmerkelijke verdunning aan 't licht.

Bij verder onderzoek van dit serum bleek 't volgende. Als men de B-bloedlich. in de serumverdunningen liet bezinken en daarna 't serum afpipetteerde, trad nu bij $^1/_2$ en $^1/_4$ verdunning wel agglutinatie op.

Verder bleek, dat, als de B-bloedsuspensie zeer geconcentreerd werd genomen in plaats van de gebruikelijke 5 % suspensie, wel agglutinatie in 't onverdunde serum optrad.

Holzer wil deze verschijnselen verklaren door aan te nemen, dat het de in verhouding tot de aangeboden bloedlich. te groote hoeveelheid agglutinine is, die remmend werkt.

Hij beschrijft nog een 2e en 3e serum van de groep $O_{\alpha\beta}$, waarbij de agglutinatie zoowel van de A- als van de B-bloedlich. geremd werd.

Bij dit laatste serum bleek na 8 dagen staan bij kamertemp. de remming verdwenen te zijn. Volgens Holzer verklaarbaar door afneming van den agglutininetiter.

Pondman en Brandwijk (7) beschrijven twee sera, een A_β en een B_α serum, die beide in onverdunden toestand geen agglutinatie respect. met B- en A-bloedlich. vertoonden, echter wel na verdunning. Ook zij werkten met de objectglasmethode.

Eerst bij 8 tot 16 malige verdunning trad maximale agglutinatie op. Zij wijzen erop, dat men aan een serum dus niet alleen den eisch moet stellen van een hoogen titer, maar ook van afwezigheid van remmingsverschijnselen.

Uitgaande van waarnemingen bij de bacterieagglutinatie-remming, dat daarbij, o.a. volgens v. Loghem (68), 't komplement een rol speelt, was 't van belang den invloed van inactiveering van 't serum op de haemagglutinatie-remming na te gaan. Na 't serum 385 f een half

TABEL 21.

	Serum konijn 385 f na inactiveering									
	onv.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
A	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—
B	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	(+)	—
O	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—

uur op 56° C. verhit te hebben, bleek de remming volkomen verdwenen.

Verder blijkt, dat de agglutinatietiter door inactiveering niet of nagenoeg niet wordt verminderd.

Ook bij andere sera, die agglutinatieremming vertoonden, bleek na inactiveering de remming verdwenen te zijn, zooals tabel 22 laat zien.

Deze sera zijn alle afkomstig van konijnen, die met A-bloedlich. of A-extracten ingespoten waren. (Zie tabel 11 en 12).

't Onverdunde serum, dat voor de verhitting slechts een spoor agglutinatie vertoonde, geeft na inactiveering maximale agglutinatie.

Na toevoeging van versch normaal konijneserum aan 't geinactiveerde serum bleek de remming weer op te treden; zie:

TABEL 23.

Serum konijn	Verdund met gelijk vol.	sterkte der agglutinatie met A bloedlich.
132 g	phys. NaCl oploss.	+
132 g geinactiv.	phys. NaCl oploss.	++++
132 g geinactiv.	versch. serum kon. 169 g	+

't Versche normaalserum 169 g vertoonde met A-bloed-

Agglutinatie met A bloedlichaampjes.

TABEL 22.

kon. ser.		onv.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
98 g	versch	(+)	+	++	+++	++++	+++	+++	++	++	+	(+)	—
	geinact.	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+	+	+	—	—
151 g	versch	(+)	+	++	+++	++++	+++	+++	++	+	(+)	—	—
	geinact.	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	—	—	—
132 g	versch	(+)	+	++	+++	++++	++++	+++	++	+	(+)	—	—
	geinact.	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	(+)	—	—
134 g	versch	(+)	+	++	+++	++++	+++	++	+	+	—	—	—
	geinact.	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	(+)	—	—	—
95 g	versch	+	++	+++	++++	+++	++	+	—	—	—	—	—
	geinact.	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—	—	—	—
108 g	versch	+	++	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—	—
	geinact.	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—	—	—	—	—
91 g	versch	+	++	+++	++++	+++	++	+	—	—	—	—	—
	geinact.	++++	+++	++++	++++	+++	++	+	—	—	—	—	—
133 g	versch	+	++	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—	—
	geinact.	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—	—	—	—	—

lich. in onverdunden toestand een spoor agglutinatie, half verdund geen agglut., na inactiveering geen verandering. Dit serum bevat dus geen remmende eigenschappen.

't Blijkt dus, dat 't komplement een belangrijk aandeel heeft in de remming. Toch is 't niet alleen de aanwezigheid van komplement, die de remming bepaalt. Dit blijkt, als we zien, hoe vele sera zich ten opzichte van de andere bloedlich. verhouden. (Zie tabellen 24 en 25).

We zien, dat er wel remming is der agglutinatie van A-bloedlich., niet echter van B- en O-bloedlichaampjes.

't Zelfde verschijnsel doet zich voor bij de sera 95 g, 108 g, 133 g, 151 g, 132 g en 134 g, terwijl serum 91 g zich evenzoo gedraagt als serum 385 f, hooge agglutinatietiter voor alle soorten bloedlichaampjes, remming voor alle soorten bloedlich. *'t Komplement kan dus niet de eenige oorzaak van de remming zijn, daar dan de remming voor alle soorten bloedlichaampjes zou moeten optreden. Er moet dus nog een andere factor in het spel zijn.*

Na eenigen tijd nu bleek in de druppels, waar agglutinatieremming was waargenomen, haemolyse op te treden en wel des te sterker naarmate de remming sterker was.

