Over het opsporen van "eendenei" in eet- en drinkwaren : een serologisch onderzoek

OVER HET OPSPOREN VAN „EENDENEI" IN EET- EN DRINKWAREN

O. BOSGRA

Diss Utrecht 1941

OVER HET OPSPOREN VAN „EENDENEI" IN EET- EN DRINKWAREN

EEN SEROLOGISCH ONDERZOEK

PROEFSCHRIFT
TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE VEEARTSENIJKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS DR. H. R. KRUYT, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER VEEARTSENIJKUNDE TE VERDEDIGEN OP DONDERDAG 6 FEBRUARI 1941, DES NAMIDDAGS TE 2 UUR,

DOOR
OKKE BOSGRA
GEBOREN TE BERGUM

VAN GORCUM & COMP. N.V.
ASSEN

5

AAN MIJN VROUW

6

Het is een goede gewoonte bij het beëindigen van een proefschrift dank uit te spreken voor het genoten onderwijs. Immers, de kennis verworven in dien leertijd, stelt mij in staat mijn dagelijkschen arbeid te verrichten, ja was evenzeer voorwaarde voor het ontstaan van dit proefschrift.

Maar meer in het bijzonder naar U, Hooggeleerde VAN OYEN, Hooggeachte Promotor, gaat mijn groote dank uit. Gij hebt met de grootste belangstelling de vorderingen van dit onderzoek gevolgd; de publicatie daarvan in dezen vorm is voor een belangrijk deel aan Uw hulp en voorlichting te danken. Ik behoef verder slechts te denken aan de vaderlijke zorg, die U heeft gehad voor het in bewerking zijnde proefschrift en de daarbij behoorende gegevens, die ik in het stellinggebied der Grebbelinie moest achterlaten bij den terugtocht van ons leger. U heeft zich de moeite getroost de voor mij onvervangbare gegevens op te sporen en in veiligheid te stellen. Het uitspreken van mijn bijzondere dankbaarheid daarvoor beteekent voor mij meer dan een formule.

Ook U, Zeergeleerde DE BOER, ben ik zeer veel dank verschuldigd voor de wijze, waarop Gij mij in de gelegenheid stelde dit onderzoek te verrichten, ten behoeve van een juiste uitvoering der contrôle op voedings- en genotmiddelen door de Keuringsdiensten van waren. De groote vrijheid, die Gij mij liet bij het bewerken der uitgebreide proeven en de belangstelling, die Gij voor de vorderingen van het onderzoek hebt betoond, waren voor mij een onontbeerlijke steun.

Den Directeuren van Keuringsdiensten van waren en van andere laboratoria, die mij door het toezenden van monsters in de gelegenheid stelden de betrouwbaarheid der in dit proefschrift beschreven methoden van onderzoek te toetsen, betuig ik mijn welgemeenden dank.

Weledelgestrenge KLAMER, Weledelgeleerde RISSELADA, vele keeren heb ik mij tot U gewend met onderwerpen, die buiten eigen gezichtskring vielen. Steeds hebt Gij Uw kennis te mijner beschikking gesteld, waarvoor ik gaarne mijn dank betuig.

Ik zou onvolledig zijn, wanneer ik op deze plaats niet mijn vrouw zou danken voor de vele opofferingen, die zij zich tijdens de totstandkoming van dit proefschrift heeft willen getroosten.

Ten slotte dank ik de talloos velen, van wie ik meer in 't bijzonder de heeren SCHUT en NIJHOFF wil noemen, die mij bij mijn onderzoek hun medewerking hebben verleend.

INHOUD.

INLEIDING.

In 1937 beschrijft ZWANENBURG [1]) in zijn dissertatie. „Over Salmonella-infectie in eendeneieren" uitvoerig de gevaren, die voor den mensch verbonden zijn aan het nuttigen van eendeneieren of van eet- of drinkwaren, welke bereid zijn met eendeneieren. *)

Hij vermeldt een groot aantal gevallen van voedselvergiftiging, ontstaan na het nuttigen van aardappelsla en haringsla met mayonnaise, roerei, spiegelei, pudding, koek, taartjes, slagroom en consumptieijs, waarbij het vaststaat of waarschijnlijk is, dat eendeneieren, welke met Salmonella-bacteriën waren besmet, bij de bereiding werden gebruikt.

De tijdens de bereiding der spijzen bereikte temperatuur bleek niet voldoende hoog te zijn geweest om alle kiemen te dooden, terwijl een deel der overlevende bacteriën gelegenheid kreeg zich in de spijzen, vóór deze genuttigd werden, sterk te vermeerderen.

Door het gebruik van minder versche eendeneieren, waarin de reeds aanwezige Salmonella's tot ontwikkeling konden komen, werd het ontstaan der voedselvergiftigingen nog bevorderd.

De besmetting der spijzen kon plaats vinden:

1. Doordat de eiinhoud Salmonella-bacteriën bevatte.
2. Doordat op de eischaal bovengenoemde kiemen aanwezig waren, zoodat bij het stukbreken der eieren besmetting der spijzen plaats vond.

De volgende twee variëteiten van paratyphusbacteriën bleken aanleiding te geven tot deze vorm van infectie:

a. Salmonella enteritidis var. Essen,

b. Salmonella typhi murium.

Deze bacteriën komen voor in en op eieren, afkomstig van eenden, die met hetzelfde microörganisme geïnfecteerd zijn. Juist deze dieren lijden frequent aan infecties der inwendige geslachtsorganen met deze microörganismen, of herbergen deze microben als „bacillendragers" elders, zoodat het voor de hand ligt, dat een meer of minder groot deel der gelegde eieren, hetzij inwendig, hetzij uitwendig of wel beide, besmet zijn met Salmonella.

---

*) Zie ook CLARENBURG, „Paratyphus in eendeneieren", Geneeskundige Gids, 14 Jan. 1938, blz. 114.

De doeltreffendste wijze om deze voedselvergiftiging definitief te voorkomen, zou bereikt kunnen worden door den geheelen eendenstapel te saneeren en hoewel ZWANENBURG de mogelijkheid daartoe aantoont, leert de georganiseerde tuberculosebestrijding ons wel hoe uitermate moeilijk en tijdroovend het zal zijn een dergelijke besmettelijke ziekte over geheel Nederland volkomen uit te roeien.

In dit verband zij nog gewezen op de onderzoekingen van VAN OIJEN [128]), die eveneens tot de conclusie komt, dat een volkomen saneering met de beschikbare hulpmiddelen op groote moeilijkheden zal stuiten, hoewel een zeer groote verbetering in de gezondheidstoestand der eenden mogelijk is.

Tevens wijst hij op de mogelijkheid den vloeibaren inhoud der eendeneieren door pasteurisatie te bevrijden van levende paratyphusbacteriën en het aldus verkregen product door bevriezing te conserveeren.

Onder deze omstandigheden heeft de Nederlandsche Overheid gemeend het publiek in bescherming te moeten nemen tegen het nuttigen van eendeneieren en eet- of drinkwaren, die bereid zijn met eendeneieren of deelen daarvan en die niet een zoodanige verhitting hebben ondergaan, dat de mogelijkheid eener voedselvergiftiging voldoende uitgesloten mag worden geacht.

Daartoe werd in 1936 door de betrokken autoriteiten een waarschuwing gericht tegen het gebruik van eendeneieren anders dan in hard gekookten toestand en werd aangeraden deze slechts in bakwaren te verwerken, die hard gebakken worden. Speciaal werd geadviseerd eendeneieren niet te gebruiken voor de bereiding van pudding, vla, slagroommengsels en dergelijke, taartvullingen, consumptieijs, zacht gebak, kortom niet voor eetwaren, welke niet of onvoldoende verhit worden.

Bij Koninklijk Besluit van den 11den Juni 1937, (Staatsblad no. 848) tot aanvulling van het Consumptieijsbesluit, (Staatsblad 1934 no. 240) werd verder bepaald, dat consumptieijs niet mag zijn of worden bereid met andere eieren en/of eibestanddeelen dan die, afkomstig van kippen.

Een jaar later werden de bepalingen te dien aanzien uitgebreid met het Koninklijk Besluit van den 13den Juni 1938, (Staatsblad no. 857) tot wijziging van het Algemeen Besluit Warenwet, (Staatsblad 1925 no. 262).

De belangrijkste twee artikelen van dit Besluit luiden als volgt:

1. Eendeneieren of deelen daarvan mogen niet gebruikt worden of

gebruikt zijn bij de bereiding van eet- of drinkwaren, noch ook aanwezig zijn in perceelen, waar eet- en drinkwaren worden bereid, tenzij de directeur van den Keuringsdienst van waren voor het gebied, waarin die bereiding plaats vindt, van deze bepaling schriftelijk ontheffing heeft verleend.

2. Aan deze ontheffing kunnen voorwaarden worden verbonden, bij niet nakoming waarvan de ontheffing kan worden ingetrokken.

Wettelijk is met deze bepalingen het betreffende vraagstuk volkomen geregeld; de naleving daarvan brengt echter zekere moeilijkheden met zich. Zullen deze bepalingen aan hun doel beantwoorden, dan moeten overtredingen achterhaald en overtreders zoonoodig gestraft kunnen worden. Ten aanzien van het bepaalde, dat eendeneieren of deelen daarvan — voorzoover dit laatste betreft schalen van eendeneieren — niet aanwezig mogen zijn in perceelen, waar eet- en drinkwaren worden bereid, levert de contrôle op de naleving daarvan geen bijzondere moeilijkheden op. Zijn echter eendeneieren of deelen daarvan bij de bereiding van eet- of drinkwaren gebruikt en de eventueele resten, zooals schalen, vernietigd, dan rest als eenige mogelijkheid om dit gebruik vast te stellen het directe onderzoek der betreffende waren op eendeneitoevoeging.

Op grond van deze overwegingen moest worden nagegaan, of toevoeging van bestanddeelen van eenden- respectievelijk van kippeneieren in verschillende daarvoor in aanmerking komende eet- en drinkwaren kon worden vastgesteld. Daarbij moet er aan gedacht worden, dat sommige van deze waren *niet* verwarmd worden — de eibestanddeelen bevinden zich dan nog in „rauwen" of „verschen", hier verder genoemd „natieven" toestand — , terwijl bij andere waren een verhitting gedurende langer of korter tijd plaats heeft.

Daarom hebben wij getracht een antwoord te geven op de volgende vragen:

1e. is het mogelijk natieve eendeneibestanddeelen te differentieeren van natieve kippeneibestanddeelen;

2e. is het mogelijk eet- en drinkwaren te onderzoeken op aanwezigheid van natieve eendeneibestanddeelen;

3e. is het mogelijk bovengenoemde waren te onderzoeken op aanwezigheid van eendeneibestanddeelen, nadat deze verwarmd werden;

4e. in hoeverre is het mogelijk eet- en drinkwaren op overeenkomstige wijze te onderzoeken op kippeneitoevoeging?

