Het kapselpolysaccharide van Klebsiella pneumoniae type C (Bacterium pneumoniae Friedländer type C)

HET KAPSELPOLYSACCHARIDE VAN KLEBSIELLA PNEUMONIAE TYPE C.

(BACTERIUM PNEUMONIAE FRIEDLÄNDER TYPE C).

J. K. BOTTEMA.

Diss. Utrecht 1940

HET KAPSELPOLYSACCHARIDE VAN KLEBSIELLA PNEUMONIAE TYPE C.

(BACTERIUM PNEUMONIAE FRIEDLÄNDER TYPE C).

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS DR. F. H. QUIX, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE TE VERDEDIGEN OP DONDERDAG 11 JULI 1940, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

JAN KORNELIS BOTTEMA

GEBOREN TE UTRECHT

1940

DRUKKERIJ VAN DER BOOM — 's-GRAVENHAGE

Aan mijn ouders.

Aan mijn aanstaande vrouw.

Bij het verschijnen van dit proefschrift wil ik allen, van wien ik gedurende mijn studie onderricht mocht ontvangen en aan hen, die mij op andere wijze bij de bewerking van dit proefschrift behulpzaam zijn geweest, mijn erkentelijkheid betuigen.

In de eerste plaats wil ik U, Hooggeleerde DE GRAAFF, Hooggeachte Promotor, dank zeggen voor Uw leiding bij het thans beëindigde onderzoek en voor de zelfstandigheid, welke Gij mij hierbij hebt gelaten. Aan den tijd, welke ik op Uw laboratorium werkzaam ben geweest, zal ik steeds de meest aangename herinneringen bewaren. Het verheugt mij zeer, dat ik nog eenigen tijd Uw assistent heb mogen zijn.

U, Hooggeleerde COHEN, betuig ik mijn dank voor Uw onderwijs in de Physische Chemie, alsmede voor Uw toestemming eenige van mijn werkzaamheden op Uw laboratorium te mogen verrichten.

Hooggeleerde SCHOORL, Uw raadgevingen zijn voor mij van groote waarde geweest.

Hooggeleerde KRUYT, Uwe colleges Kolloïdchemie en Phasenleer heb ik met groote belangstelling gevolgd.

Hooggeleerde KÖGL, voor Uw onderwijs in de Organische Chemie zeg ik U hartelijk dank.

Hooggeleerde SNIJDERS, voor Uw belangstelling in mijn werk ben ik U zeer erkentelijk.

U, Zeergeleerde SCHLEMPER, zeg ik hartelijk dank voor Uw practische raadgevingen en aanwijzingen.

Ook komt een woord van dank toe aan het personeel van het Pharmaceutisch Laboratorium, in het bijzonder aan den Heer KELDER.

HOOFDSTUK I.

HISTORISCH OVERZICHT.

Dat microörganismen het vermogen bezitten polysacchariden te synthetiseeren, was reeds in de vorige eeuw bekend. Bij het onderzoek van de celbestanddeelen van bacteriën, gisten en schimmels kon in vele gevallen de aanwezigheid van op glycogeen gelijkende stoffen worden geconstateerd; gewoonlijk werd aangenomen, dat deze koolhydraten de rol van reservestof vervulden.

Meer aandacht werd besteed aan de polysacchariden, welke door bacteriën geproduceerd, buiten het bacterielichaam werden aangetroffen. Vele soorten bacteriën zijn n.l. in staat groote hoeveelheden gom- of slijmachtige stoffen te produceeren, welke zijn waar te nemen òf in de cultuurvloeistof, òf als een omhulsel van de cel, een z.g. kapsel. Deze twee verschijnselen komen meestal gelijktijdig voor; de meeste onderzoekers zijn dan ook van meening, dat de in vloeibare cultuurmedia aanwezige slijmstoffen ontstaan door het in oplossing gaan van een of meer bestanddeelen van de kapsel. Een groot aantal van deze bacterieslijmen is in de loop der jaren onderzocht, in hoofdzaak afkomstig van niet-pathogene kapselbacteriën. In alle gevallen bleek men met polysacchariden te doen te hebben. Deze koolhydraten waren van een eenvoudige samenstelling, gewoonlijk kon slechts één pentose of hexose als hydrolyseproduct worden geïsoleerd, een enkele maal kwamen twee monosacchariden als bouwsteen voor. Steeds meer mededeelingen verschenen over door bacteriën geproduceerde arabanen, dextranen, laevulanen en galactanen, het bleef echter bij een vermeerdering van het feitenmateriaal.

Inmiddels was komen vast te staan, dat bij pathogene bacteriën verband bestond tusschen virulentie en het bezit van een kapsel. Pathogene kapselbacteriën zijn meestal alleen dan virulent, wanneer ze haar kapsel bezitten, verlies van de kapsel doet de virulentie geheel of gedeeltelijk verdwijnen. Eenige kapselpolysacchariden van pathogene bacteriën werden in studie genomen, zonder dat zich echter nieuwe gezichtspunten voordeden.

Deze stand van zaken veranderde, toen in 1917 Dochez en Avery in bacterievrije filtraten van een pneumococcencultuur een stof aantoonden, welke met het homologe immuunserum een precipitatiereactie te zien gaf (1). Dergelijke „soluble specific substances" waren reeds lang bekend. Zij waren opgevat als eiwitstoffen, vrijgekomen door autolyse. Genoemde onderzoekers konden echter aantoonen, dat het hier geen autolytisch, maar een stofwisselingsproduct betrof. Heidelberger en Avery slaagden er eenige jaren later in deze „soluble specific substance" te isoleeren: het bleek een polysaccharide te zijn (2).

Op grond van serologische reacties is de groep der pneumococcen in een aantal typen te verdeelen. Heidelberger, Goebel en Avery onderzochten de soluble specific substances (gewoonlijk S.S.S. genoemd) van de meest voorkomende typen (2, 3), en constateerden, dat uit verschillende typen verschillende koolhydraten geïsoleerd konden worden, die ieder tot in hooge verdunningen (1 : 6.000.000.) een zeer specifieke precipitatiereactie gaven met een immuunserum, gericht tegen een stam van hetzelfde type, als waaruit het polysaccharide was bereid. Bovendien bleek voor elk type, dat de S.S.S. identiek was met de kapselstof van de onderzochte stam. Uit kapsellooze stammen, die geen type-specificiteit bezitten, kon geen type-specifiek polysaccharide worden geïsoleerd.

Verder kwam aan het licht, dat de geïsoleerde polysacchariden het vermogen antistoffen op te wekken missen, het zijn dus geen *antigenen*, eerst na gekoppeld te zijn aan een eiwit

krijgen zij een antigeenkarakter. Dergelijke stoffen staan bekend als *rest-antigenen* of *haptenen*, zij bepalen de immunologische specificiteit van het volledige antigeen en reageeren specifiek met het homologe immuunserum. Algemeen wordt thans aangenomen, dat de type-indeeling van de pneumococcen berust op de aanwezigheid van polysacchariden in de kapsel, die de rol van hapteen spelen en bij elk type een andere chemische samenstelling hebben. De soort-specificiteit zou dan bepaald worden door de samenstelling van het lichaamseiwit, het is echter niet onmogelijk dat hier bovendien een z.g. somatisch koolhydraat een rol speelt.

Niet alleen bij de pneumococcen, maar ook bij vele andere bacteriën, bij welke een type-indeeling mogelijk was, werden polysacchariden met hapteen-eigenschappen aangetroffen. Zoo konden uit de verschillende typen der meningococcen, gonococcen, staphylococcen, tuberkelbacteriën en Klebsiella-soorten, type-specifieke polysacchariden geïsoleerd worden, zelfs bij de erythrocyten van verschillende bloedgroepen bleek dit het geval te zijn.

Een chemisch onderzoek bracht aan het licht, dat de serologisch actieve koolhydraten gecompliceerder van bouw waren dan de uit oudere onderzoekingen bekende polysacchariden. Meestal kwamen twee of meer monosacchariden als bouwsteen voor. Behalve pentosen en hexosen werden aangetroffen hexuronzuren, aminosuikers, inosiet en acetylgroepen.

Dat de specificiteit van een antigeen bepaald wordt door de chemische structuur van een betrekkelijk klein gedeelte van het groote antigeen-(eiwit) molecuul, was reeds uit het werk van Landsteiner gebleken. Deze bereidde kunstmatige antigenen door aan een bepaald eiwit aromatische diazoverbindingen te koppelen. Het bleek, dat aard en plaatsing van de in de benzolkern ingevoerde substituenten de serologische specificiteit van het antigeencomplex bepaalden. Zoo geeft een proteïne, gekoppeld aan o-aminobenzolsulfo-

zuur, een precipitaat met het serum, bereid door proefdieren met dit antigeen in te spuiten, maar niet met een serum, bereid met het overeenkomstige para-derivaat; omgekeerd reageert het serum, bereid met p-aminobenzolsulfozuur-proteïne, alleen met deze stof, het ortho-derivaat geeft met dit serum geen reactie. Invoering van andere groepen in de benzolring verandert eveneens de specificiteit, evenals vervanging van de benzolkern door b.v. naphtaline. Niet alleen plaatsingsisomerie is van invloed, maar ook sterische isomerie, zoo geven de drie isomere wijnsteenzuren gekoppeld aan proteïne (via eenzelfde aromatische diazoverbinding) drie immunologisch verschillende antigenen.

Nadat bekend geworden was, welk een rol polysacchariden van verschillenden bouw bij de type-indeeling van sommige bacteriesoorten speelden, hebben Goebel, Avery en Babers het werk van Landsteiner voortgezet, door ook suikers in het onderzoek te betrekken. Zij vonden, dat er een duidelijk immunologisch verschil bestond tusschen antigenen van proteïne, gekoppeld aan glucose en galactose ([4]), ook bij α- en β-glucosiden zijn dergelijke verschillen waar te nemen ([5]). Bij de meest recente onderzoekingen zijn ook uronzuren ([6a]), disacchariden ([6b]) en aldobionzuren ([6c]) betrokken, waarbij o.a. bleek, dat de plaats van de zuurstofbrug in disacchariden van invloed is op de serologische specificiteit.

Uit het resultaat van deze onderzoekingen valt dus op te maken welke bouwsteenen en groepeeringen in een polysaccharidemolecuul de specificiteit van het hapteen, en dus van het geheele antigeen, bepalen.

Over het algemeen wordt aangenomen, dat polysacchariden geen antigenen zijn. Er zijn in de laatste jaren eenige publicaties verschenen, waaruit blijkt, dat onder bepaalde omstandigheden wel antistofvorming kan optreden. Zoo vond b.v. Zozaya, dat polysacchariden geabsorbeerd aan kool, collodium, aluminiumhydroxyde of caseïne, na injectie bij

proefdieren specifieke antilichamen opwekken ([7]), andere onderzoekers zijn er echter niet in geslaagd dit verschijnsel te reproduceeren ([8]).

Boivin en Mesrobeanu en ook Parachivesco slaagden erin uit enkele Gram-negatieve bacteriesoorten een complex te isoleeren, bestaande uit polysaccharide en phosphatide, met zoowel toxische als antigene eigenschappen, de beide componenten zelf zijn noch antigeen, noch toxisch ([9], [10]). Ook Lisbonne en Monnier ([11]), Raistrick en Topley ([12]) en Haas ([13]) troffen lipoïd-polysaccharidecomplexen aan bij vertegenwoordigers van de geslachten Brucella en Salmonella.

Dit proefschrift omvat het onderzoek van de chemische en serologische eigenschappen van een polysaccharide, voorkomend bij een tot het geslacht Klebsiella behoorende bacterie, en wel op verzoek van Prof. Dr. E. P. Snijders te Amsterdam van het specifieke polysaccharide van Bacterium pneumoniae Friedländer, type C.

Nog voor de immunologische beteekenis van de kapselpolysacchariden bekend was geworden, waren reeds pogingen gedaan iets naders te weten te komen over de polysaccharidefractie van Friedländer's bacterie (Klebsiella pneumoniae Friedländer).

In 1920 isoleerde Toenissen ([14]) uit de kapsels van een Friedländerstam — van welk type is niet bekend — een niet reduceerend stikstofvrij polysaccharide, dat een roode kleur met jodium gaf. Na hydrolyse ontstonden reduceerende suikers, waarvan er een geïdentificeerd werd als galactose. Door Kramàr ([15]) is dit later bevestigd.

Toen werd bekend dat de „soluble specific substance" van de pneumococ, in 1917 ontdekt door Dochez en Avery ([1]), een polysaccharide was, en wel identiek met de kapselstof van dit organisme ([2], [3]).

Mueller, Smith en Litarczek ([16]) achtten het

daarom zeer waarschijnlijk, dat Toenissen's koolhydraat ook specifieke eigenschappen bezat, zij slaagden erin uit een Friedländerstam een koolhydraathoudende stof te isoleeren met 1.3 % N, die in hooge verdunningen met homoloog antiserum een specifieke precipitatiereactie gaf.

Julianelle (17) had vastgesteld, dat ook bij Friedländerbacteriën een type-indeeling mogelijk was, en wel, evenals bij de pneumococcen, op grond van serologische reacties. Heidelberger, Goebel en Avery, dezelfden, die reeds de type-specifieke polysacchariden der pneumococcen in studie hadden genomen, betrokken nu ook drie typen der Friedländergroep — door Julianelle aangeduid met A, B en C — in hun onderzoek. Ook hier werden polysacchariden gevonden, welke, zoowel chemisch als immunologisch, verschilden (18, 19, 20). Het bleken alle stikstofvrije koolhydraten te zijn met zure eigenschappen, die tot een verdunning 1 : 2.000.000 een specifieke precipitatiereactie geven met het homologe *) antiserum.

Bij hydrolyse met verdund zwavelzuur ontstonden reduceerende suikers, bij alle drie typen bleek glucose aanwezig te zijn, evenals een aldobionzuur, bestaande uit een hexuronzuur en een hexose.

Type A.

Goebel en Avery (18) isoleerden uit culturen van een Friedländerstam, behoorende tot het type A, een amorph polysaccharide met zure eigenschappen, een 0.5 %-oplossing kleurde Congopapier blauw; het gaf geen jodiumreactie en werd volledig geprecipiteerd door neutraal en basisch loodacetaat. Zure hydrolyse gaf een reduceerende oplossing, welke een sterke uronzuurreactie vertoonde. De volgende hydrolyseproducten konden worden geïdentificeerd: een aldobionzuur, glucose en een tweede disaccharidezuur, voor-

*) Onder homoloog wordt hier verstaan: gericht tegen een stam van hetzelfde *type* als waaruit het betreffende polysaccharide is bereid.

komend in een verhouding van ongeveer 1 : 1 : 1. Het aldobionzuur bleek te bestaan uit glucose en glucuronzuur, het andere disaccharidezuur is niet nader onderzocht ([19]).