Agglutinatieremming en haemolyse bleken volkomen parallel te loopen.

Bij serum 98 g bijv. was bij de A-bloedlichaampjes in de eerste drie druppels haemolyse waar te nemen. Daar trad ook de remming op. Bij de B- en O-bloedlichaampjes, waar in de eerste druppels geen haemolyse was op te merken, kwam ook geen remming voor.

Hetzelfde was het geval met andere sera.

Waar haemolyse was waar te nemen, kwam remming voor; waar geen haemolyse was te zien, trad ook geen remming op. We moeten dus aannemen, dat het proces van haemolyse in staat is dat van agglutinatie te remmen.

Nemen we dit aan, dan zijn alle verschijnselen verklaarbaar. Voor haemolyse zijn twee factoren noodig, amboceptor (haemolysine) en komplement. Ontbreekt een van

Serum konijn 98 g TABEL 24.

	onv.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
A	+	+	++	+++	++++	+++	+++	++	++	+	(+)	—
B	++	+	(+)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
O	+++	++	+	(+)	—	—	—	-	—	—	—	—

Serum konijn 98 g na inactiveering. TABEL 25.

	onv.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
A	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	+	—	—
B	++	+	(+)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
O	+++	++	+	(+)	—	—	—	—	—	—	—	—

beide, dan kan geen haemolyse en ook geen remming optreden.

Bij konijn 98 g zijn door de injectie met A-extract groepspecifieke anti-A-agglutinine en -haemolysine ontstaan. Door de aanwezigheid van anti-A-haemolysine en komplement in het serum treedt remming der A-agglutinatie op. Daar er geen anti-B-haemolysine en geen soortspecifieke haemolysine is opgetreden, is er geen remming van B- en O-lichaampjes. Na inactiveeren, waarbij het komplement buiten werking wordt gesteld, is eveneens de remming verdwenen. Toevoegen van komplement doet de remming weer optreden, evenals de haemolyse.

Niet alleen de door immuniseering verkregen, maar ook de in *normaal* konijneserum vaak aanwezige (soortspecifieke) haemolysine tegen menschenbloedlichaampjes remt de (soortspecifieke) agglutinatie.

Versch serum kon. 134 g (voor de injectie):

bll.	onv.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
A	++	+++	+++	++	+	—

Na inactiveering:

A	++++	+++	+++	++	+	—

Na inactiveering agglutineert 't onverdunde serum menschenbloedlich. sterker dan 't versche serum.

De agglutinatieremming bij konijneserum berust dus op de aanwezigheid van haemolysine en komplement.

Ik heb verder nagegaan of de verschijnselen, die Holzer bij zijn remmende eigenschappen vertoonende *menschen*sera beschreven heeft, ook bij deze konijnensera voorkwamen.

	agglutinatie
1 dr. serum kon. 98 g + 1 dr. 5 % susp. A bll.	(+)
1 dr. serum kon. 98 g + 1 dr. 30 % susp. A bll.	+++

Een dichte suspensie geeft dus sterke agglutinatie ook in 't onverdunde serum.

Het tweede verschijnsel, dat Holzer beschrijft, komt eveneens bij deze sera voor.

5 druppels serum 98 g + 3 druppels A-bloedlichaampjes sediment werden gemengd en na 1 minuut gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof werd afgepipetteerd. Deze vloeistof bleek met een 5 % A-bloedlich. suspensie sterker agglutinatie te geven dan 't oorspronkelijke serum.

Holzer verklaart de remmingsverschijnselen door aanwezigheid van overmaat agglutinine. Door een deel van de agglutinine te verwijderen zou de remming wegvallen. Dat dit niet de juiste verklaring voor de konijnesera is blijkt uit de volgende proef:

5 druppels geinactiveerd serum 98g + 3 druppels A-bloedlich.-sediment werden gemengd, na 1 minuut gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof gaf nu minder agglutinatie dan 't geinactiveerde serum.

Zelf heb ik niet met menschensera, die remmende eigenschappen vertoonden, kunnen werken, daar die niet ter beschikking waren.

De volkomen overeenkomst der verschijnselen geven mij echter de overtuiging, dat dezelfde processen een rol moeten spelen bij de menschensera.

Holzers verklaring der remming, dat deze zou berusten op, in verhouding tot de toegevoegde hoeveelheid bloedlichaampjes, te groote hoeveelheid agglutinine in 't serum, acht ik onjuist. De agglutininetiter van 't serum, dat hij beschrijft, is bijv. geenszins hoog. De titer voor A-bloedlichaampjes, die normaal geagglutineerd werden, was $^1/_{32}$ de titer voor de B-bloedlich., die sterke remming vertoonden, was $^1/_{64}$

Bovendien zou dan steeds in sera met hoogen titer agglutinatieremming moeten optreden, wat niet het geval is.

Dat de remmende eigenschappen na een week staan bij kamertemperatuur verdwenen waren, is moeilijk te verklaren door afneming der hoeveelheid agglutinine, daar deze

niet zoo snel daalt. Dit wijst veeleer in de richting van het labiele komplement.

Mijns inziens moet de remmende werking bij menschensera verklaard worden door de aanwezigheid van isohaemolysine (met komplement).