EERSTE AFDEELING.

LITERATUUROVERZICHT.

HOOFDSTUK I.

METHODEN VAN ONDERZOEK OM NATIEVE EIWITTEN, TE DIFFERENTIEEREN NAAR DE DIERSOORT, WAARVAN ZE AFKOMSTIG ZIJN.

In dit hoofdstuk zullen de methoden van onderzoek, die zouden kunnen leiden tot beantwoording der in de inleiding gestelde vragen, aan de hand van de beschikbare literatuurgegevens worden besproken, waarbij de voor- en nadeelen der verschillende methoden critisch zullen worden beoordeeld, om daarna te komen tot een keuze der voor ons doel meest geschikte werkwijze.

Par. 1. Physische methode.

POPP [2]) kon door gebruik te maken van de eigenschappen van ultraviolet licht een verschillend gedrag opmerken tusschen *kippen- en eendendooierpoeder*, doordat onder invloed van dit licht het eerste een dofcitroengele-, het tweede een roodgele kleur (luminescentie) aanneemt. In *vloeibaren toestand* zijn beide dooiers minder goed van elkaar te onderscheiden. Kippen- en eendenei-wit *) geven in vloeibaren toestand in het geheel geen luminescentie; in gedroogden toestand lichten beide met een geelachtigen, eventueel blauwachtigen schijn op en hoewel ze door middel hiervan onderling niet gedifferentieerd kunnen worden, zijn ze toch duidelijk te onderscheiden van planteneiwit.

Par. 2. Chemische methode.

Reeds in 1829 trachtte BARUEL [14]) bloed te differentieeren door dit met zwavelzuur te behandelen. Hij meende aan den reuk, gelijkend op

*) In dit geval en in 't vervolg zal in dit proefschrift het witte kleurlooze deel van een vogelei steeds aangeduid worden met „ei-wit", zulks in tegenstelling met „eiwit", dat steeds de beteekenis zal hebben van proteine. Verscheidene onderzoekers laten namelijk den lezer hunner publicaties in het onzekere of „kippeneiwit" afkomstig is uit een ei, dan wel uit vleesch of bloedserum.

dien van zweet, te kunnen bepalen van welke diersoort het bloed afkomstig was.

DUDLEY en WOODMAN [3]) racemiseerden caseinogeen uit koemelk en schapemelk met loog, totdat het optisch draaiingsvermogen zich niet meer wijzigde. Vervolgens werden de door deze behandeling gegevormde produkten met zuur gehydrolyseerd tot aminozuren. Na isoleering der aminozuren werd het optisch draaiingsvermogen daarvan bepaald. Het bleek, dat de meeste aminozuren in beide gevallen een gelijk optisch gedrag vertoonden. Een drietal gevormd uit koemelk, namelijk tyrosine, glutaminezuur en lysine, bleken een ander draaiingsvermogen te bezitten dan dezelfde aminozuren, op gelijke wijze ontstaan uit schapemelk.

Op grond van deze verschillen concludeerden D. en W. tot de aanwezigheid van structureele verschillen tusschen beide caseinogeensoorten.

Op overeenkomstige wijze onderzochten DAKIN en DALE [4]) gekristalliseerd kippen- en eendenei-albumine. Ook hier werden bij het onderzoek van enkele der gevormde aminozuren optische verschillen waargenomen en wel zoodanige, dat beide eiwitten door middel van dit onderzoek gedifferentieerd konden worden.

Par. 3. Biologische methoden.

a. Anaphylaxiereactie.

Deze reactie is een specifieke eiwit-antieiwitreactie. Het verschijnsel, dat aan deze reactie ten grondslag ligt, werd voor het eerst ten aanzien van paardenserum door ARTHUS [19]) opgemerkt.

De anaphylaxiereactie berust op het feit, dat proefdieren — waarvoor meestal caviae dienst doen — door inspuiting van een geringe hoeveelheid eiwit overgevoelig worden voor een latere injectie met eiwit van dezelfde soort. Deze overgevoeligheid uit zich in het ontstaan van ernstige acute vergiftigingsverschijnselen, waarna als regel binnen korten tijd de dood intreedt.

Voor de uitvoering van deze reactie heeft men dus levende proefdieren noodig, die gesensibiliseerd zijn door injectie van dezelfde eiwitsoort, die men wenscht te differentieeren. Minstens twaalf dagen, gewoonlijk drie tot vier weken na deze sensibilisatie, zijn de proefdieren voldoende overgevoelig. Niet alle caviae laten zich echter tot een voldoenden graad sensibiliseeren, zoodat men genoodzaakt is verscheidene proefdieren tegelijk te behandelen. Voor contrôledoeleinden heeft men eveneens een aantal gesensibiliseerde caviae noodig, alsmede eenige onbehandelde.

Voor elk onderzoek zijn dus een vrij groot aantal proefdieren noodig, terwijl de uitslag eerst geruimen tijd na het begin der proef kan worden vastgesteld.

b. Complementbindingsreactie.

Deze reactie werd voor 't eerst door NEISZER en SACHS [5]) toegepast, met het doel bloed naar herkomst te differentieeren.

Voor de uitvoering van deze methode van onderzoek is een amboceptor en complement bevattend serum noodig, welke amboceptor in het serum is ontstaan onder invloed van herhaalde injecties van een bepaald eiwit (homoloog antigeen).

De amboceptor en het complement zijn niet in staat een binding aan te gaan zonder aanwezigheid van het homologe antigeen. Bij menging van deze laatste stof met amboceptor en complement, dus met het homologe immuunserum, verbinden deze drie lichamen zich met elkaar en wel zoodanig, dat antigeen en complement beide gebonden worden aan de amboceptor.

Deze binding blijft uit als een ander eiwit dan het homologe met dit immuunserum samengebracht wordt.

Het complement wordt in dit geval niet gebonden en blijft dus in de vloeistof aanwezig. Aan- of afwezigheid van vrij complement wordt vervolgens aangetoond met een tweede serologische proef.

Hierbij maakt men gebruik van een zoogenaamd haemolytisch konijnenserum. Als regel wordt dit serum bereid door konijnen herhaalde injecties toe te dienen van gewasschen roode bloedlichaampjes van het schaap. Nadat een voldoend aantal injecties gegeven is, wordt het konijn door verbloeding gedood en het serum gewonnen. Dit serum bezit de eigenschap om roode bloedcellen van het schaap op te lossen, waarbij de haemoglobine vrij komt. De roode kleur verdwijnt na verloop van eenigen tijd niet uit de vloeistof, zooals dat wel het geval is, wanneer de roode bloedcellen intact blijven en op den bodem van de buis zinken.

Deze haemolyse is gebonden aan de aanwezigheid van complement, hetgeen voorkomt in ieder natief serum.

Haemolyse treedt dus in, wanneer een haemolytisch serum samengebracht wordt met de homologe bloedlichaampjes.

Verhit men echter dit haemolytisch serum gedurende ½ uur op 58° C., dan wordt het daarin aanwezige complement vernietigd. De amboceptor daarentegen heeft de eigenschap gedurende deze behandeling intact te blijven. Een dergelijk serum wordt een geïnactiveerd haemolytisch serum of een haemolytisch systeem genoemd.

Voegt men dit haemolytische systeem bij een vloeistof, waarvan onbekend is of daarin vrij complement aan- of afwezig is, dan zal bij optredende haemolyse geconcludeerd mogen worden tot het vrij aanwezig zijn van complement; blijft haemolyse daarentegen uit, dan is geen vrij complement in de betreffende vloeistof voorhanden.

Brengt men dus eerst bijeen het te onderzoeken „antigeen" en een amboceptorhoudend immuunserum, daarna een nauwkeurig aangepaste hoeveelheid complement en ten slotte het „haemolytisch systeem", dan zal haemolyse uitblijven, wanneer het complement door de binding met antigeen en amboceptor uit de vloeistof is verwijderd. Men mag dan besluiten, dat het onderzochte eiwit soortgelijk is aan dat, waarmede het amboceptorhoudend serum is bereid.

Deze tamelijk ingewikkelde reactie dient natuurlijk afdoende gecontroleerd te worden, alvorens hieruit conclusies getrokken mogen worden. In de eerste plaats dient vast te staan, dat het immuunserum specifieke amboceptor in voldoende hoeveelheid bevat. Verder moet de werkzaamheid van het haemolytische systeem gecontroleerd worden, bij welke contrôle gebruik gemaakt wordt van een complementbevattend normaal caviaserum. Tevens dient men zich bij deze reactie te houden aan nauw omschreven proportioneele verhoudingen.

v. WASSERMANN [6]) schrijft de volgende contrôlemaatregelen voor:

1e. Bij het antiserum wordt gevoegd het haemolytische systeem met complement. Het te onderzoeken eiwitextract wordt niet toegevoegd.

2e. De te onderzoeken eiwitoplossing wordt gemengd met het haemolytische systeem, zonder tevens antiserum toe te voegen.

In de onder 1e en 2e beschreven omstandigheden moet haemolyse optreden.

3e. Het haemolytische systeem moet in staat zijn de in aanmerking komende hoeveelheid bloedlichaampjes volledig op te lossen.

4e. Het als complement gebruikte normale caviaserum zonder amboceptor mag geen haemolyse geven.

5e. Amboceptor zonder complement mag de bloedlichaampjes niet tot oplossing brengen.

6e. Normaal konijnenserum mag in dezelfde verdunning, waarin het immuunserum gebruikt wordt, geen complementbindende werking bezitten.

Voor elk onderzoek is dus een vrij uitgebreid instrumentarium en een aantal nauwkeurig afgestelde reagentia noodig.

c. Praecipitatiereactie, ook wel genaamd praecipitinereactie.

De vorming van een praecipitaat bij deze reactie berust op een specifieke chemische binding tusschen „praecipitine" en antigeen. Serum van een konijn, dat herhaalde malen geïnjiceerd is met eiwit van een bepaalde diersoort, bevat als regel praecipitine. Dit praecipitine is specifiek voor het ingespoten eiwit (homoloog antigeen).

Samenbrenging van een praecipiteerend konijnenserum met de homologe eiwitoplossing heeft tot gevolg, dat een neerslag ontstaat, terwijl een neerslag uitblijft, wanneer dit serum samengebracht wordt met een eiwit-oplossing van een andere diersoort dan de homologe (heteroloog antigeen) *).

Met behulp van deze praecipitatiereactie heeft UHLENHUTH [8]) een methode uitgewerkt voor het differentieeren van bloedvlekken. Hij diende konijnen meermalen intraveneuze injecties toe van menscheneiwit. Na zekeren tijd werd het konijn door verbloeding gedood en het serum verzameld. Wanneer dit serum werd samengebracht met menscheneiwit in sterke verdunning, dan ontstond een neerslag. Menging van dit serum met eiwit van een andere diersoort, uitgezonderd apen, gaf geen aanleiding tot het ontstaan van een neerslag.