Type B.

Heidelberger, Goebel en Avery ([20]) isoleerden het specifieke polysaccharide van Friedländer's bacterie type B, welk een amorphe stof bleek te zijn, een 0.5%-oplossing had een zure reactie t.o.v. Congopapier. De stof loste moeilijk op in water, echter gemakkelijk in verdunde NaOH. Met neutraal en basisch loodacetaat ontstond een precipitaat. Als hydrolyseproducten werden gevonden glucose en een niet nader onderzocht aldobionzuur.

Type C.

Het specifieke koolhydraat van type C is onderzocht door Goebel en Avery ([18]). Het was een in water oplosbare stof, ook hier reageerde een 0.5 %-oplossing zuur op Congorood. Een precipitaat werd verkregen met oplossingen van uranylnitraat, geconcentreerd $Ba(OH)_2$ en neutraal en basisch loodacetaat; de jodiumreactie was negatief. Na hydrolyse bleken, evenals bij type B, glucose en een aldobionzuur aanwezig te zijn.

Een overzicht van de eigenschappen der drie type-specifieke stoffen geeft onderstaande tabel:

Type	$[\alpha]_D$	zuur-aequiv.	%C	%H	hydrolyse-producten	hoogste verdunning prec. met hom. konijnenserum
A	-100°	430	43.9	6.0	aldobionzuur glucose disaccharide-zuur.	1 : 2 000 000
B	+100°	680	44.6	6.1	aldobionzuur glucose	1 : 2 000 000
C	+100°	680			aldobionzuur glucose	1 : 2 000 000

Het onderzoek van het specifieke koolhydraat van Bacterium pneumoniae Friedländer type C, in dit proefschrift beschreven, bepaalt zich tot de isolatie van de zuivere stof, het bepalen van enkele chemische constanten, de identificatie van eenige hydrolyseproducten en het onderzoek van de serologische eigenschappen. Het lag in de bedoeling allereerst te trachten de bevindingen van Heidelberger, Goebel en Avery te reproduceeren, om daarna zoo mogelijk het onderzoek uit te breiden.

Zooveel mogelijk hebben wij getracht bij ieder onderdeel volgens de door genoemde auteurs aangegeven methoden te werk te gaan, niet alleen, omdat zij de eenigen zijn geweest die de polysacchariden der drie Friedländertypen hebben bestudeerd, maar ook, omdat een literatuuronderzoek — dat ook de type-specifieke stoffen van vele andere bacteriesoorten omvatte — aan het licht bracht, dat de door hen uitgewerkte of toegepaste methoden de voorkeur verdienden boven die van anderen.

Elk van de nu volgende hoofdstukken zal daarom aanvangen met een beschrijving van de wegen, welke Heidelberger, Goebel en Avery hebben ingeslagen en vervolgens welke wijzigingen en verbeteringen zij in de loop der jaren hebben aangebracht.

LITERATUUR.

1. A. R. Dochez, O. T. Avery, Journ. exp. Med. **26**, 477 (1917).
2. M. Heidelberger, O. T. Avery, Journ. exp. Med. **38**, 73 (1923).
3. M. Heidelberger, O. T. Avery, Journ. exp. Med. **40**, 301 (1924).
   M. Heidelberger, W. F. Goebel, Journ. exp. Med. **42**, 367, 727 (1925).
   M. Heidelberger, W. F. Goebel, Journ. exp. Med. **42**, 613 (1926).
4. O. T. Avery, W. F. Goebel, Journ. exp. Med. **50**, 533 (1929).

5. O. T. Avery, W. F. Goebel, F. H. Babers, Journ. exp. Med. **55**, 769 (1932).

6. a. W. F. Goebel, R. D. Hotchkiss, Journ. exp. Med. **66**, 191 (1937).

   b. W. F. Goebel, O. T. Avery, F. H. Babers, Journ. exp. Med. **60**, 599 (1934).

   c. W. F. Goebel, Journ. exp. Med. **68**, 469 (1938), **69**, 353 (1939).

7. J. Zozaya, Journ. exp. Med. **55**, 325 (1932).

8. S. C. Wong, T. T'ung, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **38**, 668, **39**, 161 (1938).

9. A. Boivin, L. Mesrobeanu, C. r. Soc. Biol. **114**, 307, **115**, 306 (1933), **118**, 612 (1934)), **124**, 1176 (1937).

10. Z. Parachivesco, C. r. Soc. Biol. **121**, 175 (1936).

11. M. Lisbonne, P. Monnier, C. r. Soc. Biol. **123**, 1114 (1936).

12. H. Raistrick, W. W. C. Topley, Brit. Journ. exp. Path. **15**, 113 (1934).

13. R. Haas, Zeitsch. für Imm. forschung **91**, 254 (1937).

14. E. Toenissen, Centr. für Bakt. etc. Abt. I (Orig.) **85**, 225 (1920).

15. E. Kramàr, Centr. für Bakt. etc. Abt. I (Orig.) **87**, 401 (1922).

16. J. H. Mueller, D. E. Smith, S. Litarczek, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **22**, 373 (1925).

17. L. A. Julianelle, Journ. exp. Med. **44**, 113, 683, 735 (1926).

18. W. F. Goebel, O. T. Avery, Journ. exp. Med. **46**, 601 (1927).

19. W. F. Goebel, Journ. biol. Chem. **74**, 619 (1927).

20. M. Heidelberger, W. F. Goebel, O. T. Avery, Journ. exp. Med. **42**, 701 (1925).

HOOFDSTUK II.

ISOLATIE VAN HET TYPE-SPECIFIEKE POLYSACCHARIDE.

A. De gebruikte stam.

Voor de isolatie van het specifieke polysaccharide van Klebsiella pneumoniae type C gebruikten wij een stam, ons beschikbaar gesteld door prof. dr. E. P. Snijders, directeur van het Laboratorium voor Tropische Hygiëne te Amsterdam. Zij was door dr. L. A. Julianelle te Wisconsin geïsoleerd uit het bloed van een pneumoniepatiënt, en droeg de aanduiding F 10. Serologisch behoorde zij tot het type C.

Morphologische eigenschappen: Gram-negatieve, asporogene, polymorphe staafjes, onbeweeglijk en facultatief anaëroob. Een duidelijke kapsel is aanwezig.

Cultureele eigenschappen: op vloeibare voedingsbodems is de groei diffuus troebel met een sediment, op vaste voedingsbodems ontwikkelen zich vochtige, gladde, verheven kolonies.

Gelatine wordt niet vervloeid,
in peptonwater geen indolvorming,
reactie van Voges-Proskauer negatief,
methylroodproef positief,
zuur en gas uit: glucose
lactose
saccharose
glycerine
adoniet
dulciet,
melk: zure stremming,
nitraat wordt tot nitriet gereduceerd,
groeit op de citraatvoedingsbodem van Koser.

De Graaff heeft de biochemische eigenschappen onderzocht van een aantal vertegenwoordigers van de soort Klebsiella pneumoniae, hij kwam op grond van de verkregen resultaten tot een indeeling van deze soort in vier typen: Frankland, Friedländer, Misk en Aërogenes (1).

Wielenga onderzocht zoowel de serologische, als de biochemische eigenschappen van een aantal Klebsiellasoorten, zijn resultaten wezen duidelijk op een overeenkomst van de serologische indeeling met de biochemische indeeling van de Graaff (2). Later is gebleken, dat alle stammen van het type A tot de Graaff's Franklandtype behooren, terwijl verder de typen B en C overeenkomen met resp. Aerogenes- en Friedländertype.

De hier beschreven stam F 10, welke, zooals reeds gezegd, serologisch tot het type C behoort, vertoont cultureel alle eigenschappen van het Friedländertype.

B. Historisch overzicht der isolatiemethoden.

In de inleiding is reeds vermeld, dat de specifiek reageerende koolhydraten geen antigenen zijn, maar haptenen. Zij komen dus in de cel voor gebonden aan het lichaamseiwit, althans moet dit met een deel van het aanwezige polysaccharide het geval zijn. Het is niet onmogelijk, dat een gedeelte van het polysaccharide in vrijen toestand optreedt.

Als uitgangsmateriaal voor de isolatie werd aanvankelijk veelal gebruik gemaakt van suspensies van de betreffende bacterie, welke men verkreeg door afslibben van agarcultures. Men ging dus uit van intacte bacteriecellen. Het was daarom noodzakelijk het koolhydraat van het somatische eiwit los te maken en daarna dit eiwit te verwijderen. Gewoonlijk geschiedden beide bewerkingen gelijktijdig door gebruik te maken van physische of chemische methoden, of een combinatie van beide.

Toenissen voerde de afsplitsing uit door gedroogde bacteriën bij 100° met 1 % NaOH te behandelen (3).

Tomczik maakte het kapselpolysaccharide van B. lactis

aerogenes vrij door de droge cellen 4 uur met 100 % KOH op 37° te houden ([4]).

Ook werd vaak behandeling met verdunde zuren toegepast, b.v. door suspensies met azijnzuur op 100° of hooger te verhitten. Morgan paste dit toe bij B. dysenteriae ([5]). Zinsser en Parker bij typhus- en tuberkelbacteriën en Przesmycki bij meningococcen ([6]). Verder werd wel gebruik gemaakt van verdunde zuren in de koude, o.a. door Wieghard en Julianelle bij de isolatie van staphylococcenpolysacchariden ([7]). Extractie van de cellen met verdund trichloorazijnzuur werd toegepast door Malek op B. typhi flavum ([8]) en door Boivin en Mesrobeanu op enkele Salmonellasoorten ([9]).

Heidelberger, Avery en Goebel hebben in den loop der jaren de meest uiteenloopende methoden toegepast op pneumococcen en pneumobacteriën. Ook zij maakten gebruik van behandeling met zuur in de warmte ([10]), maar tevens van een herhaald bevriezen en ontdooien der cellen, of oplossen in gal (pneumococcen), of ook wel van aantasten van het celproteïne door trypsine ([11]).

Tenslotte moet nog worden vermeld de methode van Fuller, welke staphylococcen destrueerde door oplossing in formamide bij 150° ([12]).

Het na de splitsing vrijgekomen eiwit was gewoonlijk gemakkelijk te verwijderen, aangezien het vrijwel volledig was geprecipiteerd of grootendeels was ontleed, terwijl het polysaccharide in oplossing was gebleven. Indien nog een verdere verwijdering van het eiwit noodig bleek, werd door de meeste onderzoekers een gefractioneerde precipitatie uitgevoerd met alkohol, aceton of neutrale zouten, zooals NaCl en $(NH_4)_2SO_4$.

Behalve de eiwitten, moesten ook andere, vreemde stoffen van het polysaccharide worden gescheiden.

Wanneer phosphaten werden aangetroffen, konden deze worden verwijderd door de specifieke stof eenige malen met

ijsazijn te precipiteeren uit een oplossing van het polysaccharide, waaraan 20% Na-acetaat was toegevoegd (13). Meestal kon men echter, na de onteiwitting, de afwezigheid van phosphaten constateeren.

Eventueel aanwezig glycogeen kon worden ontleed door inwerking van speeksel, of door gefractioneerde precipitatie met Cu-acetaat (13).

Indien bij de isolatie geen sterke zuren waren gebruikt, werd het polysaccharide als zout verkregen. Dit kon dan in het vrije zuur worden omgezet door precipitatie met alkohol of aceton uit zoutzure oplossing. Uitwasschen met alkohol of aceton, ook vaak dialyse of electrodialyse werden toegepast om resten zoutzuur en andere anorganische stoffen te verwijderen. Op deze wijze verkreeg men steeds geheel aschvrije producten.

In latere jaren kwamen vele onderzoekers tot het inzicht, dat talrijke van de hierboven genoemde bewerkingen van dien aard waren, dat er groote kans bestond op veranderingen in het polysaccharidemolecuul. Al kreeg men dan producten in handen, welke een of meer specifieke serologische reacties vertoonden, de vraag bleef, of zij in de cel wel in dezelfde toestand aanwezig waren.

Avery en Goebel zijn de eersten geweest, die bewezen hebben, dat deze vermoedens gegrond waren (10). Zij konden aantoonen, dat behandeling met verdunde loogoplossingen reeds in de koude een belangrijke invloed had op de serologische en chemische eigenschappen van het specifieke koolhydraat van pneumococcus type I. Werd n.l. dit polysaccharide geïsoleerd op een wijze, waarbij behandeling met loog vermeden was, dan verkreeg men een stof, welke antigene eigenschappen bezat *), deze eigenschappen waren verdwenen, wanneer de stof blootgesteld was geweest aan de inwerking van loog. Beide stoffen reageerden even sterk

*) Muizen, welke waren behandeld met de beschreven stof, bleken immuun te zijn tegen infectie met pneumococcus type I. Een zuiver hapteen is dit polysaccharide dus niet.

met homoloog antiserum, maar een verzadigingsproef bracht verschillen aan het licht. Wanneer men aan het serum zoolang de met loog behandelde stof toevoegde, totdat geen precipitaat meer werd gevormd, reageerde het, na verwijdering van het neerslag, nog wel met het product waarop geen loog had ingewerkt. Het omgekeerde was niet het geval.

Ook kwam een verschil in optische draaiing en van het C-, H- en N-gehalte aan het licht. Uit een nader onderzoek bleek, dat door de behandeling met loog acetylgroepen van het molecuul werden afgesplitst. Deze verandering in de structuur heeft dus de genoemde wijzigingen in de serologische eigenschappen tot gevolg. Bij de typen II en III konden dergelijke verschijnselen niet worden waargenomen. Wel kon aan alle drie typen worden geconstateerd een afneming van de viscositeit der oplossingen na behandeling met zuren en basen in de warmte, ook verhitting op 100° of hooger, zonder toevoeging van reagentia, deed de viscositeit dalen ([14]). Heidelberger, Kendall en Scherp toonden bovendien aan, dat de hoeveelheid antilichaam, door eenzelfde gewichtshoeveelheid polysaccharide uit homoloog antiserum geprecipiteerd, na deze bewerking daalde.

Al deze ondervindingen hebben Heidelberger, Kendall en Scherp ertoe geleid een isolatiemethode voor pneumococcenpolysacchariden uit te werken, waarbij het gebruik van sterke zuren en basen en van herhitting zoo veel mogelijk vermeden werd ([13]). Aangezien deze methode veel navolging heeft gevonden, en ook wij haar als leidraad hebben gekozen, zullen wij in het kort een beschrijving ervan geven.