Bij nog eens doorzien van de literatuur bleek mij, dat eigenlijk de agglutinatie-remmende werking van de haemolyse reeds lang bekend was. Thomsen (19) bijv. schrijft, dat vele sera in verschen toestand groepspecifiek haemolysine bevatten, dat de agglutinatie in meer of minder mate belemmert, ondanks 't feit, dat zulke sera vaak een ongewoon hoogen agglutinatietiter hebben. Als versch serum gebruikt wordt, kan de agglutinatie in 't onverdunde serum uitblijven en wordt de haemolyse over het hoofd gezien, hetgeen bij de objectglasmethode gemakkelijk kan plaats hebben; zoo kan de agglutinatie abusievelijk als negatief worden beschouwd.

In „Die Individualität des Blutes" door Lattes, bewerkt door Schiff, (70), vond ik in het hoofdstuk over isolysinen: „Scheinbare Ausnahmen von dieser Regel treten ein, wenn die Hämolyse so schnell verläuft, dasz für den Zustandekommen der Agglutination die Zeit nicht reicht. In derartigen Fällen kann man die wirklichen Verhältnisse leicht feststellen, wenn man entweder das Serum verdünnt, oder noch besser, es zunächst etwas ablagern läszt, oder endlich es eine halbe Stunde auf 56° erhitzt".

De beschrijving lijkt mij minder juist, daar het niet zoo zeer de snelle haemolyse is, (die bij kamertemperatuur niet zoo snel optreedt), die de bloedlichaampjes haemolyseert voor ze den tijd hebben om te agglutineeren, maar een werkelijke remming. De agglutinatie wordt verhinderd.

Bij serum konijn 98 g bijv. trad in 't geactiveerde serum krachtige agglutinatie binnen 30 seconden op. In 't versche serum is dan geen of slechts een spoortje agglutinatie te zien en eerst na 5 minuten treden de eerste teekenen van haemolyse op. Bij viermalige verdunning is

er slechts een gedeeltelijke haemolyse, die eerst na 15 minuten begint waarneembaar te worden. Toch is dan de agglutinatie van het begin af duidelijk geremd.

't Verschijnsel der agglutinatieremming door haemolyse was dus reeds bekend en de in dit hoofdstukje beschreven proeven brengen dus geen nieuws.

Naar aanleiding van de verschenen publicaties over agglutinatieremming scheen 't mij echter gerechtvaardigd ze in dit proefschrift op te nemen.

HOOFDSTUK V.

Over de houdbaarheid van „test"-sera.

1. Algemeene opmerkingen.

Gedurende de onderzoekingen werden ook eenige gegevens verzameld over de houdbaarheid van sera, die zonder of met conserveermiddelen werden bewaard. Hoewel de bepalingen niet volledig zijn, lijkt 't mij toch gewenscht deze mede te deelen, daar 't hier een praktisch belangrijk vraagstuk betreft, waarover wel veel geschreven is, maar nog weinig gegevens beschikbaar zijn.

Van een zestiental sera van verschillende bloedgroepen met of zonder verschillende conserveermiddelen bewaard, werd de titer bepaald en deze na verloop van verschillenden tijd weer nagegaan. Van enkele sera is de titer niet direct, doch eerst na een jaar vastgesteld. Waar 't hier op aan komt is immers of sera, na langen tijd bewaard te zijn, hun groepspecifiek agglutineerend vermogen nog krachtig hebben behouden. Een directe vergelijking van den titer voor en na 't bewaren is niet mogelijk, daar de titers met verschillende bloedlichaampjes moeten worden bepaald en de gevoeligheid der bloedlichaampjes wisselt. De opgegeven waarden zijn dan dus slechts relatief en mogen slechts onder voorbehoud worden vergeleken.

De sera werden bewaard in wit glazen fleschjes of glazen buisjes met gummistoppen gesloten, meestal in de ijs-

kast, soms bij kamertemperatuur; enkele in 't licht, de meeste in 't donker. Sommige fleschjes zijn herhaaldelijk geopend geweest om er kleine hoeveelheden uit te nemen.

De wijze van bewaren is in de tabellen aangegeven.

2. Sera bewaard zonder conserveermiddel.

TABEL 26.

Serum	Groep	titer		titer na verloop vau								Helder-heid	Wijze van bewaren
				2 mnd.		6 mnd.		1 jaar		$1^1/_2$ jaar			
		α	β	α	β	α	β	α	β	α	β		
U	B_α	$^1/_{24}$	—	$^1/_{24}$	—	$^1/_8$	—	$^1/_8$	—	$^1/_8$	—	troebel	in ijskast, donker
F	B_α	$^1/_{128}$	—							$^1/_{128}$	—	troebel	
S	$O_{\alpha\beta}$	$^1/_{128}$	$^1/_{16}$			$^1/_{32}$	$^1/_{16}$			$^1/_{32}$	$^1/_8$	helder	
de S	$O_{\alpha\beta}$	$^1/_{256}$	$^1/_{32}$							$^1/_{128}$	$^1/_{32}$	± helder	
A_1	A_β	—	$^1/_{16}$					—	$^1/_{32}$			helder	
A_7	A_β							—	$^1/_{16}$			helder	
O_1	$O_{\alpha\beta}$							$^1/_8$	$^1/_4$			± helder	
O_2	$O_{\alpha\beta}$							$^1/_8$	$^1/_4$			± helder	
O_3	$O_{\alpha\beta}$							$^1/_{32}$	$^1/_{16}$			helder	

Alle sera agglutineerden nog volkomen groepspecifiek. Na 1 à $1^1/_2$ jaar was bij alle sera de agglutinatie nog vrij krachtig.

3. Sera bewaard met chloroform als conserveermiddel.

TABEL 27.