Voor contrôle werd door U. niet alleen de onbekende eiwitoplossing met praecipiteerend serum gemengd, maar ook met „normaal" konijnenserum. Tevens werd de voor verdunning gebruikte physiologische keukenzoutoplossing met het praecipiteerende serum samengebracht. Hierbij diende een neerslag uit te blijven.

Daarnaast werd de werkzaamheid van het praecipiteerende serum gecontroleerd door toevoeging van het homologe eiwit in groote verdunning. Bij menging van dit serum met heteroloog eiwit moest neerslagvorming uitblijven.

Het instrumentarium, zoowel als de benoodigde reagentia, zijn hier minder omvangrijk, terwijl het resultaat van de proef direct kan worden afgelezen.

Par. 4. Keuze der meest geschikte methode van onderzoek.

Het is volkomen duidelijk, dat noch de physische, noch de chemische methode van eiwitdifferentieering veel uitzicht biedt, om daarmede in levensmiddelen eendeneibestanddeelen te kunnen aantoonen.

---

*) Voor uitvoeriger bespreking van de literatuur over deze methode zie men Hoofdstuk II.

De eerste zou hoogstens eendendooierpoeder aantoonbaar maken; de tweede eischt een zoo uitgebreide bewerking, dat afgezien van de moeilijkheid, die een vermenging van eendenei met andere eiwitten oplevert, deze methode ongeschikt is om daarmede in betrekkelijk korten tijd een serie monsters op de aanwezigheid van eendeneibestanddeelen te onderzoeken. Daarbij komt nog, dat in bepaalde eet- of drinkwaren bij voorkeur uitsluitend eendendooier gebruikt wordt, waarvan allerminst vaststaat, dat deze stof op chemische wijze onderscheiden kan worden van kippendooier.

Menging van eendenei met andere dierlijke of plantaardige proteinen brengt bovendien de moeilijkheid mede, dat ook deze eiwitten aminozuren leveren, die de specifieke draaiing beinvloeden.

Daarentegen zijn de biologische methoden van onderzoek zeer veel beter en gemakkelijker toepasbaar.

Van deze mag die der anaphylaxie wel als de kostbaarste worden aangemerkt. Immers voor iedere proef moet een groot aantal caviae gesensibiliseerd worden, van welke een deel gebruikt wordt voor de eigenlijke reactie, terwijl een ander deel dient voor contrôle. Verder moeten bij de uitvoering der anaphylaxiereactie nog een aantal niet gesensibiliseerde proefdieren worden ingespoten met eenzelfde hoeveelheid te differentieeren eiwitoplossing als de gesensibiliseerde.

Tenslotte kan als een nadeel van deze methode worden aangemerkt het feit, dat pas 3 tot 4 weken na de sensibilisatie de reactie uitgevoerd kan worden.

GRAETZ [46]) is van meening, dat voor directe eiwitdifferentieering de moeite en de hooge kosten der anaphylaxieëxperimenten in geen verhouding staan tot de onzekere resultaten, die er mee bereikt worden.

WELLS [9]) verkreeg gunstiger uitkomsten met deze reactie; hij was namelijk in staat ovovitelline uit *kippendooier* te onderscheiden van hetzelfde proteine uit *tortelduivendooier*.

BESREDKA en BROUFENBRENNER [10]) konden met deze methode specifiteit van ei-wit van verschillende vogelsoorten opmerken; deze specifiteit was echter niet absoluut.

UHLENHUTH en HAENDEL [92]) vatten de resultaten van hun onderzoekingen als volgt samen:

1e. Bij het onderzoek van eiwitten afkomstig van naverwante dieren levert de anaphylaxiereactie geen betere resultaten op dan de praecipitatiereactie.

2e. De differentieering van gekookte eiwitten gelukt door middel van de anaphylaxiereactie ook in gevallen, waarin de praecipitatiereactie geen resultaat meer geeft. De reactie is echter minder

sterk, dan met dezelfde eiwitten in natieven toestand, zoodat de uitslag voor practische toepassing met groote voorzichtigheid beoordeeld moet worden.

3e. Bij het onderzoek van oude bloedvlekken en materiaal van mummiën staat de anaphylaxiereactie boven de praecipitatiereactie. Zelfs in mummiën, die verscheidene duizenden jaren oud zijn, kan menscheneiwit worden aangetoond.

Verder waren U. en H. in staat met behulp van deze reactie ei-wit en dooier van elkaar te onderscheiden.

BACHRACH [93]) acht het vraagstuk der toepassing van de anaphylaxiereactie, als middel om eiwitten te differentieeren, voor practisch-forensische doeleinden nog niet volledig „spruchreif".

Hoewel dus door bovengenoemde onderzoekingen de mogelijkheid om eibestanddeelen met behulp der anaphylaxiereactie naar herkomst te differentieeren zeker is aangetoond, leek deze methode ons minder geschikt voor het doel, dat wij ons gesteld hadden en wel om twee redenen:

1e. wegens den langen tijd, die noodig is vóór de proefdieren voldoende overgevoelig geworden zijn en de reactie kan worden uitgevoerd;

2e. wegens de kostbaarheid der methode in verband met het groote aantal proefdieren, dat vereischt wordt.

Aanlokkelijker daarentegen lijken beide andere biologische methoden, namelijk de complementbindingsreactie en de praecipitatiereactie.

De onderzoekingen van SACHS en BAUER [11]) leidden tot het resultaat, dat de aantoonbaarheid van eiwitbijmenging in oplossingen van een andere eiwitsoort, door middel van de praecipitatiereactie op groote moeilijkheden stuit, zoo niet totaal onmogelijk kan zijn, terwijl de complementbindingsreactie ook in deze gevallen met succes kan worden toegepast. Volgens S. en B. is in de forensische praktijk de methode der complementbinding, bij het onderzoek van mengsels van eiwitten, voor de differentieering van de minder geconcentreerde eiwitsoort van heel bijzondere beteekenis.

RICKMANN [12]) vergeleek beide reacties bij de serologische differentiatie van menschen- en varkenseiwit. Hij vond een „reactiebreedte" van 1 op 10.000 bij de complementbindingsreactie en een „breedte" van 1 op 100 bij de praecipitatiereactie. R. verstaat onder „reactiebreedte" het verschil in verdunning tusschen de sterkste concentratie varkenseiwitoplossing, die juist *geen* reactie geeft met een menscheneiwitantiserum en de zwakste concentratie menscheneiwit, die nog juist *wel* reactie geeft met hetzelfde serum.

WEIDANZ en BORCHMANN [13]) stelden overeenkomstige onderzoekingen in naar de aantoonbaarheid van den inhoud van paardenmetworst, die aan een verhitting was blootgesteld. De worst was namelijk 1 tot 2 uren heet gerookt bij een temperatuur van 70 tot 80° C. en daarna 6 tot 15 minuten gebroeid in kokend water.

Heet gerookte en daarna gedurende 6 minuten gekookte worst gaf nog een uitstekende reactie met een natief paardeneiwitpraecipiteerend serum, hoewel de reactie minder snel verliep dan bij het onderzoek van rauwe worst het geval was. De reactie gaf echter geen positieven uitslag, als de worst gedurende 15 minuten gekookt was.

Met behulp van de complementbindingsreactie werden geen betere resultaten verkregen. W. en B. merkten verder op, dat de complementbindingsreactie een zeer groot aantal contrôles vereischt, terwijl in de praktijk der vleeschdifferentieering een groot aantal stoffen voorkomen, die de reactie storend kunnen beïnvloeden of zelfs de toepassing daarvan onmogelijk kunnen maken.

Onder deze omstandigheden geeft de praecipitatiereactie betrouwbaardere uitkomsten . Zij komen tot de conclusie, dat de complementbindingsreactie omslachtiger is, dat de beoordeeling moeilijker en tijdroovender is en dat voor de uitvoering der reactie een grooter aantal reagentia noodig is dan bij de praecipitatiereactie.

UHLENHUTH en WEIDANZ [14]) besluiten hun bespreking van beide reacties als volgt: „Mann kommt also mit der Präzipitinreaktion in der Praxis fast immer zum Ziel und kann deshalb auch schon aus diesem Grunde auf die Komplementablenkungsmethode für die Praxis verzichten". U. en W. komen tot deze conclusie, omdat kruiden en conserveermiddelen de complementbinding remmen, zoodat deze reactie alleen daar kan worden toegepast, waar de praecipitatiereactie niet meer tot het doel voert, zooals dat het geval is bij het onderzoek van worst, die aan een hooge verhitting is blootgesteld geweest. Ze vinden het bovendien een groot bezwaar, dat een compleet eiwitonderzoek met behulp van de complementbindingsreactie ongeveer 6—8 uur vraagt. Hetzelfde onderzoek met behulp van de praecipitatiereactie kan worden uitgevoerd in ongeveer 45 minuten.

BAUER [15]) beoordeelt de complementbindingsreactie gunstiger en komt tot de conclusie, dat deze gevoeliger en specifieker is dan de praecipitatiereactie, tot welke conclusie eveneens SEIFFERT [16]) komt. S. kon in gekookte worst met behulp van de praecipitatiereactie de eiwitten niet differentieeren; als de worst niet te lang gekookt werd, was differentieering met behulp van de complementbindingsreactie nog goed mogelijk.

UHLENHUTH, WEIDANZ en WEDEMANN [17]) zijn van meening, dat de methode der complementbinding in de hand van geschoolde specialisten wel voor het onderzoek van zuivere eiwitten, die onderling gemengd zijn, bruikbare resultaten geeft, dat echter in de praktijk, waar sprake is van onqualificeerbare vleeschmengsels, deze methode wegens haar nauwelijks overzienbare foutenbronnen en haar uiterst moeilijke afleesbaarheid slechts met de allergrootste voorzichtigheid toegepast kan worden.

Bij het gebruik van de complementbindingsreactie om paardenvleesch in worst en andere vleeschmengsels te differentieeren, is vooral het feit storend, dat vele voor conserveering gebruikte stoffen, zooals salpeter, praeservezout, pekelzout en andere, reeds zonder aanwezigheid van homoloog eiwit in de ter sprake komende verdunning een binding of sterke remming te voorschijn roepen. Ook bezitten talrijke kruiden de eigenschap complement te binden.

Bij het onderzoek van gekookte vleeschwaren op aanwezigheid van paardenvleesch zou de complementbindingsreactie de voorkeur verdienen boven de praecipitatiereactie. Juist onder deze omstandigheden gaat echter tijdens de extractie weinig eiwit in oplossing, zoodat ook bij de complementbindingsreactie een zoodanige verdunning, dat de bovengenoemde storende invloeden vermeden worden, niet mogelijk is.