De betreffende stam, welke kort tevoren door een muis gepasseerd was, werd geënt op glucose-phosphaatbouillon en 3 dagen bij 37° bebroed. Vervolgens behandelden zij de culturen gedurende een nacht met 1 % phenol en dampten dan in tot $^1/_{10}$ van het oorspronkelijke volumen. Dit indampen geschiedde in vacuum, waarbij de temperatuur niet boven 35° kwam. Het polysaccharide werd neergeslagen met alkohol

en Na-acetaat en, na een nacht staan, het neerslag afgecentrifugeerd. Er ontstonden nu drie lagen: de bovenste bevatte geen specifieke stof en werd weggeworpen, evenals de onderste, zeer visceuze laag, waarin wel serologisch actief materiaal aanwezig bleek, maar ook zeer veel verontreinigingen. De middelste laag, welke een gomachtige consistentie had en eveneens serologisch actief was, werd verder verwerkt. De gom werd gesuspendeerd in een zure acetaatbuffer (pH ongeveer 5) en het onoplosbare gedeelte door centrifugeeren verwijderd; vervolgens werd het polysaccharide weer neergeslagen met alkohol, afgecentrifugeerd en opnieuw in een zure acetaatbuffer opgelost. Verwijdering van het eiwit uit deze oplossing had plaats door middel van de methode van Sevag ([15]). Hiertoe werd de oplossing gedurende ½ uur krachtig geschud met $^1/_5$ volumen chloroform en $^1/_{25}$ volumen butylalkohol en hierna gecentrifugeerd. Thans bevond zich tusschen de chloroform en de waterige oplossing een halfvaste emulsie, welke voor een groot gedeelte uit eiwit bleek te bestaan. De bovenstaande vloeistof werd afgeheveld en opnieuw met chloroform en butylalkohol behandeld, deze bewerking werd zoolang herhaald tot geen emulsielaag meer ontstond; het polysaccharide werd vervolgens met alkohol neergeslagen. Ook uit de emulsielaag kon nog zuiver polysaccharide worden verkregen door met water uit te wasschen en het waschwater op dezelfde wijze te zuiveren.

Glycogeen verwijderden zij door gefractioneerde precipitatie met Cu-acetaat, of, indien dit niet mogelijk bleek, door inwerking van speeksel; phosphaat door precipitatie met ijsazijn uit een 20 % Na-acetaatoplossing.

Tenslotte werd het gezuiverde product neergeslagen met alkohol en wat Na-acetaat, met alkohol uitgewasschen en gedroogd. Op deze wijze verkregen zij een neutraal reageerrend Na-zout.

Het valt echter niet te ontkennen, dat de op deze wijze verkregen preparaten minder zuiver zijn dan de vroeger door Heidelberger en medewerkers bereide, wat vooral tot

uiting komt in het stikstofgehalte. De polysacchariden van de pneumococcentypen II en III, welke vroeger geheel stikstofvrij bereid konden worden, hadden thans een stikstofgehalte varieerende van 0.06 tot 0.73 %. Desondanks zijn wij begonnen met, althans in groote lijnen, de voorschriften van genoemde onderzoekers te volgen. Wat de resultaten hiervan waren en welke wijzigingen wij later hebben aangebracht, zullen wij in het nu volgende deel van dit hoofdstuk vermelden.

C. Eigen onderzoek.

1. De gebruikte voedingsbodem.

Gezien de ervaringen van anderen, waarvan wij in het voorgaande een overzicht hebben gegeven, hebben wij gemeend aan het gebruik van een vloeibare voedingsbodem de voorkeur te moeten geven boven dat van een vaste. In vloeibaar milieu zal n.l. een groot gedeelte van het specifieke polysaccharide in vrije toestand aanwezig zijn, wat af te leiden is uit het feit, dat bacterievrije filtraten geen antigene eigenschappen bezitten. Afsplitsing van het lichaamseiwit, met alle hieraan verbonden nadeelen, is dan niet noodig.

Wanneer in de literatuur melding wordt gemaakt van het gebruik van een vloeibaar cultuurmedium voor de isolatie van bacterie-polysacchariden, is dit bijna steeds alkalische bouillon of peptonwater, eventueel met toevoeging van phosphaat of glucose. Van het begin af hadden wij tegen dergelijke voedingsbodems bezwaren. Wij achtten het n.l. wenschelijk, dat in de op te werken cultures naast het specifieke koolhydraat zoo weinig mogelijk vreemde stoffen aanwezig waren, het aantal bewerkingen, dat voor de zuivering noodzakelijk was, kon dan tot een minimum beperkt blijven. Nu bestond er een zeer groote kans, dat eenige, in pepton aanwezige stoffen aanleiding zouden kunnen geven tot moeilijkheden bij de zuivering van ons product. G o e b e l had reeds ontdekt, dat in pepton geregeld het specifieke polysaccharide

van bloedgroep A voorkwam ([16]), hetgeen niet te verwonderen is, gezien de bereiding van het pepton uit dierlijk materiaal. Het is tot nu toe steeds gelukt de pneumococcenpolysacchariden van het bloedgroepkoolhydraat te scheiden, het is echter de vraag of deze scheiding ook bij andere bacteriepolysacchariden is uit te voeren. Ook bestaat de mogelijkheid, dat in de voedingsbodem aanwezige stoffen serologische verwantschap bezitten met het te isoleeren product, zoodat bij het immunologisch onderzoek complicaties op kunnen treden. Kort geleden is een dergelijk geval waargenomen, en wel door Goebel, Beeson en Hoagland ([17]). Zij stelden een groote overeenkomst in chemische samenstelling en serologische eigenschappen vast tusschen het specifieke polysaccharide van bloedgroep A en dat van pneumococcus type XIV.

Ook het voorkomen van glycogeen of daarop gelijkende stoffen in Liebig's vleeschextract kwam ons minder wenschelijk voor.

Dit alles is voor ons een reden geweest het gebruik van bouillon en andere peptonhoudende voedingsbodems te vermijden, en voor ons onderzoek een synthetische voedingsbodem te kiezen. Deze heeft bovendien het voordeel aanmerkelijk goedkooper te zijn.

Kauffmann en Smit ([18]) en Folmpers ([19]) hebben in 1935 aangetoond, dat in verschillende, bij het bacteriologisch drinkwateronderzoek in gebruik zijnde voedingsbodems, het pepton zonder bezwaar kan worden vervangen door d-glutaminezuur. Wij zijn daarom begonnen met na te gaan, of groei mogelijk was van onze Friedländerstam F 10 op diverse, glutaminezuur bevattende voedingsbodems. Wij hebben dezen stam allereerst geënt op de volgende vloeistoffen:

1. 1 % NH_4-glutaminaat, 0.1 % K_2HPO_4, 0.02 % $MgSO_4$. pH = 7.4.

2. als 1, het ammoniumglutaminaat was echter vervangen door Na-glutaminaat, bereid door het glutaminezuur te neutraliseeren met soda. pH = 7.4.
3. ½% glutaminezuur, ½% ammoniumlactaat en ½% K_2HPO_4, soda werd toegevoegd tot pH = 7.4.

In elk van de drie vloeistoffen was na 1 dag bij 37° behoorlijke groei waar te nemen, en wel in no. 3 sterker dan in de beide andere. Het lag daarom voor de hand de cultuurvloeistof no. 3 nader op bruikbaarheid te onderzoeken, door na te gaan of de productie van specifiek oplosbaar koolhydraat belangrijk verschilt van die op andere voedingsbodems. Daartoe bereidden wij de volgende oplossingen:

3. welke zoojuist is beschreven, verder
4. als 3, met toevoeging van ½% glucose,
5. als 3, met toevoeging van ½% manniet, en
6. alkalische bouillon.

In elk van de drie vloeistoffen was na 1 dag bij 37° behoor- van elke vloeistof een Chamberlandfiltraat L3 gemaakt. Om de kans op absorptie van de specifieke stof door de kaars zoo gering mogelijk te doen zijn, werden eerst eenige tientallen cm^3 onbeënte voedingsbodem doorgezogen, daarna nog ongeveer 20 cm^3 cultuur. Van de hierna gefiltreerde vloeistof bereidden wij met behulp van physiologische zoutoplossing de verdunningen 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 en 1/320. 0.5 cm^3 van elke verdunning werd nu voorzichtig gepipetteerd op 0.5 cm^3 anti-F 10-serum (verdund 1/10), en na 2 uur staan bij 37° nagegaan in welke buizen zich een witte ring in het grensvlak der twee vloeistoffen vertoonde. Als precipitatietiter werd voor iedere reeks aangenomen de hoogste verdunning welke nog positief reageerde, d.w.z. een witte ring in het grensvlak te zien gaf. De resultaten waren:

3. precipitatietiter 1/80, 1/160 was nog zwak positief.
4. „ 1/80.
5. „ 1/80.
6. „ 1/160.

Aangezien de precipitatietiter zal afhangen van de in de

filtraten aanwezige hoeveelheden specifiek polysaccharide, kunnen deze uitkomsten ons een indruk geven van de polysaccharideproductie op de gebruikte voedingsbodems. Het blijkt, dat in de vloeistof no. 3 iets minder koolhydraat wordt geproduceerd dan op de bouillon, in de suikerhoudende voedingsbodems is de productie nog iets geringer.

Na deze resultaten hebben wij voor onze verdere experimenten de voedingsbodem no. 3 gebruikt. Vergeleken met de alkalische bouillon heeft deze weliswaar het nadeel, dat de koolhydraatproductie erin een weinig minder is, de voordeelen, verbonden aan het gebruik van een synthetische voedingsbodem, wegen hier ruimschoots tegen op. Bovendien bleek later, dat toevoeging van een zeer geringe hoeveelheid gedroogde gist de groei nog deed toenemen.

Volledigheidshalve volgt hier nog de bereidingswijze van de synthetische voedingsbodem:

In 1 liter leidingwater losten wij op:

5 g d-glutaminezuur,

5 g K_2HPO_4,

5.5 g $Na_2CO_3 . 10 H_2O$,

6 cm^3 ammoniumlactaatoplossing (ong. 80 %),

1 mg Saccharomyces cerevisiae siccum, Ph. Ned. V.,

en verhitten deze oplossing 5 minuten op 115°. Na filtreeren brachten wij met verdund zwavelzuur de pH op 7.4, en vulden met de vloeistof ronde kolfjes met platte bodem van 300 cm^3 inhoud. Na afsluiting met een prop watten werd gedurende ½ uur op 110° gesteriliseerd.

2. *Isolatie van het polysaccharide.*

50 liter van de zoojuist beschreven voedingsbodem werden geënt met de Friedländerstam F 10. In het begin werkten wij de cultures op, nadat 10 dagen bij 37° was bebroed, later bleek, dat een belangrijk hoogere opbrengst wordt verkregen, wanneer na het broeden de kolfjes nog eenige weken bij kamertemperatuur worden bewaard. De inhoud van de meeste kolfjes is dan zeer visceus geworden, waarschijnlijk

doordat aanzienlijke hoeveelheden polysaccharide vrijkomen door autolyse. De levende bacteriën werden gedood door toevoeging van ½ % phenol.

Vervolgens dampten wij de verzamelde cultures in tot ongeveer $^1/_{10}$ van het oorspronkelijk volume, dit geschiedde in vacuum, waarbij gezorgd werd, dat de temperatuur van de vloeistof niet boven de 40° kwam. De destilleerkolf was een geglazuurd porceleinen vat met een inhoud van 25 liter. Schuimvorming kon worden tegengegaan door wat laurinealkohol toe te voegen. Het residu was een strooperige, vuilgele vloeistof, wij brachten met ijsazijn de pH op 4, en centrifugeerden het ontstane neerslag, dat grootendeels uit eiwit bestond, af. Vervolgens voegden wij langzaam, onder voortdurend omschudden, alkohol toe om alle specifieke stof neer te slaan, volledige precipitatie werd bereikt bij een alkoholconcentratie van ongeveer 50 %. Dat zich werkelijk alle specifiek reageerende stof in het neerslag bevond, konden wij opmaken uit het feit, dat de vloeistof, waaruit het neerslag door centrifugeeren en de alkohol door indampen verwijderd was, geen reactie meer gaf met homoloog antiserum.

Na een nacht staan was het neerslag geheel bezonken. De bovenstaande, heldere, geelgroen gekleurde, alkoholische vloeistof werd zooveel mogelijk afgeheveld en de rest gecentrifugeerd. In de centrifugebuizen bevonden zich nu drie lagen: de bovenste was de alkoholische, heldere vloeistof, welke werd weggeworpen, de middelste bestond uit een dikke, slijmige, vuilwitte massa, de onderste was een visceuze donkerbruine vloeistof. Deze onderste laag gaf na verdunning nog wel een reactie met antiserum, maar bevatte zooveel verontreinigingen (zouten en eiwitten), dat wij deze fractie niet verder hebben verwerkt. De middelste laag bleek het grootste gedeelte van het specifieke koolhydraat te bevatten en werd daarom verder behandeld. Een volledige scheiding van de twee onderste lagen was niet altijd mogelijk, maar dit bleek de zuivering van het ruwe product niet te bemoeilijken.

De te zuiveren fractie gaf een zeer sterke reactie met antiserum en een positieve Molisch-proef, de reactie van Millon en de biureetproef waren echter eveneens positief. Een groot gedeelte van het eiwit konden wij verwijderen door de middenlaag te suspendeeren in 1000 cm^3 acetaatbuffer van pH = 4 (welke 5 % Na-acetaat bevatte) en de suspensie, na een dag staan, te centrifugeeren. Het polysaccharide bevindt zich dan in de oplossing, het eiwit voor een belangrijk deel in het sediment. Het koolhydraat werd nu uit de oplossing neergeslagen met alkohol en het neerslag opnieuw in 1000 cm^3 buffermengsel gebracht. Dit suspendeeren, centrifugeeren en neerslaan met alkohol geschiedde zoolang, totdat het met alkohol verkregen precipitaat geheel in het buffermengsel oploste; na de laatste alkoholprecipitatie werd het koolhydraat, dat zich als een gomachtige massa op de bodem van de centrifugebuizen bevond, in vacuum boven $CaCl_2$ gedroogd. De gedroogde stof werd nu fijngepoederd: een vuilwit, amorph poeder werd verkregen. Het bezat de volgende eigenschappen:

Molisch-reactie sterk positief, Millon's en biureetproef zwak positief. Proef van Lassaigne positief, het stikstofgehalte bleek bij nader onderzoek ongeveer 2 % te bedragen. Geen kleurreactie met jodium; soms was een weinig phosphaat aanwezig. Een verdunning van 1 : 1 600 000 gaf nog een positieve precipitatiereactie met homoloog antiserum. Bepaling van de optische draaiing was onmogelijk, zelfs verdunde oplossingen waren melkachtig troebel. Uit 50 liter cultuur werd 5 tot 8 gram verkregen.