Serum	Groep	titer		titer na verloop van						Helderheid	Wijze van bewaren
				2 mnd.		6 mnd.		1 jaar			
		α	β	α	β	α	β	α	β		
V	A_β	—	1/32	—	1/64	—	1/32	—	1/16	troebel	ijskast, donker
A_1	A_β	—	1/16	—	1/16			—	1/32	zwak troeb.	ijskast, donker
A_3	A_β							—	1/32	troebel	ijskast, donker
A_7	A_β							—	1/16	zwak troeb.	ijskast, donker
205	A_β	—	1/32					—	1/32	„ „	kamertp., in 't licht
207	A_β	—	1/32					—	1/32	„ „	kamertp., in 't licht
204	$O_{\alpha\beta}$	1/32	1/2	1/16	sp?			1/32	0	„ „	kamertp., in 't licht
208	$O_{\alpha\beta}$	1/32	1/8					1/64	1/8	„ „	kamertp., in 't licht
206	$O_{\alpha\beta}$	1/128	—			1/32	—	1/32	—	„ „	kamertp., in 't licht

Alle sera vertoonen nog na een jaar een krachtig groepspecifieke agglutinatie, behalve serum 204, waarvan 't β agglutinine, dat reeds van den aanvang af lage titer had, niet meer aantoonbaar was.

4. Sera bewaard met superol.

TABEL 28.

Serum	Groep	titer		titer na verl. van				Helderheid	Wijze van bewaren
				2 mnd.		1 jaar			
		α	β	α	β	α	β		
A_1	A_β	—	1/16	—	1/16	—	1/16	helder	ijskast, donker
A_3	A_β					—	1/32	troebel	„ „
A_7	A_β					—	1/16	helder	„ „
O_3	$O_{\alpha\beta}$					1/16	1/8	helder	„ „

Ook deze sera hebben hun titer goed bewaard en agglutineeren volkomen specifiek.

5. Sera bewaard met carbol.

TABEL 29.

Serum	Groep	titer		titer na verloop van 2 mnd.		1 jaar		helderheid	Wijze van bewaren.
		α	β	α	β	α	β		
A_1	A_β	—	$^1/_{16}$	—	$^1/_8$	—	$^1/_{16}$	zwak troeb.	ijskast in donker
A_3	A_β					—	$^1/_{32}$	troebel	„ „
A_7	A_β					—	$^1/_{16}$	troebel	„ „

Ook bij deze sera bleek een vrij krachtige specifieke agglutinatie nog na een jaar te bestaan.

6. Vergelijking van eenige resultaten.

Vatten we nu de gegevens samen, dan blijken alle sera op één na nog na 1 à $1^1/_2$ jaar betrekkelijk krachtig werkzaam. De uitzondering is serum 204 van tabel 27, een $O_{\alpha\beta}$ serum waarvan 't β agglutinine, dat reeds van 't begin af aan zwak werkzaam was, spoedig niet meer aangetoond kon worden.

Dat een der gebruikte conserveermiddelen ver boven de andere te verkiezen zou zijn, is niet te constateeren. Ook tusschen de zonder en met conserveermiddel bewaarde sera is slechts een gering onderscheid op te merken.

Om een duidelijk overzicht te geven zijn nog eens de titers van 4 sera, waarvan porties zonder en met de verschillende conserveermiddelen werden bewaard, achtereenvolgens vermeld.

TABEL 30.

Serum	Groep	Na 1 jaar bewaard te zijn							
		zonder cons. midd.		met chloroform		met carbol		met superol	
		α	β	α	β	α	β	α	β
A_1	A_β		$^1/_{32}$		$^1/_{32}$		$^1/_{16}$		$^1/_{16}$
A_7	A_β		$^1/_{16}$		$^1/_{32}$		$^1/_{16}$		$^1/_{16}$
A_3	A_β				$^1/_{32}$		$^1/_{32}$		$^1/_{32}$
O_3	$O_{\alpha\beta}$	$^1/_{32}$	$^1/_{16}$					$^1/_{16}$	$^1/_8$

Daar chloroform haemolyse kan veroorzaken en carbol vaak sterke neerslagen geeft, verdient superol van de onderzochte conserveermiddelen voor de praktijk de voorkeur.

SAMENVATTING

Om groepspecifiek agglutineerende sera met hoogen titer te bereiden, werd onderzocht of dit langs den weg van serumzuivering met behulp van ammoniumsulfaat mogelijk was.

Hiertoe werd eerst nagegaan, hoe het agglutinine over de eiwitfracties van het serum verdeeld is.

De bij halve verzadiging met ammoniumsulfaat neergeslagen globulinefractie bleek al het agglutinine te bevatten.

De albuminefractie is geheel vrij van agglutinine.

Bij onderverdeeling der globuline in fracties bleek het agglutinine vrij gelijkmatig over de fracties verdeeld, zoodanig, dat de fractie met het meeste eiwit ook het meeste agglutinine bevatte.

α- en β-agglutinine gedroegen zich volkomen identiek.

De nadruk werd erop gelegd, dat alleen de zoogenaamde zuiveringsfactor een maat is voor het slagen van een zuiveringsproces. Vergelijking van den titer van eindproduct en oorspronkelijk serum zonder meer geeft geen maat voor de bereikte zuivering.