RUPPIN [18]) merkt evenals UHLENHUTH en diens medewerkers op, dat de praecipitatiereactie door geen der normaal voorkomende conserveermiddelen nadeelig wordt beïnvloed.

Overzien we thans de literatuur, die betrekking heeft op de vergelijking van beide reacties, dan valt bovenal het volgende op:

1e. De complementbindingsreactie is gevoeliger dan de praecipitatiereactie en waarschijnlijk ook specifieker.

2e. De tijd, die een complementbindingsreactie met bijbehoorende contrôles vraagt, is zeker vele malen grooter dan die, welke noodig is om hetzelfde onderzoek te verrichten met behulp van de praecipitatiereactie.

3e. Voor de complementbindingsreactie heeft men veel meer reagentia noodig, die alle met veel zorg bereid dienen te worden, waarbij veelal de hulp van technisch geschoold personeel onontbeerlijk is.

4e. Om steeds de beschikking te hebben over versche schapenbloedlichaampjes en versch caviaserum dienen een schaap en een groot aantal caviae gehouden te worden.

5e. In eet- of drinkwaren mag men verder de aanwezigheid van kruiden, essences en conserveermiddelen verwachten, die de complementbindingsreactie zouden kunnen storen.

Hoewel dus op theoretische gronden de complementbindingsreactie wel geschikt geacht moet worden om met succes gebruikt te worden bij de differentiatie van in voedingsmiddelen aanwezige eiwitten, moet toch om redenen van practischen aard de praecipitatiereactie verkozen worden.

HOOFDSTUK II.

PRAECIPITATIEREACTIE EN DIFFERENTIEERING VAN EIBESTANDDEELEN.

a. Literatuur.

Het is de bedoeling hier in hoofdzaak de literatuur te bespreken, die betrekking heeft op de aantoonbaarheid *van eibestanddeelen* en de *differentiatie* daarvan *naar de diersoort* van welke ze afkomstig zijn.

Een praecipiteerend serum onderscheidt zich van een normaal serum van dezelfde diersoort, doordat het praecipitine bevat. Deze praecipitine is in het levende dier ontstaan onder invloed van één of meer parenterale toedieningen van soortvreemd eiwit en is in staat in vitro met ditzelfde eiwit een neerslag te geven.

Het bijzondere van dit neerslag is, dat het specifiek is in dien zin, dat het uitblijft, wanneer een praecipiteerend serum samengebracht wordt met eiwit van een andere diersoort, dan gebruikt is voor de bereiding van dit serum.

Het principe der reactie werd door KRAUS [7]) ontdekt ten aanzien van bacterie-eiwit. Hij bracht bacterievrije filtraten van cholera-bouillonculturen samen met het homologe antiserum en zag een troebeling optreden, die binnen 24 uur door bezinking verdween (Phytopraecipitinereactie). K. merkte tevens op, dat kiemvrije filtraten van andere bacterieculturen dan cholera met dit serum samengebracht, helder bleven en toonde hiermede de specifiteit der reactie aan.

Dat niet alleen bacterie-eiwit, doch eveneens dierlijke eiwitten in staat zijn praecipitinen op te wekken, bewezen TCHISTOWITSH [21]) en BORDET [22]) (Zoöpraecipitinereactie). De eerste merkte namelijk op, dat menging van aalserum met het homologe antiserum een troebeling opwekte overeenkomende met die, welke door Kraus was beschreven. Hij ontdekte tevens, dat verhitting van het aalserum tot 80° C. in staat was deze reactie te doen uitblijven.

BORDET [22]) vond, dat een haemagglutineerend serum niet alleen in staat was de homologe roode bloedcellen te agglutineeren, doch tevens een praecipitaat op te wekken in het homologe bloedserum.

De specifiteit van dergelijke dierlijke eiwitten praecipiteerende sera werd aangetoond door FISH, EHRLICH, MORGENROTH, WASSERMANN en SCHÜTZE [23]).

Ook met den inhoud van vogeleieren, dus eveneens met dierlijk eiwit, bleek het mogelijk te zijn praecipiteerende sera bij konijnen op te wekken. Een deel der onderzoekers kwam hierbij tot de conclusie, dat deze sera niet streng specifiek waren; de volgende auteurs kwamen zelfs tot het resultaat, dat het op deze wijze niet mogelijk was ei-wit van verschillende diersoorten te differentieeren.

MYERS [24-25]) injiceerde konijnen intraperitoneaal met gekristalliseerd kippenei-wit in stijgende doseering. Na verloop van twee maanden werden de sera gewonnen.

Deze sera praecipiteerden het homologe antigeen in sterke mate Hoewel de reacties minder sterk waren, werden met eendenei-wit eveneens neerslagen waargenomen.

UHLENHUTH [26-27]) behandelde konijnen intraperitoneaal met een verdunde kippenei-witoplossing. De aldus bereide sera praecipiteerden niet alleen een oplossing van kippenei-wit maar ook een oplossing van duivenei-wit; een duivenei-wit-antiserum reageerde positief zoowel met duiven- als met kippenei-wit, zoodat een volkomen specifiteit niet aanwezig bleek te zijn. Een zwak werkzaam ei-witserum stelde U. echter in staat ei-wit van zeer naverwante diersoorten te differentieeren. Hoogwaardige ei-witantisera reageerden positief met ei-wit van een heele reeks vogelsoorten.

Overeenkomstige verwantschapsreacties werden opgemerkt met dooierpraecipiteerende sera.

GENGOU [28]) gebruikte voor de behandeling der proefdieren onverdund kippenei-wit in tamelijk groote dosis. Elke injectie bedroeg respectievelijk 10 cc tot 12 cc: zij werden met tusschenpoozen van 7 dagen toegediend. De konijnen werden twee weken na de laatste injectie gedood. Aldus gewonnen ovosera bleken geen merkbare specifiteit te bezitten.

GALLI-VALERIO [36]) volgde de techniek van UHLENHUTH en bereidde ei-witantisera met een titer van 1 op 10.000.

Deze sera gaven met het homologe ei-wit krachtige reacties, maar gaven eveneens verwantschapsreacties met ei-wit van andere vogels en wel sterker naarmate de verwantschap nauwer was.

In dit opzicht kwamen zijn resultaten overeen met die, welke door NUTTALL werden verkregen (zie blz. 30).

Andere onderzoekers bereikten gunstiger resultaten, met andere woorden hun sera hadden een grootere specifiteit. De volgende auteurs berichten over de mogelijkheid ei-wit van verschillende vogeleieren te differentieeren.

WELSH en CHAPMANN [35]) droogden ei-wit en losten het daarna weer op in physiologische keukenzoutoplossing alvorens hiermede proefdieren te behandelen. In totaal werd 6.27 gram droog ei-wit in een zestal injecties toegediend. W. en C. waren in staat met een aldus bereid serum ei-wit van verschillende vogelsoorten, waaronder ook enkele in het zoölogische systeem dicht bij elkaar staande, te differentieeren.

WATERMAN [42]) was in staat eenden- en kippenei-wit in zuiveren toestand door middel van de praecipitatiereactie van elkaar te onderscheiden. Hij merkte namelijk voldoende titerverschil op tusschen homologe- en verwantschapsreactie, zelfs voldoende om de hoeveelheid van beide in mengsels te schatten.

GRAETZ [46]) bereidde ovosera door om de 6 tot 7 dagen telkens 5 cc van een 10% kippenei-witoplossing intraveneus bij konijnen te injiceeren. Tien dagen na de vierde inspuiting werden de sera gewonnen, nadat bij een voorafgaande proefbloeding gebleken was, dat de titer der sera voldoende hoogte had bereikt. Met behulp van een kippeneiwitantiserum kon G., in tegenstelling tot de meeste andere onderzoekers, ei-wit van duif, gans en eend differentieeren van dat van de kip. Kalkoenei-wit maakte op dezen regel een uitzondering.

G. kwam verder tot de conclusie, dat de titer der sera niet te hoog moet worden opgevoerd, omdat anders de verwantschapsreactie onevenredig sterk toeneemt.

HOOKER en BOYD [45]) bereidden immuunsera met gekristalliseerd eenden- en kippeneialbumine. Na een reeks inspuitingen werd, voordat de maximale titer bereikt was, herhaaldelijk een geringe hoeveelheid bloed afgetapt en het hieruit verzamelde serum tegenover beide proteinen getest. Bij deze proeven bleek, dat in het begin de titer der sera laag was en de specifiteit groot; na verloop van eenigen tijd echter werd de titer der sera hooger, doch de specifiteit verminderde.

UMBER [29]) scheidde op physisch-chemische wijze albumine en globuline uit ei-wit en was met behulp van deze fracties in staat praecipiteerende sera te winnen zoowel tegenover albumine als tegenover globuline.

Een aantal onderzoekers bleek dus in staat te zijn *ei-wit* met behulp van praecipiteerende sera te differentieeren. Minder gunstige resultaten

werden bereikt met de bereiding van *dooierantisera*. Geen der volgende onderzoekers was namelijk in staat sera te winnen, die voldoende specifiek waren om differentiatie van eidooier door te voeren.

OTTOLENGHI [32-33]) bereidde kippendooierantisera met een titer van 1 op 25.000 tot 1 op 50.000. Hij onderzocht hiermede „meelwaren" op aanwezigheid van dooiertoevoeging en kon door de hoeveelheid serum alsmede de hoeveelheid te onderzoeken vloeistof constant te houden, de dooierconcentratie quantitatief bepalen.

SCHULZ [34]) onderzocht advocaat met behulp van een dooierantiserum en verkreeg een positieve reactie, mits de advocaat werd onderzocht binnen drie dagen na de bereiding. Elf dagen nadien verkreeg hij geen positieven uitslag meer.

Differentiatie der eiwitten naar de diersoort van welke ze afkomstig waren, werden door OTTOLENGHI en SCHULZ niet verricht.

SCHÜTZE [31]) immuniseerde konijnen door om de 3 tot 4 dagen telkens 6 tot 10 cc geklutste kippendooier subcutaan te injiceeren. Zes dagen na de laatste inspuiting werd het serum verzameld. Met behulp van een dergelijk serum kon dooier in margarine en in „Eiernudeln" worden aangetoond, zonder dat deze dooier nader gedifferentieerd kon worden.

SENG [40]) injiceerde om de 5 tot 6 dagen 2 cc kippendooieroplossing 1 op 50 verdund intraveneus en diende daarna tevens 2 inspuitingen ieder van 4 cc intraperitoneaal toe. Hij merkte bij het gebruik van aldus gewonnen sera de verwantschapsreactie op, waardoor hij niet in staat was dooieroplossingen met zekerheid te differentieeren. De sterkte der verwantschapsreacties kwam volgens S. overeen met de indeeling der dieren in het zoölogische systeem.