Ter verdere zuivering hebben wij de onteiwitting volgens Sevag ([15]) toegepast. Daartoe losten wij de stof op in 800 cm^3 acetaatbuffer met een pH = 4, en schudden deze oplossing gedurende 2 tot 3 uur met 160 cm^3 chloroform en 30 cm^3 amylalkohol, vervolgens centrifugeerden wij drie kwartier. De bovenste laag werd nu afgeheveld en opnieuw op dezelfde wijze behandeld, zoolang tot geen emulsie meer waar te nemen was na het centrifugeeren, hetgeen na 7 à 8

bewerkingen het geval was. De verzamelde, veel eiwit bevattende middenlagen werden, na verzamelen, uitgewasschen met het bekende buffermengsel en eveneens volgens Sevag onteiwit, daarna de gezuiverde waschvloeistof bij de eerste vloeistof gevoegd. De melkachtige troebeling van de oplossing was na deze zuivering geheel verdwenen en had plaats gemaakt voor een opalescentie. De specifieke stof werd nu opnieuw met alkohol neergeslagen en gedroogd. Na fijnpoederen hadden wij een sneeuwwit, amorph poeder in handen, de opbrengst varieerde van 3 tot 5 gram. De eigenschappen waren:

Eiwitreacties (Millon, Adamkiewicz, ninhydrine-, biureet-, sulfosalicylzuur- en diazobenzolsulfozuur-reactie) alle negatief.

Geen jodiumreactie. Phosphaat niet aanwezig.

De optische draaiing was thans te bepalen, hoewel door de opalescentie der oplossingen niet nauwkeurig, zij bedroeg ongeveer + 100°. De stof bevatte 44.7 % C, 5.9 % H en 5.6 % asch, bovendien was nog 0.3—0.4 % stikstof aanwezig.

Met antiserum was nog een reactie waar te nemen tot een verdunning van 1 : 2 000 000.

3. *Pogingen tot verdere zuivering.*

Vervolgens hebben wij het verkregen product aan verschillende bewerkingen onderworpen, en wel om te zien, of nog een verdere zuivering mogelijk was. Aanleiding tot deze pogingen was de vraag: hebben wij een homogene, zuivere stof in handen, welke de zeer gevoelige, zeer specifieke precipitatiereactie met antiserum te zien geeft, of betreft het hier een mengsel van verschillende stoffen, waarvan er één, misschien in geringe hoeveelheden aanwezig, verantwoordelijk is voor de serologische activiteit? Ook de aanwezigheid van een gering percentage stikstof deed ons vermoeden, dat het gezuiverde preparaat nog verder was te reinigen.

Wij onderwierpen nu onze meest gezuiverde preparaten aan de volgende bewerkingen:

1. Nog 5 maal de behandeling met chloroform en amylalkohol volgens S e v a g. Het stikstofgehalte bleef onveranderd.
2. Herhaaldelijk precipiteeren met ijsazijn uit 20 % Na-acetaatoplossing. Er traden groote verliezen op, terwijl geen daling van het stikstofgehalte geconstateerd kon worden.
3. Met sulfosalicylzuur en phosphorwolfraamzuur ontstond geen precipitaat, zoodat verwijdering van vreemde stoffen ook op deze wijze niet uitvoerbaar bleek.
4. Adsorptie aan noriet en aan aluminiumhydroxyde bij verschillende pH. Het polysaccharide werd door deze stoffen niet geadsorbeerd, het stikstofgehalte was na de behandeling niet teruggeloopen.

De serologische activiteit der preparaten (precipitatietiter) was in alle gevallen gelijk gebleven.

5. Gefractioneerde precipitatie met ijsazijn leverde twee fracties op met vrijwel gelijk N-gehalte en dezelfde precipitatietiter.
6. Door gefractioneerde precipitatie met aceton verkregen wij een tweetal fracties, die ieder afzonderlijk weer op dezelfde wijze gefractioneerd kunnen worden. In totaal werden op deze wijze 4 fracties bereid, welke geen verschillen vertoonden wat betreft precipitatietiter en optische draaiing, voor zoover deze laatste grootheid nauwkeurig viel te meten. Het stikstofgehalte varieerde van 0.3—0.6 %.

Oplossingen van gelijke concentraties van deze vier fracties vertoonden reeds op het oog een duidelijk verschil in viscositeit, en wel waren de oplossingen visceuzer, naarmate minder aceton noodig was. Uit deze bevindingen is op te maken, dat de fracties, wat chemische constitutie betreft, niet van elkaar verschillen, maar dat de polysaccharidemoleculen, waaruit zij zijn samengesteld, ver-

schillende grootte bezitten, d.w.z. uit verschillende aantallen bouwsteenen bestaan.

Het feit, dat ondanks herhaalde zuiveringspogingen het stikstofgehalte niet beneden het oorspronkelijke percentage daalde, deed ons vermoeden, dat dit element een essentieel bestanddeel van de specifieke stof was. In het volgend hoofdstuk komen wij nader hierop terug.

Verder waren de voornaamste eigenschappen van ons product na de beschreven behandelingen zóó weinig veranderd, dat wij het zeer waarschijnlijk achtten, dat de door ons geïsoleerde stof homogeen was.

4. Bereiding van het vrije zuur.

Bij de bereiding van het type-specifieke polysaccharide hadden wij tot nu toe behandeling met minerale zuren vermeden, zoodat wij konden verwachten de stof niet als vrij zuur, maar als zout in handen te krijgen. Dit bleek inderdaad het geval te zijn: de stof bevatte bijna 6 % asch, de oplossingen hadden een pH van ongeveer 7. Wij hebben nu beproefd het zout met behulp van HCl in het vrije zuur om te zetten.

Aan 50 cm^3 1 % polysaccharideoplossing voegden wij toe 5 cm^3 2 n HCl en vervolgens onder schudden 96 % alkohol. Na toevoeging van ongeveer 200 cm^3 ontstond een geringe hoeveelheid neerslag, met meer alkohol was geen verdere precipitatie mogelijk. Het neerslag had een aschgehalte van 1.9 %, het werd daarom opgelost in water en nogmaals met alkohol en zoutzuur geprecipiteerd. Ook nu bleef het grootste gedeelte van het polysaccharide in oplossing, het aschgehalte van het geprecipiteerde deel was na de tweede bewerking gedaald tot 0.08 %. Het in de alkoholische vloeistof achtergebleven koolhydraat was alleen terug te winnen door toevoeging van een Na-acetaatoplossing, waardoor het neersloeg, het bevatte dan weer eenige procenten asch. Verandering van de toegevoegde hoeveelheid zoutzuur of van de polysaccharideconcentratie leverde geen betere resultaten op.

evenmin de vervanging van de alkohol door aceton of ijsazijn. Een iets betere opbrengst werd verkregen door in plaats van zoutzuur trichloorazijnzuur te gebruiken, de precipitatie was dan iets minder onvolledig, een geheel aschvrij product kon ook op deze wijze niet verkregen worden, het aschgehalte kwam nooit onder de 0.1 % en steeds was meer dan één precipitatie noodzakelijk.

De optische draaiing kon na de behandeling met zuur iets nauwkeuriger bepaald worden, deze varieerde bij de verschillende preparaten van + 108°—+ 120°. De precipitatietiter was onveranderd gebleven, namelijk 1 : 2.000.000.

Heidelberger en medewerkers hadden niet de minste moeilijkheden ondervonden bij de bereiding van het vrije zuur, éénmaal neerslaan met alkohol en zoutzuur was steeds voldoende om een geheel aschvrije stof te verkrijgen, zonder dat verliezen optraden. Ook aan de bepaling van het optische draaiingsvermogen schenen geen bezwaren verbonden te zijn, ook niet indien zij dit van het zout trachtten te bepalen. Wat de oorzaak was van deze belangrijke verschillen in resultaten, konden wij in dit stadium van het onderzoek nog niet vaststellen, eerst na een meer uitgebreid onderzoek kon hierover opheldering worden verkregen. Dit zal in het volgende hoofdstuk uitvoerig worden besproken.

LITERATUUR.

1. W. C. de Graaff, Ant. van Leeuwenhoek, **3**, 18 (1936).
2. D. K. Wielenga, diss. Amsterdam (1937) bladz. 74.
3. E. Toenissen, Centr. für Bakt. etc. Abt. I (Orig.), **85**, 225 1920).
4. J. Tomczik, Proc. Soc. exp. Biol. and Med. **24**, 810 (1927).
5. W. T. J. Morgan, Bioch. Journal **30**, 909 (1936).
6. F. Przesmycki, Journ. inf. Dis. **35**, 537 (1924).
7. C. W. Wieghard, L. A. Julianelle, Journ. exp. Med. **62**, 23 (1935).

8. I. Malek, Compt. rend. Soc. Biol. **126**, 127 (1937).
9. A. Boivin, L. Mesrobeanu, Compt. rend. Soc. Biol. **114**, 307; **115**, 306 (1933); **118**, 612 (1934); **124**, 1176 (1937).
10. O. T. Avery, W. F. Goebel, Journ. exp. Med. **58**, 731 (1933).
11. W. F. Goebel, O. T. Avery, Journ. exp. Med. **46**, 601 (1927).
12. A. T. Fuller, Brit. Journ. exp. Path. **19**, 130 (1938).
13. M. Heidelberger, F. E. Kendall, H. W. Scherp, Journ. Journ. exp. Med. **64**, 559 (1936).
14. M. Heidelberger, F. E. Kendall, H. W. Scherp, Journ. Proc. Soc. exp. Biol. and Med. **33**, 188, 445 (1935).
15. M. G. Sevag, Bioch. Zeitschr. **273**, 419 (1934).
16. W. F. Goebel, Journ. exp. Med. **68**, 221 (1938).
17. W. F. Goebel, P. B. Beeson, C. L. Hoagland, Journ. biol. Chem. **129**, 455 (1939). Journ. exp. Med. **70**, 239 (1939).
18. W. Kauffmann, J. Smit, Ant. van Leeuwenhoek **2**, 334 (1935).
19. T. Folmpers, Ant. van Leeuwenhoek **2**, 343 (1935).

STELLINGEN.

I.

De door de Graaff gemaakte indeeling van de soort Klebsiella pneumoniae, berustend op biochemische eigenschappen, komt overeen met de serologische indeeling volgens Julianelle.

II.

De agglutinatietiter van een anti-meningococcenserum is lager, naarmate men bij de reactie coccen met een grootere kapsel gebruikt.

P. A. Little, Journ. of Imm. 34, 97 (1938).

III.

De vervanging van methyleenblauw door resazurine bij de reductaseproef biedt voordeelen.

W. D. Barrett, H. Rutan, J. A. Kunan, Journ. of Dairy Science 20, 705 (1937).

IV.

Een nader onderzoek is noodzakelijk naar de bruikbaarheid van de phosphataseproef bij het onderzoek van room.

C. L. Kruisheer, Alg. Zuivel- en Melkhyg. Weekbl. 36, 237 (1940).

V.

Bij de bepaling van het jodiumgehalte van organische materiaal, geeft de door Reimers uitgewerkte methode de betrouwbaarste resultaten.

F. Reimers, Z. für Anal. Ch. 118, 399 (1940).

Tot nu toe bestaan nog slechts weinig gegevens omtrent de structuur van het specifieke polysaccharide van Klebsiella pneumoniae type C. Alles wat over deze stof bekend is, is te danken aan het werk van Goebel en Avery (1). Door hen is een aschvrij product geïsoleerd, dat geen stikstof bevat, een optische draaiing van + 100° en een zuuraequivalent van 680 bezit. Het gehalte aan koolstof en waterstof werd niet bepaald.

Niet onderzocht is of methoxyl- of acetylgroepen in de stof voorkomen, wel hebben Goebel en Avery nagegaan welke reduceerende suikers door hydrolyse met zwavelzuur ontstonden. Zij deelen hierover het volgende mede:

De stof werd met 1 n zwavelzuur zoolang gekookt, totdat het reduceerend vermogen der oplossing niet meer toenam, hetgeen na ongeveer 5 uur het geval was. Het gehalte aan reduceerende stoffen bedroeg toen, omgerekend op glucose, 70 %. Het zwavelzuur verwijderden zij door bariumhydroxyde toe te voegen tot de oplossing neutraal op Congo, maar zuur op lakmoes reageerde, en het $BaSO_4$ af te filtreeren. Eventueel voorkomende suikerzuren zijn dan nog in vrije toestand in de vloeistof aanwezig. Door opkoken met overmaat calciumcarbonaat en wat norit werden deze in het calciumzout omgezet, vervolgens werd opnieuw gefiltreerd en het heldere filtraat in vacuum tot een dikke stroop ingedampt. Deze stroop extraheerden zij met methylalkohol en dampten ook dit extract in. Het residu vertoonde een sterke Fehling-reductie; de reactie van Tollens met naphtoresorcine en zoutzuur was echter negatief. Met behulp van phenylhydrazine bereidden zij een osazon, dat als glucosazon geïdentificeerd kon worden. Ook oxydeerden zij de fractie met salpeterzuur en verkregen, na toevoeging van KOH, een kristallijne stof, welke volgens hen, te oordeelen naar het kaliumgehalte, suikerzuur kalium moest zijn. Uit deze gegevens maken zij op, dat in het methylalkoholisch extract glucose aanwezig moet zijn. Zij maken geen melding van pogingen, om nog andere stoffen uit deze fractie te isoleeren.

Na het uittrekken met methylalkohol bleef nog een deel onoplosbaar achter. Dit bevatte veel calcium en gaf een sterke reactie met naphtoresorcine en zoutzuur, hetgeen wijst op de aanwezigheid van uronzuur. Deze fractie is in dit geval niet nader onderzocht, wel bij enkele andere bacteriepolysacchariden, o.a. van Klebsiella pneumoniae type A. Door gefractioneerde precipitatie kon men een Ca-zout van een aldobionzuur afzonderen, dat nog een verdere zuivering kon ondergaan door bereiding van het cinchonidine-, brucine- of morphinezout. In enkele gevallen werd zelfs vastgesteld uit welke hexose en welk uronzuur dit aldobionzuur was opgebouwd, nl. bij pneumococcus type III en bij Klebsiella pneumoniae type A. ([2], [3]).

EIGEN ONDERZOEK.

Bepaling zuuraequivalent.

In hoofdstuk II vermeldden wij reeds, dat het geïsoleerde polysaccharide in het vrije zuur was om te zetten door het eenige malen neer te slaan met trichloorazijnzuur en alkohol, waarna het neerslag werd gewasschen met alkohol en aether. Een afgewogen hoeveelheid van dit vrije zuur losten wij op in water en titreerden deze oplossing met 0.1 n NaOH met phenolphtaleine als indicator. Het uit het titercijfer berekende zuuraequivalent bleek 590 te bedragen.

Bepaling optisch draaiingsvermogen.

Het optisch draaiingsvermogen bepaalden wij door de draaiing van ½ % oplossingen te meten; hoogere concentraties waren wegens de sterke opalescentie ongeschikt voor het verrichten van deze meting. Het meest bruikbaar waren de oplossingen van het vrije zuur, toch bedroeg de afleesfout nog omstreeks 0.05°. Het spreekt vanzelf, dat de $[\alpha]_D$ daarom niet met groote nauwkeurigheid kan worden opgegeven, voor het vrije zuur werden waarden van 108—120° gevonden.