De zuiveringsfactor bleek bij neerslaan van de globulinefractie in zijn geheel ongeveer 1,5 te zijn. Bij onderverdeeling van de globuline in fracties, bleek deze factor voor sommige fracties wat gunstiger te kunnen zijn. Dit is evenwel niet constant in dezelfde fracties het geval, maar wisselt voor verschillende sera. Men zou dus van

te voren van elk serum een curve moeten maken om de gunstigste uitzoutingsgrenzen te bepalen. De hierdoor te bereiken iets gunstiger zuiveringsfactor rechtvaardigt niet de daardoor optredende verliezen. Men kan dus met neerslaan van de globulinefractie in zijn geheel volstaan.

Door de globulineoplossing wat eiwitrijker te maken dan het oorspronkelijk serum, kan regelmatig een eindproduct worden bereid met ongeveer 2 × hooger titer dan het oorspronkelijk serum.

Het verlies aan agglutinine is ongeveer 20 à 30 %.

Het verdient aanbeveling een te sterken zuurgraad der globulineoplossingen te corrigeeren.

Voor geringe wisselingen in zuurgraad is de agglutinatiereactie weinig gevoelig.

Nadat gebleken was, dat met de zuiveringsmethode geen hooger concentratie dan een tweemalige te verkrijgen was, werd getracht door immuniseering van konijnen met A-extract groepspecifieke anti-A-sera met hoogen titer te bereiden.

Eerst werd getracht door schudden van A-bloedlichaampjes met physiologisch NaCl oplossing A-extract te verkrijgen. Dit gelukte evenwel niet. Volgens de methode van Dold en Rosenberg werd echter regelmatig een sterk werkzaam A-extract verkregen.

Dit extract werd ter verwijdering van eventueel achtergebleven stromadeeltjes gefiltreerd door een Chamberlandkaars. Na de filtratie, waardoor nog resten van erythrocyten werden verwijderd, was het filtraat nog even werkzaam.

Met een dergelijk A-extract werden bij 4 konijnen sterk werkzame groepspecifieke anti-A-sera verkregen. De titer van deze sera voor A-bloedlichaampjes bedroeg na absorptie met O-bloedlichaampjes $^1/_{1024}$.

Men dient zoo'n immuunserum met een groote serie A- en AB-bloedlichaampjes te onderzoeken om vergissingen met de M-, N- en P-groep uit te sluiten.

Na voldoende absorptie met O-bloedlichaampjes om alle soortspecifieke agglutinine te verwijderen, gedraagt zulk een anti-A-immuunserum zich ten opzichte van de bloedlichaampjes der verschillende bloedgroepen volkomen als een B_a-isoserum.

Naar aanleiding van de onderzoekingen van v. Dungern en Hirszfeld, van Landsteiner en Miller en van Friedenreich en With is er op gewezen, dat voor het vervangen van menschen-testsera door dieren-immuunsera men over een groote ervaring over het gedrag der dieren-immuunsera ten opzichte van bloedlichaampjes van gezonden en zieken moet beschikken.

Daar groepstof los van de erythrocyten in staat is gebleken als antigeen te werken, werd getracht met groepstof uit urine konijnen te immuniseeren. Hoewel de geconcentreerde urine sterk groepspecifiek bindend vermogen had, was toch het resultaat der immuniseeringsproeven volkomen negatief. De mogelijke oorzaken hiervan werden kort besproken.

Doordat eenige konijnesera agglutinatieremming vertoonden, werd dit verschijnsel nader bestudeerd. De oorzaak werd gevonden in het gelijktijdig voorkomen van haemolysine en komplement in het serum. De haemolyse oefent ook, voordat zij manifest is geworden, een remmenden invloed op de agglutinatie uit.

De door Holzer waargenomen verschijnselen bij menschensera, die agglutinatieremming vertoonden, werden evenzoo bij de konijnesera teruggevonden.

Waarschijnlijk wordt de door Holzer, Pondman en Brandwijk beschreven remming bij menschensera veroorzaakt door isohaemolysine onder aanwezigheid van komplement.

Eenige gegevens over de duurzaamheid van 16 isoagglutineerende sera werden bijeengebracht. Na 1 à $1^1/_2$ jaar bleken alle sera op één na nog vrij krachtig groepspecifiek agglutineerend vermogen te bezitten. Niet specifieke

agglutinatie kwam niet voor. Het serum, dat een uitzondering maakte, was een $O_{\alpha\beta}$ serum met reeds van den aanvang af zeer lagen β titer ($^1/_2$). Deze was na 2 maanden reeds tot 0 gedaald. Het α-agglutinine (titer $^1/_{32}$) was na een jaar nog krachtig werkzaam.

Bij vergelijking tusschen de conserveermiddelen chloroform, carbol en superol bleek, dat bij alle conserveermiddelen de titer goed bewaard was gebleven. Het beste nog met chloroform, hoewel de verschillen gering waren. Carbol en superol staan vrijwel gelijk wat invloed op het agglutinine betreft.

Bij vergelijking van de voorafgaande resultaten met die welke zijn verkregen met sera, waaraan geen conserveermiddel was toegevoegd, bleek dat het conserveermiddel geen grooten invloed uitoefent. Daar chloroform haemolyse der bloedlichaampjes kan veroorzaken en carbol vaak sterke neerslagen geeft, is voor de praktijk superol van de onderzochte conserveermiddelen het meest geschikt.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Darstellung gruppenspezifisch agglutinierender Sera mit hohem Titer wurde zunächst untersucht, ob dies, entsprechend der Serumreinigung, mit Ammonsulfat erreicht werden konnte.

Zu diesem Zwecke wurde verfolgt, wie sich das Agglutinin über die Eiweissfraktionen des Serums verteilt. Es zeigte sich, dass die bei halber Sättigung mit Ammonsulfat gefällte Globulinfraktion das gesamte Agglutinin enthielt. Die Albuminfraktion war völlig frei von Agglutinin.