Bebroeding van het ei verminderde noch de homologe, noch de verwantschapsreactie; uitschudding van dooier met alkohol en aether deed de biologische reageerbaarheid met antiserum verdwijnen, evenals verhitting der dooier.

GRAETZ [46]) bereidde ovosera door om de 6 tot 7 dagen telkens 5 cc van een 10% kippendooieroplossing bij konijnen intraveneus te injiceeren. Tien dagen na de vierde inspuiting werden de sera gewonnen, nadat bij een proefbloeding gebleken was, dat de titer der sera voldoende hoogte bereikt had.

Met een kippendooierantiserum was G. niet in staat het eigeel van kalkoen, duif, gans en eend te differentieeren van dat van de kip. De reacties waren namelijk kwantitatief en kwalitatief volkomen gelijk. Hieruit concludeerde G. dat „dooier" een uitgesproken *orgaanspecifiteit* in den zin van het lenseiwit bezit.

Bij enkele onderzoekingen bleek een merkwaardig verschijnsel, namelijk dat ei-wit en dooier immunologisch onverwant zijn.

Terwijl ei-wit uit eieren van verschillende diersoorten vrij sterke tot sterke verwantschap bezit, bleek het niet mogelijk te zijn reactie te verkrijgen, wanneer een ei-witantiserum werd samengebracht met de homologe dooier. Eenzelfde verschijnsel werd opgemerkt, wanneer een dooierantiserum werd samengebracht met het homologe ei-wit.

UHLENHUTH [26-27]) concludeerde op grond van zijn onderzoekingen, dat de dooierproteinen niet verwant zijn aan de ei-witproteinen van dezelfde vogelsoort.

OTTOLENGHI [32-33]) kwam tot een gelijkluidende conclusie, evenals EMMERICH [38]) en GRAETZ [46]).

De bovenstaande onderzoekingen werden verricht hetzij met ei-wit, hetzij met dooier. Andere schrijvers berichten over de injectie van den gemengden ei-inhoud, dus dooier en wit in physiologische verhouding gemengd. Aldus gewonnen sera vertoonden eveneens sterke verwantschapsreacties, zoodat het niet mogelijk bleek te zijn, daarmede eibestanddeelen van verschillende diersoorten te differentieeren. Wel kon de aanwezigheid van eibestanddeelen zonder meer worden aangetoond, voor een deel zelfs quantitatief.

Onder anderen bereidde NUTTALL [30]) eiantisera door konijnen 5 intraperitoneale injecties toe te dienen, zoodanig dat in totaal 45 cc werd ingespoten. Elf dagen na de laatste injectie werden de konijnen gedood en de sera verzameld. Met deze sera toonde N. niet alleen het bestaan van sterke verwantschapsreacties aan, welke reacties sterker waren naarmate de verwantschap nauwer was, maar meende tevens op grond van de „verwantschapsreacties" met den inhoud van reptieleneieren te mogen concludeeren tot de phylogenetische verwantschap tusschen vogels en reptielen.

GALLI-VALERIO en BORNAND [37]) injiceerden konijnen met den verdunden inhoud van kippeneieren. Zij merkten op, dat de reactie van deze sera met kippenei-wit minder sterk was dan met kippendooier.

Het gelukte G. en B. in het deeg van eierkoeken eitoevoeging aan te toonen, zonder dat nadere differentiatie daarvan plaats vond. Was het deeg echter tot koeken gebakken, dan kon eitoevoeging niet meer worden vastgesteld. G. en B. schreven dit verdwijnen der reactie toe aan de verhitting, die de eibestanddeelen hadden ondergaan.

ARRAGON en BORNAND [39]) konden met behulp van een eiantiserum, waarvan de titer 1 op 50.000 bedroeg, in meelwaren eitoevoeging aantoonen. De sterkte der reactie kwam overeen met de hoeveelheid ei.

GOTHE [41]) paste de intraveneuze immuniseering toe met den vrij sterk verdunden geheelen eiïnhoud. Bij de titerbepaling van deze sera bleek ei-wit iets eerder aantoonbaar te zijn dan dooier. Verschillende meelwaren werden met succes op eitoevoeging onderzocht, terwijl zelfs een quantitatieve bepaling mogelijk bleek.

Met een serum, dat op overeenkomstige wijze werd bereid, was THONI [43]) in staat ei-wit en dooier in verschen toestand quantitatief te bepalen. Zoodra de dooier echter gedroogd was, waren de praecipitogeen-eigenschappen daarvan zoodanig teruggegaan, dat quantitatieve bepaling niet meer mogelijk was: gedroogd ei-wit daarentegen bezat in opgelosten toestand dezelfde eigenschappen als rauw eiwit. T. kon door gebruik te maken van deze eigenschap de hoeveelheid ei, aanwezig in meelwaren, quantitatief bepalen.

LEWIS en WELLS [44]) onderzochten de antigeen-functie van een fractie uit ei-wit, namelijk ovomucoid. Zij vonden deze geringer dan die van andere proteinen met gelijke oplosbaarheid.

Verder bleek, dat ovomucoid van verschillende vogelsoorten immunologische verwantschap vertoonde, welke verwantschap van zeer na verwante soorten zoodanig was, dat geconcludeerd zou kunnen worden tot volledige gelijkheid.

b. Samenvatting.

Uit de bovenaangehaalde literatuur blijkt, dat het aantoonen van de aanwezigheid van eibestanddeelen met behulp van de praecipitatiereactie zonder nadere differentieering daarvan, geen bijzondere moeilijkheden oplevert.

De moeilijkheden nemen echter toe, wanneer het noodig is eibestanddeelen afkomstig van verschillende vogelsoorten van elkaar te onderscheiden.

Ten aanzien van *ei-wit* lijkt het mogelijk differentiatie tot op zekere hoogte door te voeren, alhoewel de resultaten van verscheidene onderzoekers tot voorzichtigheid manen.

Aan geen der onderzoekers is het echter gelukt *dooier* naar herkomst te differentieeren, zoodat tevens geconcludeerd mag worden, dat een mengsel van ei-wit en dooier, dus de geheele eiïnhoud in gemengden toestand, evenmin gedifferentieerd kan worden.

Waar de in de literatuur beschreven methoden dus niet toereikend waren om tot beantwoording der in de Inleiding gestelde vragen te leiden, dienden andere wegen te worden bewandeld.

In het principe der specifieke verzadiging, dat later uitvoerig

beschreven wordt, werd de noodzakelijke aanvulling gevonden om het gestelde doel te bereiken.

Verder blijkt uit bestudeering der literatuur, dat dooier en ei-wit van dezelfde eisoort immunologisch twee verschillende antigenen zijn, zoodat waar nimmer van te voren vaststaat, of bij de bereiding van een bepaalde eet- of drinkwaar dooier of wit of een mengsel van beide is gebruikt, òf een tweevoudig onderzoek met enkelwaardige sera noodig is, òf een enkelvoudig onderzoek met tweewaardige sera.

TWEEDE AFDEELING.

EIGEN ONDERZOEK.

HOOFDSTUK III.

SERUMBEREIDING.

Par. 1. Bereiding van natief eendeneipraecipiteerend serum.

Bij enkele voorbereidende experimenten hebben wij ons kunnen overtuigen, dat het op vrij eenvoudige wijze mogelijk is een eendeneiwitpraecipiteerend serum te bereiden.

Verder waren wij in staat ons te overtuigen van het feit, dat een eendenei-witantiserum geen positieve praecipitatiereactie geeft met eendendooier in oplossing.

Het is echter als regel niet mogelijk met behulp van een dergelijk serum eenden- en kippenei-wit te differentieeren, doordat een sterke verwantschapsreactie bestaat.

Door specifieke verzadiging toe te passen wordt het, zooals later zal worden aangetoond, echter mogelijk deze differentiatie door te voeren.

Aangemoedigd door de met deze werkwijze bereikte resultaten werd de mogelijkheid onderzocht, om met behulp van tweewaardige sera, die zoowel reageeren met ei-wit als dooier, het in de Inleiding gestelde doel te bereiken.

a. Literatuur over het bereiden van „bivalente" respectievelijk „polyvalente" sera.

STRZYZOWSKI [47]) kon vaststellen, dat na inspuiting van konijnen met een mengsel van menschenserum en runderserum een bivalent specifiek praecipiteerend serum ontstond.

De titer van dit serum tegen beide antigenen kwam echter niet overeen met de verhouding der ingespoten hoeveelheden van elk der antigenen. Op overeenkomstige wijze konden drie- en viervoudige praecipiteerende sera worden bereid, waarvan de „praecipitinen" onderling eveneens ongelijkwaardig van sterkte waren.

ROSENTHAL en TAKEOKA [48]) injiceerden hun proefdieren met een mengsel van schapenbloedlichaampjes en colivaccin.

Bij relatief kleine en middelmatig groote hoeveelheden antigeen bereikten de antilichamen tegen beide antigenen hetzelfde maximum, dat ontstond, wanneer afzonderlijke proefdieren hiermede geimmuniseerd werden; bij relatief groote antigeendosis waren daarentegen de titers bij gecombineerde voorbehandeling veel lager, dan deze zouden zijn bij dieren, die slechts met *één* der antigenen waren voorbehandeld. Er bestond dus binnen zekere grenzen een relatieve onafhankelijkheid van de antilichaamvorming, speciaal wanneer kleine en middelgroote antigeenhoeveelheden werden ingespoten.

HECTOEN en BOOR [49]) gebruikten tegelijk respectievelijk 14 en 35 verschillende antigenen bij de immuniseering van proefdieren. Mengsels van gelijke hoeveelheden der antigenen werden in stijgende dosis ingespoten. Niettegenstaande deze gelijkheid was de titer der aldus bereide sera tegen de afzonderlijke antigenen verschillend, terwijl tegen één der eiwitten geen antilichamen werden gevormd.

HECTOEN en DELVES [50]) bereidden eveneens praecipiteerende sera door injectie van een mengsel, bestaande uit gelijke hoeveelheden van 14 verschillende antigenen. De titer der sera tegen de afzonderlijke antigenen was niet gelijk.

Uit deze onderzoekingen volgt, dat redelijkerwijze mag worden aangenomen, dat immunisatie van proefdieren met een mengsel van eendeneiwit en eendendooier een tweewaardig serum zal opleveren.

b. Proefdieren.

Practisch worden zonder uitzondering voor de bereiding van praecipiteerende sera konijnen gebruikt. Deze diersoort schijnt wel bijzondere geschiktheid te dien aanzien te bezitten. Andere dieren, zooals caviae, schapen, geiten enz. leenen zich minder goed voor dat doel of zijn in 't geheel niet in staat praecipitinen te vormen. Kippen schijnen volgens UHLENHUTH [51]) hierop een uitzondering te maken, alhoewel ze minder geëigend zijn dan konijnen.