Koolstof- en waterstofgehalte.

Het polysaccharide bleek 44.7 % C en 5.9 % H te bevatten. Deze bepalingen waren uitgevoerd door den heer P. J. Hubers te Amsterdam.

Stikstofgehalte.

Het stikstofgehalte bepaalden wij volgens de methode van ter Meulen en Heslinga ([4]). Voor iedere bepaling werd ongeveer 10 mg stof ingewogen, de titratie geschiedde met 0.01 n HCl. De stikstofgehalten van onze zuiverste preparaten bedroegen 0.3—0.4 %.

Methoxylgroepen.

In een micro-Zeiselapparaat verwarmden wij ongeveer 10 mg stof met joodwaterstof (s.g. 1.7), wat phenol en een paar druppels azijnzuuranhydride onder doorleiden van CO_2 en leidden de dampen, na wasschen door een oplossing van 5 % Na-thiosulfaat en 5 % Cd-sulfaat, in een alkoholische zilvernitraatoplossing. Indien alkoxylgroepen aanwezig zijn, komt alkylhalogenide vrij, dat met het zilverzout een neerslag van AgJ geeft. Dit werd echter niet waargenomen, het polysaccharide bevat dus geen methoxyl- of andere alkoxylgroepen.

Acetylgroepen.

0.3 g polysaccharide, opgelost in 30 cm^3 water, werd geneutraliseerd met loog en, na toevoeging van 5 cm^3 4 n NaOH, 4 uur onder terugvloeikoeling op een kokend waterbad verwarmd, hierna aangezuurd met 6 cm^3 4 n zwavelzuur en gedestilleerd tot het residu omstreeks 2 cm^3 bedroeg. Aan het residu voegden wij 5 cm^3 water toe en destilleerden opnieuw, dit herhaalden wij nog éénmaal. De verzamelde destillaten vertoonden geen zure reactie op lakmoes en gaven geen estergeur na koken met alkohol en zwavelzuur. Ook dampten wij het destillaat droog met MgO, namen

het residu op in water, filtreerden en reageerden in het filtraat met Na-uranylpropionaat op acetaationen, eveneens met negatieve uitslag. Acetylgroepen zijn dus niet aanwezig.

Hydrolyse met zwavelzuur.

Wij hydrolyseerden het polysaccharide, door een 1 %-oplossing ervan in 1 n zwavelzuur op een kokend waterbad te verwarmen, zoolang tot geen toeneming van het reduceerend vermogen der oplossing meer was waar te nemen. Wij controleerden dit door ieder uur een proefje uit de oplossing te nemen, en hiervan het reduceerend vermogen te bepalen, volgens Hagedorn-Jensen. Deze suikerbepaling berust op het principe, dat een afgemeten hoeveelheid kaliumferricyanide door de aanwezige suikers gereduceerd wordt tot ferrocyanide, dat als zinkzout wordt neergeslagen, de overmaat ferricyanide is jodometrisch te titreeren en uit het titercijfer de aanwezige hoeveelheid suiker te berekenen. Het reduceerend vermogen van onze oplossing drukten wij uit in procenten van de waarden, welke zouden zijn gevonden, indien wij de bepaling hadden verricht met gelijke monsters van een 1 % glucoseoplossing.

De voorschriften voor de uitvoering van de bepaling zijn te vinden in de meeste handboeken over pathologische chemie, zij zijn bedoeld voor suikerbepalingen in bloed en urine. In dergelijke gevallen is het noodig aan de eigenlijke bepaling een onteiwitting vooraf te laten gaan, welke geschiedt door behandeling met zinkhydroxyde. Wij hebben onze bepalingen verricht zoowel met, als zonder deze behandeling; wij verkregen in het eerste geval lagere waarden. Wij vonden:

	met zinkhydroxyde	zonder zinkhydroxyde
na 0 uur	—	—
„ 1 „	37 %	45 %
„ 2 „	48 %	62 %
„ 3 „	51 %	62 %
„ 4 „	51 %	63 %

„ 5 „	47 %	60 %
„ 6 „	51 %	62 %

Uit deze getallen blijkt duidelijk, dat door de behandeling met het zinkhydroxyde reduceerende stoffen worden verwijderd. De neerslagen van het $Zn(OH)_2$ werden daarom uitgewasschen met warm gedestilleerd water en in zoo weinig mogelijk azijnzuur opgelost. Deze oplossing bleek koperproefvocht te reduceeren en bovendien een positieve reactie te geven met naphtoresorcine en zoutzuur. Dit wijst erop, dat door bovengenoemde bewerking uronzuren, of uronzuur bevattende verbindingen, als zinkzout zijn neergeslagen.

Bovendien laten de uitkomsten zien, dat na 3 à 4 uur de hydrolyse volledig is geweest. Bij latere proeven hebben wij daarom nooit langer dan 4 uur gehydrolyseerd. De reactie met antiserum was reeds na 1 uur negatief.

Een groote waarde moet men aan deze getallen niet toekennen, men kan er ten hoogste uit afleiden wanneer de hydrolyse geëindigd is, bovendien kan men de eindwaarde min of meer beschouwen als een chemische constante van het uitgangsproduct. Zij kunnen ons echter geen uitsluitsel geven omtrent de quantitatieve samenstelling van het polysaccharide, vooral, omdat uronzuren bij verhitting met verdunde zuren ontledingsproducten geven met onbekende samenstelling en reduceerend vermogen.

Identificatie der hydrolyseproducten.

Na ongeveer een uur hydrolyseeren was de eerst opalescente vloeistof geheel helder geworden, terwijl zich aan het oppervlak grijswitte vlokken hadden verzameld. Na 3 uur beëindigden wij de hydrolyse en scheidden de vlokken (fractie B) van de vloeistof (fractie A) door filtratie.

Fractie A.

Allereerst onderzochten wij de vloeistof. Wij brachten haar op kooktemperatuur en voegden toen zooveel kokende

bariumhydroxydeoplossing toe tot een neutrale reactie op Congo en een zure reactie op lakmoes was verkregen. Het $BaSO_4$ werd door filtreeren verwijderd en het neerslag eenige malen met heet water uitgewasschen. Het waschwater voegden wij bij het filtraat en kookten dit mengsel even op met een kleine overmaat calciumcarbonaat en wat norit, hierna werd opnieuw gefiltreerd. Het heldere, lichtgeel gekleurde filtraat dampten wij nu in vacuum geheel in, het residu was een taaie, bruingekleurde stroop, welke in 40 cm^3 water werd opgenomen. Nu voegden wij alkohol toe tot een concentratie van 90 % en verwijderden het ontstane neerslag door centrifugeeren. De vloeistof dampten wij weer tot klein volumen in en precipiteerden opnieuw met alkohol, het neerslag werd weder afgecentrifugeerd en bij het eerst verkregen precipitaat gevoegd, deze bewerking werd nog éénmaal herhaald. De verzamelde neerslagen gaven een sterke Fehling-reductie en een positieve reactie op uronzuur; de vloeistof vertoonde alleen reduceerende eigenschappen. De vloeistof noemden wij fractie A 1, het neerslag A 2.

A 1 werd in vacuum ingedampt tot klein volumen en een week in een vacuumexsiccator boven $CaCl_2$ gedroogd. De zoo verkregen dikke stroop extraheerden wij 4 maal met kokende absolute alkohol (fractie A 3), het residu bleek geheel in 80 % alkohol op te lossen (fractie A 4). Beide fracties werden op dezelfde wijze onderzocht: na verwijdering van het oplosmiddel dampten wij de helft op het waterbad in met 25 % salpeterzuur, de andere helft verwarmden wij gedurende een half uur op het waterbad met 2 deelen zoutzure phenylhydrazine en 3 deelen Na-acetaat.

Fractie A 3. Oplosbaar in absolute alkohol.

De oxydatie met salpeterzuur leverde geen kristallijn product op, ook niet na neutralisatie.

De behandeling met phenylhydrazine gaf een bijna witte kristallijne stof, welke na eenige malen omkristalliseeren uit

water, een constant smeltpunt bezat van 190° *). Dit product loste niet op in 90% alkohol of aceton. Deze gegevens deden ons vermoeden, dat wij hier te doen hadden met mannose-phenylhydrazon, de literatuuropgaven over het smeltpunt van deze stof liggen tusschen 185 en 197°. Wij bereidden nu op de boven beschreven wijze uit d-mannose het hydrazon, dat eveneens een smeltpunt van 190° bleek te bezitten. Een mengsmeltpunt van beide stoffen werd thans bepaald: er was geen depressie waar te nemen, zoodat de aanwezigheid van *d-mannose* bewezen is.

Uit de moederloog van het hydrazon konden wij geen andere stoffen afzonderen.

Fractie A 4. Oplosbaar in 80 % alkohol.

Oxydatie met salpeterzuur gaf na neutralisatie met kaliumcarbonaat naaldjes, deze losten wij op in wat water en voegden een weinig vast thalliumnitraat toe, onder het microscoop waren thans lange, rechthoekige staafjes te zien, welke typisch zijn voor het thalliumzout van slijmzuur.

Met phenylhydrazine werd ook hier mannose-phenylhydrazon verkregen, maar bovendien uit de moederloog hiervan een donkergeel kristallijn product, dat in alkohol van verschillende concentraties oploste, evenals in methylalkohol en aceton. Het smeltpunt was 184°, een mengsmeltpunt met d-galactosazon gaf geen depressie; bovendien konden wij een p-nitrophenylhydrazon bereiden met een smeltpunt van 194°. Uit al deze gegevens blijkt duidelijk, dat hier *d-galactose* aanwezig is.

Fractie A 2. Onoplosbaar in 90 % alkohol.

De verzamelde neerslagen waren, op een weinig $CaCO_3$ en $CaSO_4$ na, geheel oplosbaar in water. Wij trachtten nu door gefractioneerde precipitatie met alkohol alle anorganische bestanddeelen uit de oplossing te verwijderen, wat echter niet gelukte, daar alle fracties nog sulfaat bleken te bevat-

*) De door ons vermelde smeltpunten zijn alle ongecorrigeerd.

ten. Het is mogelijk, dat deze moeilijkheid niet optreedt, wanneer bij de verwijdering van het zwavelzuur na de hydrolyse geen calcium-, maar bariumcarbonaat wordt gebruikt, het ontbrak ons echter aan voldoende materiaal om dit te controleeren.

Wij voegden aan de oplossing basisch loodacetaat toe en ontleedden het ontstane neerslag, na het afgecentrifugeerd en in water gesuspendeerd te hebben, met H_2S. Het PbS werd afgefiltreerd en het filtraat in vacuum ingedampt. Er bleef een lichtbruin gekleurde stroop achter, welke, na een verblijf van eenige dagen in vacuum boven $CaCl_2$, vast werd. Deze vaste stof, welke gemakkelijk uit de kolf geschraapt kon worden, vertoonde geen duidelijke kristalvorm en bezat geen te bepalen smeltpunt. Het reduceerend vermogen bleek 12 % van dat van glucose te bedragen, het zuuraequivalent was 533, aschgehalte 0.3 %.

Met phenylhydrazine en derivaten hiervan konden wij geen kristallijne producten verkrijgen, evenmin gelukte het ons gekristalliseerde cinchonidine- of morphinezouten te bereiden.

De reactie op uronzuur was wederom sterk positief. Wij kunnen dus over fractie A 2 niets anders zeggen, dan dat zij een uronzuur bevat, dat gemengd is met, of gebonden aan één of meer suikers van onbekende samenstelling.

Fractie B.

De vlokken, welke gedurende de hydrolyse aan het oppervlak waren komen drijven, werden afgefiltreerd en met water uitgewasschen. Zij bleken in water niet op te lossen, maar wel in alkohol en in verdunde loog, uit deze laatste oplossing was de stof met zuur weer neer te slaan. De reactie van Molisch was negatief, evenals de biureetproef en de reactie van Millon, wij hadden dus een stof in handen, welke geen koolhydraat en geen eiwit was. De fractie werd gezuiverd door op te lossen in 0.1 n NaOH en weer neer te slaan met 0.1 n HCl, af te filtreeren en de op het filter achterblijvende, gelei-

achtige massa in alkohol op te lossen. Na verdamping van de alkohol bleef een vaste, geelbruine massa over met een vetachtige consistentie. Uit 2.5 g polysaccharide werd ongeveer 150 mg van dit product verkregen. De stof bleek niet alleen oplosbaar te zijn in alkohol, maar ook in chloroform, aether en petroleumaether, echter niet in aceton. Bovendien bevatte zij 1.9% stikstof, in de asch was phosphaat aan te toonen. Al deze gegevens deden ons vermoeden, dat fractie B een phospholipoïde was. De volgende reacties hebben dit vermoeden bevestigd:

1. verzeeping van ongeveer 20 mg met 0.5 cm^3 alkoholische loog, na aanzuren en filtreeren werd in het filtraat op glycerine gereageerd, de reacties van Mulliken (met pyrogallol en zwavelzuur) en van Denigès (oxydatie met broomwater, daarna codeïne en zwavelzuur toevoegen) waren beide zwak positief.
2. bij de verzeeping ontstond na aanzuren een gele olie, die in chloroform werd opgenomen. Deze oplossing werd thans gewasschen met water; na afdampen van de chloroform bleef een gele olie over, welke zuur reageerde op lakmoes en met loog een troebele vloeistof gaf, die bij schudden sterk schuimde. Dit is een aanwijzing op vetzuur.

Meer stof konden wij voor verdere identificatiereacties niet gebruiken, aangezien het grootste gedeelte bewaard moest worden voor serologische proeven; om dezelfde reden moest ook de bepaling van het phosphorgehalte achterwege blijven.

Het lipoïde moet aan het koolhydraat gebonden zijn, anders was het bij de onteiwitting met chloroform verwijderd.

Nu is ook verklaard, waarom alle pogingen om een stikstofvrij polysaccharide te bereiden mislukt zijn: de in specifieke stof aanwezige stikstof is afkomstig van het lipoïde en niet van eiwit. Phosphaat hadden wij in het koolhydraat niet kunnen aantoonen, omdat wij steeds in de oplossingen ervan hadden gereageerd, thans bleek ons, dat in de asch wel degelijk phosphaat was te vinden. Tevens is hiermede verklaard, waarom geen aschvrije producten konden worden verkregen.