Bei weiterer Aufteilung des Globulins in Fraktionen zeigte es sich, dass das Agglutinin ziemlich gleichmässig über alle Fraktionen verteilt war, wobei die Fraktion mit dem höchsten Eiweissgehalt auch das meiste Agglutinin enthielt.

α-und β-Agglutinin verhielten sich vollkommen identisch.

Es wurde nachdrücklich darauf hingewiesen, dass nur der sogenannte Reinigungsfaktor einen Maszstab für das Gelingen eines Reinigungsprozesses bildet. Ein Vergleich der Titer vom Endprodukt und vom Ausgangsserum ohne nähere Kennzeichnung gibt kein Masz für die erzielte Reinigung.

Bei Fällung der gesamten Globulinfraktion betrug der Reinigungsfaktor ungefähr 1,5; in manchen Unterfraktionen des Globulins wurde zuweilen ein etwas günstigerer

Faktor gefunden. Diese Erscheinung trat jedoch nicht konstant in denselben Fraktionen auf, sondern variierte von Serum zu Serum. Wollte man diese Reinigungsmethode verwenden, so müsste man vorher zur Festlegung der günstigsten Bedingungen eine Aussalzungskurve aufnehmen. Die hiermit zu erreichende Verbesserung des Reinigungsfaktors rechtfertigt jedoch nicht die hierbei auftredenden Verluste. Daher kann man sich mit der Fällung der Globulinfraktion als ganze begnügen.

Durch Erhöhung des Eiweissgehaltes der Globulinlösung gegenüber dem ursprünglichen Serum kann regelmässig ein Endprodukt erhalten werden, dessen Titer ungefähr zweimal höher ist als der des Ausgangsserums.

Der Agglutininverlust beträgt ungefähr 20—30 %.

Ein zu höher Säuregrad der Globulinlösungen wird zweckmässig korrigiert. Gegenüber geringen Schwankungen des Säuregrads ist die Agglutinationsreaktion wenig empfindlich.

Nachdem sich gezeigt hatte, dass mit der erwähnten Reinigungsmethode höchstens eine zweifache Anreicherung erzielt werden kann, wurde versucht, durch Immunisierung von Kaninchen mit A-Extract gruppenspezifische Anti-A-Sera mit höherem Titer darzustellen.

Zunächst wurde versucht, durch Schütteln von A-Blutkörperchen mit physiologischer Kochsalzlösung einen A-Extrakt zu erhalten, was jedoch nicht gelang. Hingegen wurde nach der Methode van Dold und Rosenberg regelmässig ein stark wirksamer A-Extrakt erhalten.

Dieser Extrakt wurde zur Entfernung von, gegebenenfalls zurückgebliebenen, Stromateilchen durch eine Chamberlandkerze filtriert. Nach der Filtration, wobei auch Reste von Erythrozyten entfernt wurden, besass das Filtrat die gleiche Wirksamkeit wie die unfiltrierte Lösung.

Mit einem solchen A-Extrakt wurden bei 4 Kaninchen stark wirksame gruppenspezifische Anti-A-Sera gewon-

nen. Der Titer dieser Sera für A-Blutkörperchen betrug nach Absorption mit O-Blutkörperchen 1/1024.

Um Verwechslung mit der M-, N- und P-Gruppe auszuschliessen, muss ein solches Immunserum mit einer grossen Reihe A- und AB-Blutkörperchen untersucht werden.

Nach ausreichender Absorption mit O-Blutkörperchen (um jedes artspezifisches Agglutinin zu entfernen) verhält sich ein Anti-A-Immunserum gegenüber den Blutkörperchen der verschidenen Blutgruppen vollständig wie ein B_{α}-Isoserum.

Auf Grund der Untersuchungen von v. Dungern und Hirszfeld, Landsteiner und Miller, sowie Friedenreich und With wurde darauf hingewiesen, dass man zum Ersatz von Menschentestsera durch Tierimmunsera über eine grosse Erfahrung hinsichtlich des Verhaltens der Tierimmunsera gegenüber den Blutkörperchen von Gesunden und Kranken verfügen muss.

Da sich Gruppensubstanz frei von den Erythrozyten als antigenwirksam gezeigt hatte, wurde versucht, Kaninchen mit Gruppensubstanz aus Harn zu immunisieren. Obwohl der konzentrierte Harn ein starkes gruppenspezifisch verbindendes Vermögen besass, verliefen die Immunisierungsversuche jedoch vollständig ergebnislos. Die möglichen Ursachen hiervon wurden kurz besprochen.

Da bei einigen Kaninchensera Agglutinationshemmung beobachtet wurde, wurde diese Erscheinung näher untersucht. Die Ursache hierfür wurde in dem gleichzeitigen Auftreten von Hämolysin und Komplement im Serum gefunden. Die Hämolyse übt, auch bevor sie sich anderweitig kundtut, auf die Agglutination einen hemmenden Einfluss aus.

Die von Holzer bei Agglutinationshemmung zeigenden Menschensera beobachteten Erscheinungen, wurden bei den Kaninchensera gleichfalls beobachtet.

Vermutlich wird die von Holzer, Pondman und Brandwijk beschriebene Hemmung bei Menschensera durch Iso-

hämolysine bei Gegenwart von Komplement verursacht.