In de literatuur wordt meestal aangegeven, dat de meest geschikte konijnen de groote langoorige rassen b.v. Vlaamsche reuzen zijn. Wij meenen echter, dat er slechts twee criteria ten aanzien van de konijnen gesteld dienen te worden en wel deze: de dieren moeten kerngezond en levenslustig zijn. Dit komt aan het serum zoowel kwalitatief als kwantitatief ten goede. Noch de lengte der ooren, noch de kleur van de pels, noch het ras doen ook maar iets ter zake. Het is verder

onverschillig of men mannelijke dan wel vrouwelijke exemplaren uitkiest, mits drachtigheid uit te sluiten is.

c. Bereiding der injectievloeistof (antigeen).

De injectievloeistof wordt als volgt bereid:

Een eendenei wordt met spiritus dilutis flink afgewreven. Nadat de handen zorgvuldig gewasschen zijn wordt het ei opengebroken en de geheele inhoud in een bekerglas gestort. Per gram ei wordt daarna 2 cc physiologische keukenzoutoplossing toegevoegd.

Deze massa wordt met een gard goed gemengd, waarbij sterke schuimvorming vermeden wordt. Zij wordt vervolgens door een gaasje gecoleerd. De vloeistof wordt na deze behandeling op een temperatuur van 45°C. gebracht en ingespoten.

Hoewel de inhoud van het ei niet volkomen steriel geacht moet worden is het duidelijk, dat de geheele behandeling op aseptische wijze dient te geschieden.

d. Techniek der intraperitoneale injectie en methode van immuniseering.

In de literatuur wordt boven de subcutane aan de intraveneuze of de intraperitoneale antigeentoediening de voorkeur gegeven. Bij zorgvuldige bestudeering blijken met beide applicatiemethoden even gunstige resultaten bereikt te zijn. Daarom werd de intraperitoneale verkozen als de meest eenvoudige. Het konijn wordt daartoe op een tafel in rugligging gebracht, waarbij een helper de hals van het konijn met de linkerhand losjes omvat, terwijl hij met de rechterhand beide achterste extremiteiten vasthoudt, aldus het dier eenigszins strekkend. Mediaal van het craniale einde der liesplooi wordt een cirkelvormig deel van de huid, met een doorsnede van ongeveer 2½ cm van haar ontdaan en flink met jodiumtinctuur gepenseeld. De injectievloeistof, die op een temperatuur van 45°C. gebracht is, wordt met behulp van een recordspuit van 5 cc ingespoten. De naald wordt daarbij in de richting van de wervelkolom ingestoken.

Twee keer per week, dus om de 3 en 4 dagen, wordt een injectie gegeven. De eerste drie injecties bedragen 5 cc, de vierde en eventueel de vijfde injectie zijn groot 10 cc. Op bovengenoemde wijze wordt met elk antigeen een serie van vijf of zes konijnen geimmuniseerd, omdat niet alle dieren in staat zijn voldoende specifieke praecipitine te vormen.

e. Verzameling van het serum.

Een week na de vierde injectie wordt een geringe hoeveelheid bloed uit een der oorvenen afgetapt. Daartoe wordt een vena doorgesneden

en het uitvloeiende bloed in een buisje opgevangen. Opmerkelijk is, dat deze veneuze bloeding op overeenkomstige wijze door nerveuze invloeden beheerscht schijnt te worden, als het „laten schieten" der melk bij koeien. Het openen van een deur bijvoorbeeld kan plotseling de bloeding tijdelijk doen ophouden.

Met het na stolling van het bloed uitgetreden serum wordt een proeftitratie verricht met een eendenei-witoplossing in physiologische keukenzoutoplossing van 1 op 10000 en met een eendendooieroplossing van eenzelfde verdunning. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de later te bespreken ringreactie.

Als na enkele minuten in beide gevallen een schijfvormige troebeling optreedt, worden den volgenden dag de konijnen door verbloeding gedood.

Blijft de reactie gedurende langeren tijd uit, dan worden de betreffende konijnen nogmaals geinjiceerd met 10 cc antigeen. Deze worden een week na de vijfde injectie gedood.

Op den dag, dat de konijnen geseceerd worden, verstrekt men ze geen voedsel, omdat een in volle digestie verkeerend spijsverteeringsorgaan de volledige uitbloeding belemmert. Algemeen wordt in de literatuur aangegeven, dat de konijnen voor de verbloeding 24 uur moeten vasten, omdat anders de sera opalesceerend zouden zijn. Bij ons onderzoek is van een dergelijk verschijnsel niets gebleken. De proefbloedingen werden steeds bij dieren in volle digestie verricht, de totale serumwinning bij dieren, die tevoren gevast hadden.

Op een totaal van omstreeks honderd serumkonijnen werd tweemaal bij een proefbloeding een opalescent serum opgemerkt, terwijl eveneens bij de totale serumwinning van twee andere konijnen het serum opalesceerde.

Voor de sectie worden de konijnen in lichte chloroform-aethernarcose gebracht en in dien toestand in rugligging op een tafeltje vastgebonden. De kop hangt over den rand der tafel, zoodat het mogelijk is door fixeering daarvan den hals een iets afhangenden stand te geven. De halsvlakte wordt met spiritus dilutis gedesinfecteerd.

Hierna wordt in de mediaanlijn een huidsnede gemaakt van ongeveer 10 cm lengte en een der beide carotiden over een afstand van ongeveer 5 cm losgepraepareerd. De arterie wordt daarna in een pincet dichtgeknepen en craniaalwaarts daarvan doorgesneden. Hierna wordt de centrale arteriestomp overgebracht in een steriele buis met een diameter van ongeveer 5 cm, welke buis met het open einde in de wond gehouden wordt. Het pincet wordt eerst slechts een weinig geopend om te voorkomen, dat de arteriestomp onder

invloed van het stootsgewijze uitgedreven bloed een slingerende beweging gaat maken en bloed verloren zou gaan. Volledige uitbloeding wordt op deze wijze verkregen, mits slechts een oppervlakkige narcose is toegepast.

Een geringe bloeding uit doorgesneden bloedvaatjes eventueel uit de craniale stomp der arteria carotis is door het snel verloopen der verbloeding van ondergeschikte beteekenis.

Het bloed wordt, nadat het in scheeven stand in de buis gestold is, gedurende het verdere deel van den dag en den geheelen daaropvolgenden nacht in een koelen kelder bewaard om het serum volledig te laten afscheiden. Plaatsen in de ijskast is minder gewenscht, omdat de serumafscheiding daar slechts langzaam plaats vindt.

Den volgenden dag giet men het serum af in een sterielen trechter met filtreerpapier, die vooraf overgoten is met physiologische keukenzoutoplossing en vangt het in een steriele beugelflesch op.

Als het serum door het filter gevloeid is, wordt de bloedkoek eveneens op het filter gebracht. Afgedekt met een steriele halve petrischaal blijft de koek enkele uren op het filter en verliest daarbij nog een niet onaanzienlijke hoeveelheid serum. Een geringe hoeveelheid roode bloedcellen wordt door centrifugeering uit het serum verwijderd.

Door druppelsgewijze toevoeging van 1 cc 10% carbol in physiologische keukenzoutoplossing per 50 cc serum, onder licht schudden van het serum om neerslagvorming te voorkomen, wordt dit zwak geconserveerd.

Par. 2. Uitvoering der reactie.

a. Literatuur over de wijze van aflezing.

De aanwezigheid van een positieven uitslag van de praecipitatiereactie wordt opgemerkt, doordat een neerslag ontstaat, wanneer het specifieke antiserum gemengd wordt met het homologe antigeen.

Dit verschijnsel der praecipitaatvorming ontstaat eveneens, wanneer men het soortelijk zwaardere antiserum onder een oplossing van het homologe antigeen brengt en wel schijfvormig in het scheidingsvlak der beide vloeistoffen.

HAUSER [52]) zoog in een capillaire buis eerst een hoeveelheid bloedoplossing en daarna specifiek antiserum. Op het aldus ontstane scheidingsvlak der beide vloeistoffen ontstond het neerslag als een zichtbare schijfvormige troebeling, die zich later in vlokjes op den wand van het capillair afzette.

FIEHE [53]) voerde de reactie uit in buisjes van 8 cm lengte en 4 mm dikte. Eerst werden 3 tot 6 druppels van de antigeenoplossing in het

buisje gebracht, daarna liet F. 3 druppels antiserum voorzichtig langs den wand loopen. Dit serum zonk door grooter soortelijk gewicht op den bodem der buis en vormde een scheidingsvlak met de te onderzoeken vloeistof.

FORNET en MÜLLER [54-55]) pasten op gelijke wijze de ringreactie toe en merkten af en toe een zoogenaamden dubbelring op, speciaal bij het onderzoek van verhit paardenvleesch. Zij verkozen de ringreactie boven andere wegens de groote gevoeligheid en de gemakkelijke afleesbaarheid.

BAUER [56]) gebruikte eveneens de ringreactie om haar groote gevoeligheid, maar mengde na de aflezing beide vloeistoffen en las later opnieuw af.

ASCOLI [57]) voerde de reactie uit, door met behulp van een tot een capillair uitgetrokken pipet het serum onder de te onderzoeken vloeistof te brengen. Ook bracht A. wel de onbekende antigeenoplossing op het serum, door deze vloeistof uit een filtertrechter, die in een capillair eindigde, kort boven het serum langs den wand der buis te laten vloeien.

FORSTER [58]) vergeleek de ringreactie met de uitvlokkingsproef. Hij behandelde konijnen met schapenserum en bepaalde met beide reacties na hoeveel tijd het antigeen uit de konijnencirculatie verdween. F. merkte op, dat de hoogste top, bepaald met behulp van de ringreactie, niet overeenkwam met dien, bepaald met behulp van de uitvlokkingsproef. Verder kwam vast te staan, dat de ringreactie na de laatste inspuiting veel langer praecipitabele stof in de circulatie aantoonde, dan de uitvlokkingsproef.

MEISZNER [59]) gaf eveneens de voorkeur aan de ringreactie en las deze maximaal na 15 minuten af.

BRÜNING en KRAFT [60]) gebruikten pipetten van 3,5 mm dikte met een uitgetrokken spits van 12 mm lengte, om het serum als afzonderlijke druppels in een matig snelle reeks langs den wand der buis, die de onbekende vloeistof bevatte, uit te laten vloeien.

Deze methode is van beteekenis om een scherpe scheiding tusschen vloeistof en serum te verkrijgen.

HEKTOEN [61]) prefereerde eveneens de ringreactie boven de uitvlokkingsproef. Hij bracht met behulp van een pipet 0.1 cc serum onder de te onderzoeken antigeenverdunning.