Wij achtten het zeer waarschijnlijk, dat de bewerkingen welke Goebel en Avery bij de isolatie van het specifieke polysaccharide van Klebsella pneumonia type C hadden toegepast, van dien aard waren, dat het lipoïde van het koolhydraat werd afgesplitst en zij dus een lipoïdvrij koolhydraat in handen kregen. Zij hadden n.l. ter verwijdering van het bacterie-eiwit hun uitgangsmateriaal bij een pH = 7.6 met trypsine behandeld, wij echter konden, door deze bewerking op het zuivere polysaccharide toe te passen, het lipoïde slechts gedeeltelijk afsplitsen. Daarom hebben wij getracht op andere wijze het lipoïdvrije polysaccharide te bereiden, namelijk door hydrolyse met verdund azijnzuur. Wij hebben vervolgens nagegaan of het zoo verkregen product dezelfde eigenschappen bezit als het door Goebel en Avery bereide.

Hydrolyse met verdund azijnzuur.

Aan een 1 %-oplossing van het polysaccharide voegden wij azijnzuur toe tot een concentratie van 0.1 n en verhitten dit op een kokend waterbad. Na ongeveer drie kwartier scheidde het lipoïde zich als vlokken af, die wij door filtreeren verwijderden. Aan het heldere filtraat voegden wij alkohol toe, er ontstond een neerslag, dat uit polysaccharide bleek te bestaan. Dit polysaccharide bleek geheel heldere oplossingen te geven, de $[\alpha]_D$ kon gemakkelijk worden bepaald en bedroeg + 110°. Ook het vrije zuur werd thans zonder moeite bereid door precipitatie met zoutzuur en alkohol: na één precipitatie ontstond reeds een aschvrij product, verliezen traden niet op. De stof bevatte geen stikstof en geen phosphor. Het zuuraequivalent bedroeg 996, verder bevatte de stof 41.6 % C en 6.3 % H. Het reduceerend vermogen, na hydrolyse met zwavelzuur, was 70 % van dat van glucose, de specifieke draaiing van het vrije zuur + 118°.

Het door ons geïsoleerde, lipoïdvrije polysaccharide bezit blijkbaar niet geheel dezelfde eigenschappen als dat van Goebel en Avery. In het volgend hoofdstuk zullen wij de resultaten mededeelen van het serologisch onderzoek,

waarbij zoowel het lipoïdhoudende als het vrije koolhydraat zijn betrokken.

LITERATUUR.

1. W. F. Goebel, O. T. Avery, Journ. exp. Med. **46**, 601 (1927).
2. W. F. Goebel, Journ. biol. Chem. **74**, 613, 619 (1927); **110**, 391 (1935).
3. M. Heidelberger, W. F. Goebel, Journ. biol. Chem. **74**, 613 (1927).
4. H. ter Meulen, J. Heslinga, Nieuwe methoden voor elementairanalyse (1930).

HOOFDSTUK IV.

SEROLOGISCH ONDERZOEK.

Bij het serologisch onderzoek van specifieke bacteriepolysacchariden is in de literatuur allereerst gebruik gemaakt van de precipitatiereactie met homoloog antiserum. Deze reactie is zeer gevoelig en zeer specifiek en heeft het voordeel gemakkelijk uitvoerbaar te zijn zonder dat daarbij bijzondere hulpmiddelen gebruikt worden. Andere reacties zijn slechts in enkele gevallen toegepast, zooals de complementbindingsreactie (1) en de op anaphylactische verschijnselen berustende proeven (2). De specificiteit van deze laatste reacties staat niet achter bij die van de precipitatie, de gevoeligheid is vaak nog iets grooter, de uitvoering is echter minder eenvoudig. Voor het onderzoek van de door ons geïsoleerde producten: het lipoïde-polysaccharide, het vrije lipoïde en het vrije koolhydraat, hebben wij uitsluitend van de precipitatiereactie gebruik gemaakt. Ook tijdens de isolatie pasten wij de reactie geregeld toe, om te controleeren welke van de verkregen fracties de specifieke stof bevatte.

Om de reactie te kunnen toepassen, moesten wij beschikken over het homologe antiserum, bovendien was het echter gewenscht controleproeven met een of meer heterologe sera uit te voeren. Het koolhydraat, dat wij uit een stam van Klebsiella pneumoniae isoleerden, moest voldoen aan den eisch: specifiek te zijn voor het type C van genoemde soort. Wij zijn daarom overgegaan tot de bereiding van antisera, welke gericht waren tegen de typen A, B en C.

Bereiding der antisera.

Als proefdieren gebruikten wij konijnen, deze werden ingespoten met gedoode suspensies (zie later) van de stam-

men F 1 (type A), F 7 (type B) en F 10, de stam van het type C, waaruit wij het koolhydraat hadden bereid.

De bereiding van antisera kan op zeer verschillende wijzen geschieden, het gehalte aan antilichamen hangt af van de gevolgde methode. De bereiding der vaccins, de ingespoten hoeveelheden, de wijze van injectie, het aantal injecties, alsmede de frequentie, waarmee zij worden toegediend, spelen hier een rol. Slechts weinig gegevens bestaan omtrent de wijze, waarop men met Klebsiella-stammen hoogwaardige antisera kan krijgen.

Avery, Heidelberger en Goebel ([3]) immuniseerden konijnen door intraveneuze inspuitingen van door warmte gedoode bacteriën, kleine doses werden dagelijks gedurende 6 dagen toegediend, na een rustpoos van een week werd dit proces herhaald. Drie series injecties werden in totaal gegeven, 9 dagen na de laatste injectie werd bloed afgenomen en het antistofgehalte van het serum bepaald door het vaststellen van de agglutinatietiter. Eénmaal bereikten zij een titer van $^1/_{40}$, verder werden geen waarden opgegeven.

Goslings ([4]) had uit de resultaten van Julianelle de conclusie getrokken, dat snel opeenvolgende, intraveneuze injecties bruikbare sera opleverden. Hij gaf daarom zijn injecties intraveneus, op 3 achtereenvolgende dagen, gevolgd door 4 dagen rust, daarna weer 3 injecties enz., na 3 à 4 weken was een agglutinatietiter van $^1/_{32}$ tot $^1/_{64}$ bereikt.

Wielenga ([5]) gaf de injecties, eveneens intraveneus, eens per week, hij bereikte daardoor ook titers van $^1/_{32}$ à $^1/_{64}$, meestal echter pas na eenige maanden.

Hoewel de literatuur ons slechts weinig gegevens bood, om uit te kunnen maken, hoe op de snelste wijze hoogwaardige sera worden verkregen, hadden wij toch den indruk, dat injecties, met korte tusschenpoozen toegediend, vrij spoedig tot een aannemelijk resultaat konden leiden. Het gedurende eenigen tijd dagelijks toedienen kwam ons echter wel wat àl te frequent voor. Daarom hebben wij besloten de dieren om de andere dag in te spuiten. Zooveel mogelijk gaven wij

series van 6 injecties, 7 à 10 dagen na de laatste injectie van iedere serie bepaalden wij de agglutinatietiter van het serum, onmiddellijk daarna werd een nieuwe serie aangevangen.

Als antigeen kozen wij suspensies van bacteriën, bereid door 24 uur oude, schuine agarculturen af te slibben met 10 cm³ physiologische zoutoplossing en dan door steriel filtreerpapier te filtreeren. De bacteriën doodden wij òf door verhitting op 54° gedurende ½ uur, òf door toevoeging van 0.1 % formaldehyde.

Eerste reeks.

In deze eerste proevenreeks onderzochten wij welke wijze van injectie de meest geschikte was. In dit stadium van ons onderzoek hadden wij huisvesting voor slechts enkele dieren, zoodat wij onze conclusie eigenlijk uit onvoldoende gegevens moesten trekken.

Alle dieren werden om de andere dag ingespoten met een door verwarming gedoode suspensie van de stam F 10 (type C).

No. 1. 6 intraveneuze injecties van 0.1 cm³, (1e serie).
6 „ „ „ 0.5 „ , (2e serie).
4 „ „ „ 1 „ .
2 „ „ „ resp. 0.2 en 1 cm³ levende bacteriën (3e serie).

De titers, bepaald aan het einde van de op iedere serie injecties volgende rustpoos bedroegen achtereenvolgens:
Titers: $^1/_5$, $^1/_{64}$ en $^1/_{200}$.

No. 2. 6 intramusculaire injecties van 0.2 cm³, (1e serie).
6 „ „ „ 1 „ , (2e serie).
4 „ „ „ 2 „ ,
2 „ „ „ resp. 0.5 en 1 cm³ levende bacteriën (3e serie).
Titers: 0, $^1/_{16}$ en $^1/_{30}$.

No. 3. 6 intraperitoneale injecties van resp. 0.5, 1, 2, 3 4 en 5 cm³, om de andere dag (1e serie).
3 intraperitoneale injecties van 5 cm³, telkens met

een rustpoos van drie dagen (2e serie).
6 intraveneuze injecties van 1 cm^3, weer als gewoonlijk om den anderen dag (3e serie).
en een vierde serie, geheel gelijk aan de 3e.

Titers: $^1/_{30}$, $^1/_{50}$, $^1/_{900}$ en $^1/_{600}$.

Bij de 3de serie zijn wij tot intraveneuze inspuitingen overgegaan, aangezien de geringe stijging na de 2e serie ons deed vermoeden, dat verder intraperitoneaal inspuiten geen belangrijke verhooging met zich mede zou brengen. De hooge titer na de 3e serie trachtten wij nog te vergrooten door een 4e serie te geven, zooals men ziet zonder resultaat.

Na deze resultaten verwachtten wij het meeste van afwisselend intraveneus en intraperitoneaal gegeven inspuitingen. In de volgende reeks proeven hebben wij getracht na te gaan, of deze afwisseling inderdaad voordeelen bood boven het uitsluitend intraveneus toedienen. Ook gaven wij in de meeste gevallen nog een vierde serie injecties, om te zien of de daling in titer, welke bij konijn no. 3 na een vierde serie optrad, zich ook bij andere dieren zou voordoen. Deze vierde serie werd steeds intraveneus gegeven.

Tweede reeks.

Om de hierboven vermelde redenen hebben wij een gedeelte van de tot deze reeks behoorende dieren uitsluitend intraveneus en een ander gedeelte afwisselend intraveneus en intraperitoneaal ingespoten.

No. 4. met stam F 10 (type C), gedood door toevoeging van 0.1 % formaldehyde.

6 intraveneuze injecties van resp. 0.1, 0,2, 1, 1, 1, en 1 cm^3 (1e serie).

6 intraperitoneale injecties van 2 cm^3 (2e serie).

6 intraveneuze injecties van 1 cm^3, waarvan de laatste twee met levende bacteriën (3e serie).

Titers: $^1/_{300}$, $^1/_{100}$, $^1/_{2000}$.

No. 5. Eveneens met den stam F 10 (type C), op geheel dezelfde wijze als no. 4, maar met een door verwarming gedoode suspensie.

Titers: $^1/_{100}$, $^1/_{100}$, $^1/_{1000}$.

De door toevoeging van formaldehyde gedoode bacteriën bleken minstens even goed antigeen te zijn als de door warmte gedoode. De op de eerste wijze bereide suspensies bleken veel beter houdbaar te zijn, daarom hebben wij de nu volgende dieren met dergelijke suspensies ingespoten.

No. 6. met stam F 1 (type A). Achtereenvolgens:
6 intraveneuze injecties van resp. 0.1, 0,2, 0,5, 0.5, 1 en 1 cm³ (1e serie).
6 intraperitoneale injecties van 1 cm³ (2e serie).
6 intraveneuze „ „ 1 cm³ (3e serie).
6 „ „ „ 1 cm³ (4e serie).

Titers: 0, 0, 0, $^1/_{40}$.

No. 7. met stam F 1 (type A).
Hoeveelheden als no. 6, maar alles intraveneus.

Titers: 0, 0, 0, $^1/_{100}$.

No. 8. met stam F 7 (type B). Geheel als no. 6, dus afwisselend intraveneus en intraperitoneaal.

Titers: $^1/_{300}$, $^1/_{200}$, $^1/_{2000}$, $^1/_{1000}$.

No. 9, met stam F 7 (type B). Geheel als no. 7, dus alles intraveneus.

Titers: $^1/_{400}$, $^1/_{1000}$, $^1/_{3000}$, $^1/_{400}$.

No. 10. met stam F 10 (type C). Geheel als nos. 6 en 8, afwisselend intraveneus en intraperitoneaal.

Titers: $^1/_{200}$, $^1/_{80}$, $^1/_{2000}$, $^1/_{1000}$.

No. 11. met stam F 10 (type C). Geheel als nos. 7 en 9, alle injecties intraveneus. Na de 3e serie gestorven door onbekende oorzaak.

Titers: $^1/_{300}$, $^1/_{1000}$.

Bij de dieren 6 t/m 11 zijn drie verschillende antigenen gebruikt. Het valt al dadelijk op, dat men de stam F 1 (type A) moeilijk te immuniseeren is, eerst na vier series injecties zijn antistoffen in aantoonbare hoeveelheden aanwezig. Deze stam groeit onder buitengewoon sterke slijmvorming, wat zich vooral uit in de grootte van de kapsels der bacteriën. Waarschijnlijk is dit niet alleen van invloed op de antigene werking, maar ook op de agglutinabiliteit.

Om een indruk te krijgen omtrent de beste wijze van inspuiten, moeten we vergelijken de dieren 6 met 7, 8 met 9 en 10 met 11. We zien dan, dat afwisselend intraveneus — intraperitoneaal geen voordeelen geeft boven uitsluitend intraveneus.

Bovendien blijkt, dat het toedienen van een vierde serie injecties de titer doet afnemen, tenzij na drie series geen of weinig antistoffen zijn aan te toonen.

In de derde reeks proeven hebben wij getracht te vergelijken de resultaten van uitsluitend intraveneus injiceeren met afwisselend intraveneus-subcutaan.

Derde reeks.

De dieren met even nummers kregen alleen intraveneuze injecties, die met oneven nummers ontvingen de inspuitingen om de andere intraveneus en subcutaan.

Alleen intraveneus.

No. 12. met stam F 1 (type A).

6 injecties met resp. 0.1, 0.2, 0.5, 0.5, 1 en 1 cm^3 (1e serie).
6 „ „ 1 cm^3 (2e serie).
6 „ „ 1 cm^3 (3e serie).

Titers: 0, $^1/_{20}$, 0.

No. 14. met stam F 7 (type B).

Als no. 12.

Titers: $^1/_{600}$, $^1/_{2000}$, $^1/_{2000}$.

No. 16. met stam F 10 (type C). Als voren.
Titers: $^1/_{100}$, $^1/_{500}$, $^1/_{400}$.

No. 18. met stam F 10 (type C). Als voren. Gestorven tijdens de 2e serie inspuitingen.
Titers: $^1/_{300}$.

No. 20. met stam F 10 (type C). Als voren.
Titers: $^1/_{300}$, $^1/_{200}$, $^1/_{1500}$.