Es wurden einige Daten über die Haltbarkeit von 16 iso-agglutinierenden Sera gesammelt und angeführt. Es zeigte sich, dass noch nach 1—1½ Jahren alle Sera, mit einer Ausnahme, ein starkes gruppenspezifisches Agglutinierungsvermögen besassen. Unspezifische Agglutination trat nicht auf. Das Serum, das eine Ausnahme machte, war ein $O_{\alpha\beta}$-Serum mit einem schon von Anfang an sehr niedrigem β-Titer (½). Dieser war schon nach 2 Monaten auf 0 abgesunken. Das α-Agglutinin (Titer 1/32) war nach einem Jahre noch stark wirksam.

Ein Vergleich zwischen den Konservierungsmitteln Chloroform, Karbol und Superol lieferte das Ergebnis, dass bei allen Konservierungsmitteln der Titer gut erhalten geblieben war. Am Günstigsten erwies sich Chloroform, obwohl die Differenzen gering waren. Karbol und Superol üben auf die Agglutination ungefähr den gleichen Einfluss aus.

Bei Vergleich der angeführten Ergebnisse mit denen, die bei Sera erhalten wurden, denen kein Konservierungsmittel zugesetzt worden war, zeigte es sich, dass die Konservierungsmittel keinen grossen Einfluss ausüben. Da Chloroform jedoch Hämolyse der Blutkörperchen verursachen kann und Karbol häufig starke Fällungen bewirkt, ist von den untersuchten Konservierungsmitteln Superol für die Praxis am besten geeignet.

LITERATUUR OPGAVE

1. K. Landsteiner, Wien. Klin. Wochenschr., Bd. 14, 1901 No. 46, blz. 1132.
2. v. Decastello en Sturli, Münch. Med. Wochenschr. 1902, blz. 1090.
3. Pondman, Geneesk. Bladen, 31ste reeks, VII, 1933, blz. 215.
4. Cit. Thomsen in P. Steffan, Handbuch der Blutgruppenkunde, blz. 21.
5. Coca, Cit. F. Oehlecker, Die Bluttransfusion, blz. 31.
6. Forsmann en Beck, Cit. F. Oehlecker, Die Bluttransfusion, blz. 31.
7. Pondman en Brandwijk, The Lancet, 1932, 9 Juli, blz. 92.
8. Hesch in P. Steffan, Handbuch der Blutgruppenkunde, blz. 1.
9. Aldershoff, Ned. T. v. Gen., 1927, II, 14, blz. 136.
10. Thomsen, Zschr. f. Immun. forsch. Bd. 52, 1927, blz. 85.
11. Kauder, Arch. f. Exp. Path. u. Pharm., 20, 411, 1886.
12. Fuld en Spiro, Zschr. f. physiol. Chem., 31, 1900/1901, blz. 132.
13. Freund en Joachim, Zschr. f.physiol. Chem., 36, 1902. blz. 407.
14. Sörensen. Cpt. Rend. Lab. Carlsberg, 15, 1925.
    Cit. Spiegel- Adolf, Die Globuline, blz. 35.
15. Verveen, Onderzoekingen over Serumzuivering, Proefschrift 1928.
16. Spiegel-Adolf, Die Globuline, Bd. IV, Handb. d. Koll. Wiss. in Einzeldarst.
17. Pick, Hofmeisters Beitr. 351, 393, 445, 1902.
    Cit. Spiegel- Adolf, Die Globuline, blz. 32 e.a.
18. Porges en Pribam, Cit. Handb. d. pathog. Mikro-org., Kolle, Kraus, Uhlenhuth, Bd. II, 1, blz. 208.
19. Landsteiner en Calvo, Zbl. f. Bakt. Orig., Bd. 31, 1902. blz. 781.
20. Went, Zsch. f. Immun. forsch., Bd. 35, 1923, blz. 503.

21. Ruppel, Cit. Verveen, proefschrift 1928, blz. 79.
22. Kapsenberg en Rispens, Zschr. f. Immun. forsch., Bd. 52, 1927, blz. 227.
23. Schütz en Wöhlisch, Klin. Wochenschr. 1927,36, blz. 1614.
24. Rona en Krebs, Biochem. Zschr., Bd. 169, blz. 266.
25. Bleyer, Zschr. f. Immun. forsch., Bd. 53, 1927, blz. 386.
26. Vera Schröder, Zschr. f. Immun. forsch. Bd. 65, 1930, blz. 81.
27. Thomoff, Arch. Tierheilk., 61, 1930, H. 5, blz. 433.
Ref. Zbl. Hyg., Bd. 24, 1931, 13-14, blz. 667.
28. v. Dungern en Hirszfeld, Zschr. f. Immun. forsch. Orig. Bd. 8, 1911, blz. 526.
29. Hooker en Anderson, Journ. of Immunol., 1921, Vol. 6, blz. 413.
30. Kolmer en Trist, Journ. of Immunol., 1920, Vol. 5, blz. 89,
31. S. Kirihara, Zschr. Klin. Med., Bd. 99, 1924, H. 4-6, blz. 522.
Cit. Thomsen, Handbuch der Blutgr.kunde, blz. 76.
32. Amzel, Halber en Hirszfeld, Zschr. f. Immun. forsch., Bd. 42, 1925, blz. 369.
33. Schiff en Adelsberger, Zschr. f. Immun. forsch., Bd. 40, 1924, blz. 335.
34. Landsteiner, v. d. Scheer en Witt, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., Bd. 22, 1925, blz. 289.
Ref. Zbl. Bakt. I, Ref. Bd. 80, 1925/26, 61.
35. Friedenreich en With, Zeitschr. f. Immun. forsch., Bd. 78, 1933, blz. 152.
36. Hara, Zsch. f. Immun. forsch., Bd. 67, 1930, blz. 125.
37. Witebsky, Zschr. f. Immun. forsch., Bd. 59, 1928, blz. 139.
38. Mai, Zschr. f. Immun. forsch., Bd. 66, 1930, blz. 213.
39. Dölter, Zschr. f. Immun. forsch., Bd. 43, 1925, blz. 95.
40. Bang en Forssman, Zbl. f. Bakt. I, Orig. Bd. 40, 1906, bl. 151.
41. Landsteiner en v. d. Scheer, Journ. of Exp. Med., Vol. 41, blz. 427.
42. Kamada, Zschr. f. Immun. forsch., Bd. 71, 1931, blz. 522.
43. Brahn en Schiff, Klin. Wochenschr., Bd. 5, 1926, blz. 1455.
Bd. 8, 1929, blz. 1523.
44. Hallauer, Zschr. f. Immun. forsch., Bd. 63, 1929, blz. 287.
45. Davidsohn, Journ. of Immunol., 1931, Vol. XX, blz. 239.
46. Gedda en Pecorella, Giorn. di Batt. e Immun., Bd. 11, 1930.
Cit. Hallauer, Zschr. f. Immun. forsch., Bd. 76, 1932, blz. 119.
47. Plattner en Hintner, Wien. Klin. Wochenschr., 1931, bl. 882.
48. Hamburger, Acta Path. et Microbiol. Scand., Vol. 7, 1930, blz. 191.