WOLFE [62]) merkte op, dat de flocculatie titer van een bepaald serum lager was, dan die verkregen met behulp van de ringreactie.

b. Samenvatting.

Uit deze onderzoekingen blijkt, dat uit een oogpunt van gevoeligheid de ringreactie de voorkeur verdient boven de uitvlokkingsproef.

Het is verder gewenscht gebleken speciale voorzorgen te nemen, om een scherpe scheiding te verkrijgen tusschen serum en antigeenoplossing.

c. Ringreactie.

Voor de aflezing van deze reactie, die uitgevoerd wordt in buisjes met kleine diameter — namelijk van 7—8 mm — teneinde de benoodigde hoeveelheid serum zooveel mogelijk te beperken, dient men te waken voor overstraling der reactie door te veel licht.

Zij, die gewend zijn met het microscoop te werken, zullen weten wat hiermede bedoeld wordt. Het is dan ook niet mogelijk deze reactie uit te voeren in een zonovergoten laboratorium. De geschiktste plaats om de aflezing te vergemakkelijken is in een lokaal, dat op het Noorden uitziet, op ongeveer 3—4 m van de ramen, zoodat de reactie uitsluitend in diffuus licht wordt beoordeeld.

Reflexies op de scheidingsvlakken van vloeistof en glas en van glas en lucht, die zeer hinderlijk zijn, komen hier bovendien practisch niet voor.

Bij deze reactie brengt men 4 druppels te onderzoeken antigeenoplossing in steriele buisjes, die een diameter hebben van 7½ mm en een lengte van 7½ cm.

Met een Pasteursche pipet, zooals algemeen gebruikt wordt om melksediment uit het capillair van een centrifugebuis volgens TROMSDORFF op te zuigen, welke pipet aan beide einden in een dunne capillair is uitgetrokken, wordt een hoeveelheid van ongeveer 0.1 cc serum opgezogen. Het buisje met antigeen wordt in bijna horizontalen stand gebracht. Het serumbevattende pipetje wordt daarna, terwijl het zeer los tusschen duim en vinger wordt vastgehouden, met het uiteinde van het capillair snel op den bodem van de buis gebracht en daarna losgelaten. Het is noodig het pipetje losjes vast te houden, om te voorkomen dat het capillair breekt, als het den bodem van de buis raakt.

Door het buisje met het inliggende pipetje een meer of minder sterk horizontale stand te geven, regelt men de uitvloeisnelheid van het serum.

Het buisje wordt daarna voorzichtig in verticalen stand gebracht en in een passend rekje geplaatst, waarna het pipetje uitgenomen kan worden.

De geschiktste diameter der capillaire einden van de Pasteursche pipetten is zoodanig, dat de hoeveelheid serum in ongeveer 15 seconden

is uitgevloeid, als de as van het buisje een hoek van ongeveer 60° met de verticaal maakt.

Voor iedere reactie wordt een nieuw pipetje genomen. Op deze wijze is het mogelijk na eenige oefening een volkomen onberispelijke ringreactie, die derhalve zeer uniform is, in te stellen.

Voor de aflezing der reactie wordt het buisje uit het rekje genomen en in verticalen stand op ooghoogte langzaam op en neer bewogen, totdat men precies langs het scheidingsvlak der vloeistoffen ziet; men ziet daarbij in de richting van een muurvlak tusschen twee ramen. De afleestijd der reactie wordt maximaal gesteld op 45 minuten, nadat de vloeistoffen bijeen gebracht werden.

Par. 3. Eerste titer- en specifiteitsbepaling.

De konijnen genummerd 62, 63 en 64 ontvingen ieder 3 intraperitoneale injecties van 5 cc en een vierde van 10 cc eendeneiïnhoud, die 1 op 3 verdund was met physiologische keukenzoutsolutie; de konijnen genummerd 73 en 74 ontvingen bovendien een vijfde injectie van 10 cc.

Voor de titer- en specifiteitsbepaling van het serum worden ei-wit en dooier van een eendenei en van een kippenei met behulp van de halve schalen gescheiden. De ei-witten worden voorzichtig geklutst zonder veel schuim te maken, om de oplosbaarheid in physiologische keukenzoutoplossing te bevorderen. In steriele buizen worden verdunningen gemaakt van 1 op 100. Deze worden gefiltreerd door steriel papier om te voorkomen, dat bij de volgende verdunning onopgeloste vlokjes worden overgebracht, welke vlokjes op het scheidingsvlak tusschen serum en eiwit plaatselijk een onjuiste eiwitconcentratie zouden veroorzaken. Daarna worden ei-witverdunningen gemaakt van 1 op 1000 en 1 op 10000.

Van de onbeschadigde dooiers wordt met een 1 cc pipet het dooiervlies doorstoken en de benoodigde hoeveelheid dooier opgezogen. Bij doorvallend licht controleert men, dat geen aanhangend ei-wit mee in de pipet terecht gekomen is.

Daarna wordt een verdunning van 1 op 10 in physiologische keukenzoutoplossing gemaakt, waarbij door herhaaldelijk opzuigen van de vloeistof alle dooier uit de pipet in oplossing wordt gebracht. De volgende verdunning, namelijk van 1 op 100, wordt met een schoone pipet gemaakt.

In tegenstelling met een ei-witoplossing van 1 op 100 is de even sterk verdunde dooier niet voldoende helder om aflezing van een ringreactie mogelijk te maken. Vandaar, dat deze oplossing nadat ze ge-

durende 10 minuten sterk gecentrifugeerd is, nogmaals tienvoudig verdund moet worden, vóór ze voldoende helder is. Daarna wordt nog een verdunning van 1 op 10000 gemaakt.

De resultaten van deze titer- en specifiteitsbepaling zijn neergelegd in tabel No. 1.

TABEL No. 1.

Eerste titer- en specificiteitsbepaling van „natief" eendeneiantisera.

Tijd van aflezing en uitslag der praecipitatiereactie.

	Verdunning der antigeenoplossing	Onderzocht antigeen	Nummers der sera				
			62	63	64	73	74
I Eiwitoplossingen	1/100	*E*.W.natief	1 m +	2 m +	1 m +	1 m +	1 m +
		K.W.natief	1 m +	8 m +	1 m +	1 m +	1 m +
	1/1000	*E*.W.natief	1 m +	2 m +	1 m +	1 m +	1 m +
		K.W.natief	1 m +	**45 m —**	1 m +	1 m +	1 m +
	1/10000	*E*.W.natief	2 m +	2 m +	2 m +	2 m +	2 m +
		K.W.natief	3 m +	**45 m —**	2 m +	2 m +	2 m +
II Dooieroplossingen	1/1000	*E*.D.natief	1 m +	1 m +	1 m +	1 m +	1 m +
		K.D.natief	3 m +	4 m +	3 m +	3 m +	3 m +
	1/10000	*E*.D.natief	3 m +	3 m +	3 m +	3 m +	3 m +
		K.D.natief	4 m +	6 m +	4 m +	4 m +	6 m +

Ter toelichting moge het volgende dienen:

Natief eendenei-wit wordt voorgesteld door „E.W.natief", natieve eendendooier door „E.D.natief". Evenzoo beteekenen „K.W.natief" en „K.D.natief" respectievelijk kippenei-wit en kippendooier in natieven toestand.

Uit deze tabel 1 blijkt, dat slechts met serum 63 eendenei-wit gedifferentieerd kan worden van kippenei-wit, wanneer de oplossing minstens 1 op 1000 verdund is. Immers alleen bij dit serum bleek na 45 minuten geen neerslag op te treden, wanneer het in aanraking gebracht werd met even sterk-verdunde oplossingen van kippenei-wit, terwijl in die van eendenei-wit reeds na 1 respectievelijk 2 minuten een duidelijk neerslag werd waargenomen.

Bij alle andere sera was na enkele minuten niet alleen een neerslag te zien, wanneer zij met eendenei-witoplossingen in contact werden gebracht, maar ook wanneer kippenei-witoplossingen in de buisjes aanwezig waren.

Geen der sera stelt ons in staat eendendooier te onderscheiden van kippendooier, hoewel de homologe reactie iets vlugger tot stand komt dan de verwantschapsreactie.

Uit een zuiver wetenschappelijk oogpunt bekeken bezit serum 63 bijzondere eigenschappen. Tot op zekere hoogte kan hiermede eendeneiwit onderscheiden worden van kippenei-wit. Wanneer men in levensmiddelen uitsluitend met ei-wit te maken had, dan zouden met dit serum ook onder practijkomstandigheden eet- en drinkwaren met succes onderzocht kunnen worden. Dit is echter niet het geval. Veelal wordt uitsluitend dooier of wel de geheele eiinhoud gebruikt. De hierbij voorkomende verwantschapsreacties sluiten het gebruik van serum 63 ten eenenmale uit.

Met het bereiden van deze sera hebben wij het in de Inleiding gestelde doel nog in het geheel niet bereikt. Wij zullen in de verdere deelen van dit proefschrift nagaan op welke wijze dit echter toch in belangrijke mate mogelijk is gebleken.

Par. 4. Middelen ter verhooging van de specifiteit der praecipitine-reactie.

a. Literatuuroverzicht.

Het in de vorige par. beschreven onbevredigende resultaat der praecipitine-reacties dwingt ons om te zien naar de verschillende hulpmiddelen, die kunnen worden aangewend, om een verhooging van de specifiteit dezer reactie te verwerven. Het meerendeel der daarover in de literatuur vermelde onderzoekingen werd verricht met sera, die bereid werden door injectie van lichaams-eiwitten (of van fracties resp. derivaten daarvan) afkomstig van *zoogdieren*. Wij zullen ons daarmede dus eerst bezighouden, om daarna de onderzoekingen te bespreken, die met antisera voor „vogeleiwitten" werden uitgevoerd.

Onder de middelen, die tot verhooging der specifiteit — of wat het vraagpunt beter weergeeft — tot het wegnemen van niet specifieke reacties werden toegepast, vindt men in de literatuur vermeld:

1. Verdunning van het praecipiteerende serum.
2. Toevoeging aan dit serum van „gewasschen"—„ongewasschen" of gekookte schapenbloedlichaampjes, resp. van bloed.
3. Behandeling van dit serum met door middel van alcohol verkregen coagulaten van heteroloog antigeen.

4. Injectie bij het serum leverende dier — kort voor het winnen van het serum — van heteroloog antigeen.
5. Vermindering van de ingespoten doses antigeen.
6. „Specifieke verzadiging" van het gewonnen serum met heteroloog antigeen.

Wij willen trachten de gegevens uit de literatuur over elk dezer werkwijzen bijeen te brengen. Dit zal echter slechts ten deele uitvoerbaar zijn, daar verschillende schrijvers twee of meer van deze methoden toepasten.