No. 22. met stam F 10 (type C). Als voren.
Titers: $^1/_{400}$, $^1/_{1000}$, $^1/_{1000}$.

Afwisselend intraveneus — subcutaan.

No. 13. met stam F 1 (type A). Hoeveelheden als no. 12.
Titers: $^1/_{80}$, $^1/_{80}$, $^1/_{10}$.

No. 15. met stam F 7 (type B). Als voren.
Titers: $^1/_{1000}$, $^1/_{2000}$, $^1/_{1500}$.

No. 17. met stam F 10 (type C). Als voren.
Titers: $^1/_{100}$, $^1/_{800}$, $^1/_{400}$.

No. 19. met stam F 10 (type C). Als voren.
Titers: $^1/_{100}$, $^1/_{100}$, $^1/_{200}$.

No. 21. met stam F 10 (type C). Als voren.
Titers: $^1/_{400}$, $^1/_{100}$, $^1/_{400}$.

No. 23. met stam F 10 (type C). Als voren.
Titers: $^1/_{300}$, $^1/_{800}$, $^1/_{800}$.

Onderling te vergelijken zijn de nos. 12 met 13, 14 met 15, en de nos. 16 t/m 22 met de nos. 17 t/m 23. Naar deze uitkomsten te oordeelen, is er geen reden om aan te nemen dat een afwisselende wijze van inspuiten voordeelen geeft boven uitsluitend intraveneus injiceeren.

Uit de drie reeksen proeven kunnen we concludeeren: Voor de bereiding van antisera tegen Klebsiella-stammen, kan men het beste gebruik maken van door formaldehyde gedoode bacteriën en deze om de andere dag intraveneus toedienen. Meer dan drie series van 6 injecties (van elk 1 cm^3)

mogen niet gegeven worden, daar anders het antistofgehalte daalt. Alleen wanneer na 3 series inspuitingen de titer zeer laag is, kan een vierde serie voordeelen opleveren.

De agglutinatietiter der antisera.

De titers van de tegen de stammen F 7 (type B) en F 10 (type C) gerichte sera zijn opvallend hooger dan die, welke door Goslings en later door Wielenga zijn bereid. Wij vermoedden, dat dit verschil moest worden toegeschreven aan een verschil in uitvoering der agglutinatieproef, in het bijzonder aan de bij de reactie gebruikte hoeveelheid antigeen. Reeds veel vroeger was door Arrhenius waargenomen, dat een lagere agglutinatietiter wordt gevonden, naarmate men bij de reactie meer antigeen gebruikt. Duncan ([6]) stelde bij enkele Salmonella-stammen vast, dat het eindpunt van een agglutinatiereeks ligt bij een bepaalde verhouding van antigeen en antilichaam. Over het begrip „titer" spreekt hij niet, maar deze zou volgens zijn uitkomsten omgekeerd evenredig moeten zijn met de gebruikte hoeveelheid antigeen. Wij hebben nagegaan, of deze standvastige verhouding ook bij onze Klebsiella-stammen bestond, maar slaagden er niet in deze vast te stellen. Wel traden bij gebruik van grootere hoeveelheden antigeen bij de agglutinatiereactie lagere titers op, van een evenredigheid was evenwel geen sprake; bovendien heeft bij het eene serum de hoeveelheid antigeen veel meer invloed dan bij het andere. Dr. Wielenga deelde mij mede, dat ook hij dergelijke resultaten had verkregen.

Wielenga en Goslings voerden de agglutinatieproef uit volgens de op het Laboratorium voor Tropische Hygiëne te Amsterdam gebruikelijke wijze, waarbij ongeveer gelijke volumina bacteriesuspensie en serumverdunning worden gebruikt, wij voegden aan 0.6 cm^3 serumverdunning één druppel suspensie met een „pipet Pasteur" toe, dus relatief veel minder antigeen, de door ons gebruikte suspensies waren echter geconcentreerder. Vooral dit laatste feit maakt een quantitatieve vergelijking tusschen de op beide laboratoria gebruike-

lijke verhoudingen antigeen: antilichaam niet mogelijk, omdat de sterkte der suspensies moeilijk reproduceerbaar is.

Enkele sera zijn op beide laboratoria volgens de daar geldende methoden onderzocht, eenige resultaten laten wij hieronder volgen:

stam	type	titer Amsterdam	Utrecht
F 1	A	1/32	1/100
F 7	B	1/128	1/3000
F 10	C	1/512	1/2000
F 10	C	1/160	1/2000

We zien hier, dat er van vaste verhouding tusschen de in Amsterdam en in Utrecht bepaalde methode geen sprake is, met twee sera van (volgens de Utrechtsche methode bepaald) dezelfde titer wordt zelfs geen overeenstemming verkregen!

Het bovenstaande leert ons, dat opgave van agglutinatietiters geen zin heeft, wanneer niet tevens wordt opgegeven op welke wijze zij zijn bepaald.

Verder kunnen wij aannemen, dat onze methode van immuniseeren effectiever is dan die, welke door Goslings en Wielenga gevolgd werden.

Tot slot moet nog worden vermeld, dat de titers der sera, welke zonder toevoeging van conserveermiddelen maandenlang bij —4° C konden worden bewaard, op den duur tot op ongeveer ¼ à ½ van de oorspronkelijke waarde terugliepen, hetgeen echter hun bruikbaarheid bij de precipitatieproeven niet verminderde.

Precipitatiereacties.

De precipitatieproef voerden wij uit als ringreactie: 0.5 cm^3 polysaccharide-oplossing, bereid met behulp van physiologische NaCl-oplossing, pipetteerden wij voorzichtig op 0.5 cm^3 van het antiserum, zóó, dat geen vermenging van de vloeistoffen plaats vond. Het antiserum gebruikten wij steeds verdund met physiologische NaCl-oplossing: 1 : 10. De verdun-

ningen, welke op het grensvlak der twee vloeistoffen een witten ring veroorzaakten, beschouwden wij als positief reageerend.

Zoowel lipoïd-polysaccharide, als vrij polysaccharide bleken tot een verdunning van 1 : 2.000.000 te reageeren met het tegen het type C gerichte serum, in het geheel niet met de anti-A- en anti-B sera. Het lipoïde reageerde met geen der drie sera.

Verzadigingsproef.

1 cm^3 antiserum (type C) lieten wij reageeren met 1 cm^3 van een 1 : 1000 oplossing van het lipoïd-polysaccharide en centrifugeerden na 2 uur bij 37° het ontstane neerslag af. Bij de heldere bovenstaande vloeistof voegden wij opnieuw genoemde oplossing en centrifugeerden ook nu af, deze bewerkingen werden zoolang herhaald, totdat verdere toevoeging van polysaccharide geen neerslag meer deed ontstaan, wij konden het serum dan als verzadigd met lipoïd-polysaccharide beschouwen of, anders gezegd, alle tegen het lipoïd-polysaccharide gerichte antistoffen zijn uit het serum verwijderd. Dit „verzadigde serum" reageerde niet meer met het vrije polysaccharide.

Uit een ander proefje van 1 cm^3 anti-C-serum verwijderden wij op geheel dezelfde wijze alle antistoffen tegen het vrije polysaccharide gericht. Thans bleek het verzadigde serum nog tot een verdunning van 1 : 200.000 met het lipoïd-polysaccharide te reageeren. Hieruit blijkt duidelijk, dat lipoïdhoudend en lipoïdvrij koolhydraat in serologisch opzicht verschillend zijn.

Antigene eigenschappen.

In de inleiding vermeldden wij reeds, dat bij een aantal Gram-negatieve bacteriesoorten het voorkomen van lipoïd-polysacchariden was waargenomen. Deze stoffen bleken in staat te zijn bij proefdieren antistoffen op te wekken, en bovendien een toxische werking te bezitten. Het lipoïde en

het polysaccharide missen deze eigenschappen, wanneer zij in vrije toestand verkeeren. Dit was voor ons aanleiding om na te gaan, of het door ons geïsoleerde complex eveneens toxisch en antigeen zou zijn, daarnaast moesten controleproeven met de beide componenten afzonderlijk worden uitgevoerd.

Op de volgende wijzen hebben wij getracht de antigene eigenschappen van het lipoïd-polysaccharide en van de vrije componenten aan te toonen:

1. door het opwekken van precipitinen bij konijnen;
2. door het opwekken van precipitinen bij caviae;
3. door de beschermende werking tegen infecties na behandeling met de homologe stam bij muizen.

1. *Het opwekken van precipitinen bij konijnen.*

De stoffen werden intraveneus toegediend als ½ %-oplossingen in physiologische zoutoplossing, wij maakten steeds gebruik van de Na-zouten der koolhydraatzuren, daar de pH van hun oplossingen weinig van die van het neutrale punt verschilt.

No. 24. 5 mg *lipoïd-polysaccharide,* 48 uur later nogmaals 5 mg.
Gestorven één dag na de tweede injectie.

No. 25. injecties van 1 mg *lipoïd-polysaccharide,* om de andere dag toegediend. Acht dagen na de laatste injectie gaf het serum een duidelijke precipitatiereactie, zoowel met het lipoïdvrije, als met het lipoïdhoudende koolhydraat, de precipitatietiter bedroeg in beide gevallen 1 : 20.000.

No. 26. 5 injecties van 5 mg *vrij polysaccharide,* om de andere dag.
Geen antistoffen in het serum 8 dagen na de laatste injectie.

No. 27. 5 injecties van 1 mg *vrij polysaccharide,* om de andere dag.

Geen antistoffen aan te toonen.

No. 28. 5 injecties met 2 mg *vrij lipoïde*, om de andere dag.
Geen antistoffen aan te toonen.

No. 29. 5 injecties met 0.4 mg *vrij lipoïde*, om de andere dag.
Geen antistoffen in het serum.

No. 36. 2 intraperitoneale injecties met 1 mg *lipoïd-polysaccharide*, tusschenpoos 14 dagen.
8 dagen na de laatste inspuiting waren in het serum precipitinen aan te toonen, de titer bedroeg ook hier 1 : 20.000.
(Dit dier had reeds eerder 4 intraveneuze injecties met vrij koolhydraat ontvangen, 14 dagen na de laatste van deze injecties ontving het dier de eerste intraperitoneale inspuiting. Zie ook bij toxische proeven).

Uit deze resultaten blijkt, dat voor konijnen het lipoïdhoudende koolhydraat een precipitinogeen is, bij beide componenten van deze stof ontbreekt deze eigenschap.

2. *Het opwekken van precipitinen bij caviae.*

Caviae werden met dezelfde oplossingen ingespoten, als waarmede de konijnen waren behandeld, de injecties geschiedden hier echter subcutaan.

No. 1. 2 injecties met 5 mg *lipoïd-polysaccharide*, tusschenpoos 7 dagen.
15 dagen na de laatste injectie werden de inspuitingen voortgezet, nog 4 injecties met elk 1 mg werden om de andere dag gegeven.
12 dagen na de laatste injectie had het serum een precipitatietiter van 1 : 20.000.

No. 2. gestorven 1 dag na één injectie met 5 mg *lipoïd-polysaccharide*.

No. 3. als no. 1, ook hier had het serum een titer van 1 : 20.000.

Nos. 5 en 6 werden op dezelfde manier als no. 1, maar thans met het vrije koolhydraat behandeld. Bij geen dezer dieren werden in het serum precipitinen waargenomen.

Ook voor caviae blijkt het lipoïdhoudende polysaccharide een precipitinogeen te zijn, het vrije polysaccharide is dit niet. Daar wij niet voldoende vrij lipoïde bezaten, werden hiermede geen caviae behandeld.

3. *Beschermende werking bij muizen.*

De bedoeling van dit experiment was na te gaan of muizen, na herhaald inspuiten met polysaccharidepreparaten, immuun zouden zijn tegen infecties met een virulente, homologe bacteriestam.

Twaalf witte muizen werden daartoe bij de staartwortel 3 maal subcutaan ingespoten met 0.01 mg *lipoïd-polysaccharide,* met tusschenpoozen van 4 dagen. Een week na de laatste injecte werden alle muizen geïnfecteeerd, vier met een Klebsiella pneumoniaestam van het type A, vier met een stam van het type B en vier met een stam van het type C.

Een andere serie van 12 muizen ontving op dezelfde wijze drie injecties met 0.01 mg *vry polysaccharide* en werd eveneens geïnfecteerd met dezelfde stammen.

Na eenige dagen waren alle muizen gestorven, uit het bloed van de dieren was in alle gevallen de stam, waarmede geïnfecteerd was, weer te kweeken. Een type-specifieke immuniteit hadden dus onze injecties niet opgewekt.

Toxische eigenschappen.

Zoowel het lipoïdhoudende, als het lipoïdvrije polysaccharide hebben wij ingespoten bij konijnen, caviae en muizen, teneinde de toxische werking van genoemde stoffen bij deze diersoorten na te gaan. De secties der gestorven dieren, het bacteriologisch onderzoek en het vaststellen van de doodsoorzaak werden uitgevoerd op het Rijks-Instituut voor de Volksgezondheid te Utrecht, veel dank ben ik in dezen ver-

schuldigd aan Dr. W. A. Timmerman en Dr. A. Clarenburg.

A. Konijnen.

No. 30. 2 maal 5 mg *lipoïd-polysaccharide,* intraveneus, tusschenpoos 2 dagen, dood 1 uur na de laatste injectie. Doodsoorzaak: coccidiose.

No. 31. als no. 30, eveneens gestorven 1 uur na de laatste injectie.

Sectie: bloedinkjes in de longen.
Lever en nier gezwollen, milt geringe zwelling.
Ook hier necrotische haardjes in lever en nier, veroorzaakt door thrombose.

Bact. onderzoek: negatief.

No. 33. *2 maal 1 mg lipoïd-polysaccharide,* intraveneus, tusschenpoos 2 dagen. Gestorven ½ uur na de laatste injectie.

Sectie: geen afwijkingen.

Bact. onderzoek: negatief.

No. 34. als no. 33, gestorven 5 dagen na de laatste injectie.

Sectie: lever en milt gezwollen.
Ook nu weer necrotische haardjes in lever en nieren, als gevolg van thrombose.

Bact. onderzoek: negatief.

Het geregeld voorkomen van vaatverstoppingen deed ons ervan afzien om met ½ %-oplossingen intraveneus in te spuiten, wij achtten het n.l. zeer wel mogelijk, dat de vrij visceuze oplossingen de oorzaak waren van de thrombose, welke zou kunnen bijdragen tot den dood van de proefdieren. In het vervolg werd daarom gewerkt met 0.1 % oplossingen, ook werden enkele dieren intraperitoneaal ingespoten.

No. 35. (reeds eerder ingespoten met *vrij polysaccharide)* 1 mg *lipoïd-polysaccharide,* intraperitoneaal. Gestorven ½ dag na de injectie.

Sectie: geen afwijkingen, slechts de milt een weinig gezwollen.