49. Hallauer, Zschr. f. Immun. forsch., Bd. 76, 1932, blz. 119.
50. Ottensooser en Zurukzoglu, Klin. Wochenschr., Bd. 11, 1932, blz. 719.
51. Ottensooser en Lenzinger, Zschr. f. Immunforsch., Bd. 81, 1934, blz. 354.
52. Dold en Rosenberg, Klin. Wochenschr., Bd. 7, 1928, blz. 394.
53. Ottensooser, Zschr. f. Immun. forsch., Bd. 77, 1932, bl. 140.
54. v. Euler en Brunius, Zschr. f. Immun. forsch., Bd. 68, 1930, blz. 124; Bd. 72, 1931, blz. 65.
55. Schiff, Ueber die gruppenspezifischen Substanzen des Menschlichen Körpers. 1931.
56. Witebsky en Okabe, Zschr. f. Immun. forsch., Bd. 52, 1927, blz. 359.
57. Kritschewsky en Schwarzmann, Klin. Wochenschr., 1927, blz. 2090.
58. Schwarzmann en Joukoff-Werejnikoff, Zschr. f. Immun. forsch., Bd. 76, 1932.
59. Brahn, Schiff en Weinmann, Klin. Wochenschr., 1932, blz. 1592.
60. Ottensooser, Klin. Wochenschr., 1932, blz. 1716.
61. Brahn en Schiff, Klin. Wochenschr., 1929, blz. 1523.
62. Lehrs, Zschr. f. Immun. forsch., Bd. 66, blz. 175.
63. Yasui, Zschr. f. Immun. forsch., Bd. 63, 1929, blz. 215.
64. Brockmann, Zschr. f. Immun. forsch., Bd. 9, 1911, blz. 87.
65. Landsteiner en Miller, Journ. of Exper. Med., Vol. 42,, 1925, blz. 853 en blz. 863.
66. Marberg, Z. f. Immun. forsch., Bd. 80, 1933, blz. 340.
67. Holzer, Klin. Wochenschr., 1932, blz. 243.
68. v. Loghem, Ned. T. v. Gen., 1908, I blz. 4.
69. Thomsen, in Handbuch der Pathog. Mikro-organ., Kolle, Kraus, Uhlenhuth, Hoofdstuk Haemolysine.
70. Lattes, Die Individualität des Blutes, 1925, blz. 50.

STELLINGEN.

I.

Bij de bloedgroepbepaling dient men behalve de bloedlichaampjes ook het serum te onderzoeken.

II.

De namen eu- en pseudoglobuline zonder meer duiden niet steeds dezelfde eiwitfracties aan en dienen daarom vermeden te worden.

III.

Voor de opvatting, dat een ontstekingsproces van de schildklier de oorzaak van het idiopathisch myxoedeem zou zijn, bestaan geen voldoende gronden.

IV.

Bij de groeiremming van bacteriën in hun antivirus spelen naast niet zeker bewezen specifieke factoren ook aspecifieke een rol.

V.

Voor het optreden der hypoglycaemische reactie is niet alleen de lage bloedsuikerwaarde van belang, doch ook de tijd binnen welke deze bereikt wordt.

VI.

Het verdient aanbeveling aan elke bloedtransfusie de biologische proef volgens Oehlecker te laten voorafgaan.

VII.

Bij het gebruik van paraldehyd voor basis-narcose verdient de intraveneuse toediening de voorkeur boven de rectale. Presse Médicale 28 Febr. 1934 blz. 331.

VIII.

Het ware wenschelijk, dat bij de wettelijke regeling van het ziekenfondswezen aan de fondsen o.a. de eischen van vrije artsenkeuze en een welstandsgrens werden gesteld.

IX.

Bij de indicatie tot tonsillectomie in gevallen van chronisch rheumatische toestanden is bloedonderzoek een waardevol hulpmiddel.

X.

Bij verdenking op beginnende multipele sclerose onderzoeke men het vestibulair orgaan.