Bact. onderzoek: negatief.

No. 39. 5 mg *lipoïd-polysaccharide*, intraperitoneaal. Gestorven 3 uur na de injectie.
Sectie: weinig sereus vocht in de buikholte, verder geen afwijkingen.
Bact. onderzoek: negatief.

No. 40. als no. 39, gestorven 1 dag na de injectie.
Sectie: geringe mucopurulente peritonitis.
Bact. onderzoek: negatief.

No. 41. 2 maal 0.5 mg *lipoïd-polysaccharide*, intraveneus, tusschenpoos 2 dagen. Gestorven 4 dagen na de laatste injectie.
Sectie: geen afwijkingen.
Bact. onderzoek: negatief.

No. 42. als no. 41, dood 2 uur na de laatste injectie.
Sectie: milt enkele infarcten.
Lever gezwollen, bleek, bros: vettige degeneratie.
Bact. onderzoek: negatief.

Slechts in twee gevallen hebben de konijnen de injecties met *lipoïd-polysaccharide* doorstaan. Dit zijn de nos. 25 en 36, reeds vermeld bij het onderzoek naar de antigene eigenschappen. Uit bovenstaande resultaten meenen wij te mogen concludeeren, dat het *lipoïd-polysaccharide* toxisch is voor konijnen.

Wat de toxische eigenschappen van het *vrije polysaccharide* betreft, verwijzen wij allereerst naar de nos. 26 en 27, welke, na herhaald inspuiten met deze stof, in leven bleven. Verder moeten worden genoemd:

No. 35. 4 maal 5 mg *vrij polysaccharide*, intraveneus om de andere dag.

No. 36. als no. 35.

No. 37. 5 maal 1 mg *vrij polysaccharide*, intraveneus om de andere dag.

No. 38. als no. 37.

Ook deze vier dieren bleven in leven. Het *lipoïdvrije poly-*

saccharide bezit dus voor konijnen geen toxische eigenschappen.

Met het lipoïde alleen konden wij wegens gebrek aan materiaal geen experimenten uitvoeren.

B. Caviae.

Deze werden alle subcutaan ingespoten.

Nos. 1, 3 en 4 verdroegen alle 2 injecties met 5 mg *lipoïd-polysaccharide*, met een tusschenpoos van een week gegeven, zij werden verder met deze stof behandeld (zie hiervoor antigene eigenschappen).

No. 2. 5 mg *lipoïd-polysaccharide*, gestorven één dag na deze injectie.

Sectie: weinig sereus vocht in de buikholte. Bloedinkjes in maag, long en bijnier. Oedeem mesenterium. Vrij sterke miltzwelling.

Bact. onderzoek: negatief.

Nos. 5 en 6 werden met het *vrije polysaccharide* ingespoten op geheel dezelfde wijze als no. 1, beide dieren bleven in leven.

Bact. onderzoek: negatief.

Nos. 7 en 8 ontvingen 4 injecties met 1 mg *vrij polysaccharide*, om de andere dag toegediend. Ook deze dieren bleven in leven.

De laatste vier dieren werden nog eenige malen met 5 mg *lipoïd-polysaccharide* ingespoten, zij bleven ook nu nog volkomen gezond.

Conclusie: ten opzichte van caviae is het *lipoïd-polysaccharide* niet toxisch, evenmin is dit met het *vrije polysaccharide* het geval.

C. Muizen.

Vier witte muizen werden subcutaan ingespoten met 2 mg *lipoïd-polysaccharide*. Drie hiervan stierven binnen 24 uur, de vierde overleed na 5 dagen.

Sectie: bij alle geringe miltzwelling.

Bact. onderzoek: negatief.

Vier andere muizen kregen een geringere dosis van dezelfde stof: 0.5 mg. Eén overleed na een week aan een Pasteurella-infectie, de anderen bleven in leven.

Op dezelfde wijze voerden wij de experimenten uit met het *vrije polysaccharide:* vier muizen ontvingen 2 mg en vier andere 0.5 mg. Van iedere groep overleed er één aan een Pasteurella-infectie, alle andere bleven in leven.

Conclusie: het *lipoïd-polysaccharide* is toxisch voor muizen, de doodelijke dosis is echter relatief grooter dan die voor konijnen. Het vrije polysaccharide is voor deze dieren niet toxisch.

Hapteeneigenschappen.

De immuniteitsleer verstaat onder *haptenen* stoffen, welke in staat zijn om met bepaalde antisera te reageeren, maar geen antigene eigenschappen bezitten. Eerst wanneer zij gebonden zijn aan een stof, welke wel tot het opwekken van antistoffen in staat is, ontstaat een complex, dat ook weer antigeen is en waarvan de specificiteit bepaald wordt door het hapteen. Van de meeste eiwitten is bekend, dat zij antigenen zijn, stoffen die niet tot de proteïnen behooren zouden deze eigenschap missen, zij verkrijgen deze pas na gebonden te zijn aan een eiwit.

In de door Landsteiner bereide antigeencomplexen heeft deze binding plaats door middel van een diazoverbinding, hoe in de natuur de stoffen met hapteeneigenschappen aan het eiwit gebonden zijn, daarover staat nog weinig vast. Sevag (7) zegt hierover: „Was das gemeinsame Vorkommen von Polysacchariden und Eiweissstoffe in Bakterien usw. betrifft, so muss es offen bleiben, ob die Polysaccharide chemisch oder durch Adsorptionskräfte locker an Eiweiss gebunden sind, oder ob sie völlig unabhängig neben den Eiweiss existieren". De methode, welke hij heeft uitgewerkt voor de scheiding van eiwit en koolhydraat, berust op de veronderstelling dat de beide stoffen niet chemisch verbonden zijn, maar door adsorptie. Gezien onze ervaringen met deze

methode (zie hoofdstuk II), moeten wij erkennen dat deze, wat de scheiding van deze twee stoffen betreft, volkomen geslaagd mag heeten, men mag echter uit dit resultaat niet de conclusie trekken, dat er geen chemische binding tusschen eiwit en koolhydraat aanwezig is. Het is n.l. zeer goed mogelijk, dat een deel van het polysaccharide steeds in vrije toestand aanwezig is geweest, òf omdat het van nature gedeeltelijk zoo in de cel voorkomt, òf omdat het gedurende het kweeken wordt vrijgemaakt door fermenten. Zijn scheidingsmethode zou dan neerkomen op een scheiden van twee reeds afzonderlijk aanwezige stoffen, en niet op het losmaken van een niet zeer vaste verbinding hiertusschen. Dat zijn veronderstelling over het bestaan van een adsorptiebinding tusschen bacterie-eiwit en -polysaccharide onjuist is, willen wij niet beweren, zij zal echter nader dienen te worden getoetst. Bovendien lijkt ons het gebruik van het woord „adsorptie" bezwaarlijk, de beide soorten van verbindingen, waarom het hier gaat, zijn daarvoor te gecompliceerd van bouw. Beter kan men van adsorptie spreken bij de kunstmatige antigenen van Zozaya ([8]), welke bestaan uit polysaccharide en een stof met eenvoudige samenstelling, zooals kool, aluminiumovyde e.d. De met deze antigenen bereikte resultaten zijn echter te weinig reproduceerbaar om te mogen concludeeren dat hier inderdaad sprake is van een adsorptiebinding.

Ook over de juistheid van Sevag's derde veronderstelling, n.l. dat eiwit en polysaccharide onafhankelijk van elkaar bestaan, zijn geen experimenteele gegevens bekend. Wel is bekend, dat sommige orgaanextracten hapteeneigenschappen blijken te bezitten, wanneer ze vermengd met serum (meestal wordt hiervoor varkensserum gebruikt) bij proefdieren worden ingespoten. Hierbij moet er de aandacht op worden gevestigd, dat het hier geen stoffen van bekende chemische structuur betreft, maar een mengsel van onbekende samenstelling. Aangezien wij de beschikking hadden over polysaccharide, waarvan de samenstelling grootendeels bekend was,

achtten wij het de moeite waard om deze stoffen, gemengd met varkensserum, bij konijnen in te spuiten.

De injecties werden om de andere dag intraveneus toegediend, in totaal werden 5 injecties gegeven. De injectievloeistoffen bestonden uit 0.5 cm^3 serum en 4.5 cm^3 physiologische zoutoplossing, welke 5 mg polysaccharide bevatte, per cm^3 vloeistof was dus 1 mg polysaccharide aanwezig. De ingespoten hoeveelheden bedroegen bij ieder dier resp. 0.2, 0.5, 0.5, 0.5 en 0.5 cm^3. Een week na de laatste injectie werd bloed afgenomen en het serum op de aanwezigheid van precipitinen onderzocht.

No. 43. lipoïd-polysaccharide. Precipitatietiter: 1 : 100.000.

No. 44. als no. 43, de precipitatietiter was ook hier 1 : 100.000.

No. 45. lipoïdvrij polysaccharide (als vrij zuur). Geen precipitinen.

No. 46. als no. 45, ook hier geen precipitinen aanwezig.

No. 47. lipoïdvrij polysaccharide (Na-zout), geen precipitinen.

No. 48. als no. 47, geen precipitinen.

No. 49. controle, ingespoten met serum 1 : 10, geen precipitinen.

Tezamen met serum ingespoten, wekt dus alleen het *lipoïd-polysaccharide* antistoffen op.

Wij hebben evenwel reeds aangetoond, dat deze stof van nature antigeen is, hier blijkt echter, dat deze eigenschap, wanneer men met serum gemengd inspuit, sterker tot uiting komt, immers de nu verkregen precipitatietiters zijn eenige malen hooger dan de vroeger waargenomen titers. Hoe merkwaardig dit resultaat op zichzelf ook zijn moge, het kan ons niet inlichten over een eventueele wisselwerking tusschen de polysacchariden en de moleculen der serumeiwitten.

LITERATUUR.

1. K. Goodner, F. L. Horsfall, Journ. exp. Med. **64**, 201 (1936).
2. M. Gasiorowski, E. Mikulaszek, Z. für Imm.forschung **70**, 19 (1931).
   J. Tomczik, Proc. Soc. exp. Biol. and Med. **24**, 812 (1927).
3. O. T. Avery, M. Heidelberger, W. F. Goebel, Journ. exp. Med. **42**, 709 (1925).
4. W. R. O. Goslings, diss. Amsterdam (1935), bldz. 141.
5. D. K. Wielenga, diss. Amsterdam (1937), bldz. 95.
6. J. T. Duncan, Brit. Journ. exp. Path. **15**, 23 (1934).
7. M. G. Sevag, Bioch. Zeitschr. **273**, 419 (1934).
8. J. Zozaya, Journ. exp. Med. **55**, 325 (1932).

SAMENVATTING.

Uit een kapseldragende stam van Klebsiella pneumoniae (Bacterium pneumoniae Friedländer), serologisch behoorende tot het type C, isoleerden wij een stof, welke tot een verdunning van 1 : 2.000.000 een specifieke precipitatiereactie gaf met het homologe antiserum.

Deze stof bleek te zijn samengesteld uit een polysaccharide en een phospholipoïde. Door hydrolyse met 0.1 n azijnzuur konden polysaccharide en lipoïde afzonderlijk worden verkregen.

Uit een nader onderzoek bleek, dat het polysaccharide d-mannose en d-galactose bevatte, bovendien kon een fractie worden geïsoleerd welke een uronzuur, gemengd met of gebonden aan een of meer suikers, bevatte.

Het lipoïde-polysaccharidecomplex bleek toxisch te zijn voor konijnen en muizen, echter niet voor caviae. Ook slaagden wij erin met deze stof precipitinen op te wekken in het bloed van konijnen en caviae. Deze eigenschappen ontbreken bij het lipoïdvrije polysaccharide.

SUMMARY.

From an encapculated strain of Klebsiella pneumoniae (Bacterium pneumoniae Friedländer), serologically belonging to the type C, we isolated a substance, which gave a specific precipitationreaction with the homologue antiserum to a dilution of 1 : 2.000.000.

This substance proved to be composed of a polysaccharide

and a phospholipin. These two constituents could be obtained separated by means of hydrolysis with 0.1 n acetic acid.

A further investigation of the polysaccharide proved that it contained d-mannose and d-galactose. Another fraction could be isolated, which contained an uronic acid, probably mixed with or linked to one or more sugars.

The phospholipin-polysaccharidecomplex proved to be toxic for rabbits and mice, but not for guinea-pigs. We also succeeded in producing with this substance precipitins in the blood of rabbits and guinea-pigs. The lipinfree polysaccharide does not posess these properties.

ZUSAMMENFASSUNG.

Aus einem kapseltragenden Stamm von Klebsiella pneumoniae (Bacterium pneumoniae Friedländer), serologisch zu dem Typus C gehörend, isolierten wir eine Substanz, welche bis zu einer Verdünnung von 1 : 2.000.000 eine spezifische Prezipitationsreaktion mit dem homologen Antiserum gab.

Diese Substanz erwies sich als aufgebaut aus einem Polysaccharid und einem Phosphatid. Durch Hydrolyse mit 0.1 n Essigsäure konnte Zerlegung in die Komponente Polysaccharid und Phospatid durchgeführt werden.

Eine weitere Untersuchung des Polysaccharids ergab, dass dieses d-Mannose und d-Galaktose enthielt, ausserdem isolierten wir eine Fraktion, welche eine nicht näher identifizierte Uronsäure, wahrscheinlich gebunden an oder gemischt mit einem oder mehreren Zucker, enthielt.

Das Phosphatid-Polysaccharidekomplex zeigte sich toxisch für Kaninchen und Mäuse, nicht aber für Meerschweinchen. Auch gelang es uns mit diesem Stoffe im Blute von Kaninchen und Meerschweinchen Prezipitine aufzuregen. Diese Eigenschaften fehlen bei dem Phosphatidfreien Polysaccharid.

RÉSUMÉ.

Nous avons isolé d'une source encapsulé de Klebsiella pneumoniae (pneumobacille de Friedländer), appartenant sérologiquement au type C, une substance qui, jusqu'à une dilution de 1 : 2.000.000, donnait une réaction de précipitation spécifique avec de l'antiserum homologue.

Cette substance était un complexe glucido-lipidique, composé d'un polysaccharide et d'un lipoïde. Nous avons séparés ces deux components par hydrolysation avec de l'acide acétique 0.1 n.

De recherches plus détaillées il paraissait, que le polysaccharide contenait le d-mannose et le d-galactose, en outre nous avons isolé une fraction, contenant un acide uronique pas identifié, qui était probablement melé à ou lié à un ou plusieurs sucres.

Le complexe glucido-lipidique se montrait toxique pour les lapins et les souris, mais pas pour les cobayes. Nous avons produit avec cette substance des précipitines dans le sang des lapins et des cobayes. Le polysaccharide libéré du lipoïde ne possède pas ces propriétés.

INHOUD.