1. Verdunning van het praecipiteerend serum.

Volgens WOLFE [86]) bezat antiserum, dat 1 op 5 of 1 op 10 met physiologische zoutoplossing verdund was, een grootere specifiteit dan hetzelfde serum in onverdunden toestand, maar de specifiteit was niet in die mate toegenomen, dat het serum hem tot meer in staat stelde dan met hetzelfde serum in onverdunden toestand bereikbaar was.

Daarentegen werd met behulp van het principe der specifieke verzadiging (zie sub 6.) wel een vergrooting der specifiteit verkregen, die in de praktijk groote diensten kan bewijzen. W. kon door toepassing daarvan runderbloed differentieeren van schapen- en geitenbloed.

BERTARELLI [69]) heeft door toepassing van *trapsgewijze verdunning* van het immuunserum en door specifieke verzadiging albumine en globuline van elkaar kunnen onderscheiden. Hij kwam tot de conclusie, dat albumine en globuline van het paard onafhankelijk van elkaar ieder een specifiek praecipitine opwekken.

FRIEDBERGER en COLLIER [70]) bereidden paarden-, katten- en hondeneiwitpraecipiteerende sera alsmede kippenei-witantisera. De kippeneiwit- en hondeneiwitantisera gaven naast reactie met het homologe antigeen geen reactie met schapeneiwit, de andere praecipiteerden schapeneiwit wel en hoewel minder sterk, ook andere verwante eiwitten.

Vier- of achtvoudige verdunning der sera gaf een opheffing der verwantschapspraecipitatie. F. en C. achtten deze methode echter ongeschikt om grootere specifiteit te verkrijgen, omdat de homologe titer der sera door deze verdunning sterk terugging. Door toevoeging van schapenbloedlichaampjes aan de sera kon alle verwantschapspraecipitine verwijderd worden. De homologe praecipitine werd door deze behandeling niet beinvloed.

MANTEUFEL en BEGER [72]) maakten onderscheid tusschen de parapraecipitatie, die optrad met eiwitten van na verwante diersoorten

en de heterologe reactie, die optrad, wanneer een praecipiteerend serum reageerde met eiwit van een niet aan de homologe verwante diersoort. Door deze laatstgenoemde reactie waren 13% der door M. en B. bereide praecipiteerende sera onbruikbaar.

Verdunning van deze sera gaf geen bevredigende resultaten, omdat hiermede een aanmerkelijke titer-verlaging gepaard ging.

Toevoeging van bloedlichaampjes van verschillende diersoorten afkomstig, aan onverdunde zoowel als aan verdunde sera, gaf evenmin bevredigende resultaten. Ook door toevoeging van de heterologe antigenen aan de sera kon niet alle heterologe praecipitine verwijderd worden.

2. Toevoegen van bloedlichaampjes of bloed aan het praecipiteerend serum.

BEGER [78]) paste verzadiging van de door hem bereide sera toe door toevoeging zoowel van natieve bloedlichaampjes als van gekookte. Toevoeging van de eerste had niet altijd het gewenschte resultaat; toevoeging van de laatste leverde in geen enkel geval resultaat op. B. achtte de verzadiging met belangrijke moeilijkheden behept.

FRIEDBERGER en MEISZNER [74]) onderscheidden isogenetische-, verwantschaps- en heterogenetische praecipitatie. Wanneer de door UHLENHUTH voorgeschreven contrôles volledig werden uitgevoerd, had de heterogenetische praecipitatie slechts theoretische beteekenis.

Het toepassen van verzadiging was het juiste middel om de *verwantschapsreactie* te elimineeren. Daarbij werden de beste resultaten verkregen door toevoeging van *gewasschen bloedlichaampjes, zoodat deze slechts als de uitslingerbare drager van de uitvlokkende serumbestanddeelen dienden.*

Het *isogenetische* antigeen verwijderde zoowel de isogenetische als de verwantschaps- als de heterogenetische praecipitine; het heterogenetische antigeen verwijderde slechts de heterogenetische praecipitine en wel alle heterogenetische. Het verwante antigeen gedroeg zich over het algemeen als het isogenetische. Gekookt antigeen verwijderde, onverschillig of het isogenetisch of heterogenetisch was, alleen alle heterogenetische praecipitine.

ILCHUN YU [75]) verzadigde „runderserum"- en „paardenserum"-antiserum door toevoeging van een der verwante antigenen en verwijderde daarmede alle verwantschapspraecipitine. I. merkte tevens op, dat de homologe titer door deze behandeling verlaagd werd.

Eenzelfde gunstig resultaat werd *niet steeds bereikt* door verzadiging der sera met *gewasschen schapen- of runderbloedlichaampjes.* Het

succes was grooter, *wanneer ongewasschen bloedlichaampjes* werden gebruikt.

WEICHARDT [66]) besprak nader de specifieke verzadiging van een menschenserumpraecipiteerend serum, door toevoeging aan dit serum van apenbloed en verwijdering van het ontstane neerslag. Hij merkte in verband hiermede op, dat door deze verzadiging de specifiteit van een serum vergroot kan worden. Verder was W. in staat door middel van een soortgelijke verzadiging verschil aan te toonen tusschen bloed van twee verschillende menschen.

KISTER en WEICHARDT [65]) waren in staat door toevoeging van heteroloog praecipiteerend serum aan bloed en wegneming van het ontstane sediment een bloedoplossing te verkrijgen, die uitsluitend reactie gaf met het homologe antiserum. Uit deze bloedoplossing werd dus die praecipitogeen-stof verwijderd, die verantwoordelijk gesteld moet worden voor de verwantschapsreactie.

Omgekeerd konden zij door toevoeging van de heterologe bloedsoort aan het praecipiteerende serum en verwijdering van het ontstane praecipitaat die praecipitinen, die reactie met deze verwante bloedsoort gaven, uit het serum verwijderen. Door deze behandeling was het serum specifiek voor het homologe antigeen geworden.

3. Behandeling van het serum met alcoholische coagulaten.

HALLMANN [87]) kwam op grond van hare onderzoekingen tot de conclusie, dat antigenen, die door alcohol gecoaguleerd waren, hun functie volkomen behouden hadden. Door menging van het antiserum met het homologe coagulaat werd zoowel de homologe als de verwantschapspraecipitine geëlimineerd; coagulaat van verwant antigeen verwijderde uitsluitend het verwantschapspraecipitine, terwijl de homologe praecipitine volkomen intact gelaten werd.

Heel gemakkelijk gelukte de opheffing der homologe reactie van polyvalente sera door toevoeging van homoloog coagulaat.

4. Verzadiging in vivo.

In tegenstelling met alle tot dusver aangehaalde onderzoekingen trachtte NISHEGOREDZEFF [82]) verzadiging in vivo te bereiken door intraveneuze inspuiting bij het serumleverende dier van 1 tot 2 cc van een verwant antigeen op een tijdstip kort voor de serumwinning. Hierdoor werd niet alleen de heterologe praecipitine, doch ook de verwantschapspraecipitine geëlimineerd. De homologe titer daalde daarbij slechts weinig.

Het was in vivo niet mogelijk door injectie van het *homologe* antigeen

de *homologe* praecipitine te elimineeren, hetgeen bij verzadiging in vitro wel mogelijk was.

JORDANOFF [85]) differentieerde boter naar de melksoort, waaruit ze bereid was, door middel van lactosera. Hij merkte bij dit onderzoek op, dat de meeste lactosera niet volkomen specifiek waren. Door wijziging der immunisatie kon deze parapraecipitatie gedeeltelijk onschadelijk gemaakt worden. *Door de konijnen namelijk* 1 *tot* 2 *dagen voor de serumwinning te injiceeren met* 2 *tot* 3 *cc verwant antigeen* werden deze resultaten verkregen. Volgens J. bestond er echter slechts één goede methode van verzadiging en wel die, waarbij met behulp van een reeks kleine proefverzadigingen in vitro de kleinste hoeveelheid verwant antigeen bepaald werd, die juist voldoende was om de gewenschte verzadiging te bewerkstelligen. Pas wanneer vaststond hoe groot deze hoeveelheid was, werd overgegaan tot verzadiging van den geheelen voorraad serum.

5. Inspuiting met geringe hoeveelheden antigeen.

BLUMENTHAL [79]) was van meening, dat alle moeilijkheden, nadat het serum gewonnen was, nog niet overwonnen waren om met de verschillende aangegeven methoden specifiteit te bereiken.

Hij gaf er de voorkeur aan de proefdieren met betrekkelijk kleine hoeveelheden antigeen te immuniseeren en aldus grootere specifiteit te verkrijgen. Op deze wijze was het mogelijk na ongeveer 1 maand, onafhankelijk van jaargetijde, ouderdom, geslacht en voeding der proefdieren, sera te bereiden, die een titer hadden van minstens 1 op 20000 naast een goede specifiteit.

6. Specifieke verzadiging.

Het principe der specifieke verzadiging werd voor het eerst toegepast om de specifiteit van een agglutineerend serum, dus een serum ontstaan na de injectie van bacteriën, te verhoogen.

De sera bereid door CASTELLANI [63]) agglutineerden namelijk niet alleen de homologe bacteriesoort, maar eveneens verwante soorten. Door de homologe bacteriesuspensie aan het serum toe te voegen werden alle agglutininen hieruit verwijderd; toevoeging van de verwante bacteriesoort verwijderde alleen de agglutininen tegen deze bacterie. Het agglutineerend vermogen tegen de homologe bacteriën werd door deze behandeling niet noemenswaard beinvloed.

Ditzelfde principe vond ook toepassing bij het onderzoek naar de aanwezigheid van „eiwitfracties". Door middel van gefractioneerde uitzouting kan eiwit in verschillende eiwitfracties uiteen worden gelegd.

Ascoli [64]) bereidde met behulp van deze afzonderlijke fracties praecipiteerende sera, die niet streng specifiek waren voor de ingespoten eiwitfractie. Ze praecipiteerden namelijk ook de andere fracties.

Voegde A. de homologe eiwitfractie bij het antiserum, dan kreeg hij, wanneer serum en antigeen voldoende lang op elkaar hadden ingewerkt, geen verhooging van het sediment, wanneer daarna de verwante fractie bij dit mengsel werd gevoegd. Werd daarentegen eerst de verwante fractie bij het immuunserum gevoegd, dan ontstond daarna bij toevoeging der homologe fractie of bij toevoeging van het volledige eiwit, wel opnieuw een neerslag.

Hiermede toonde A. aan, dat de homologe fractie alle praecipitine uit de oplossing verwijderde, terwijl toevoeging van de verwante fractie alleen de verwantschapspraecipitine verwijderde. Immers door daarna de homologe fractie toe te voegen, ontstond opnieuw een neerslag onder invloed van de nog aanwezige homologe praecipitine.

Hektoen en Schulhof [73]) bereidden door inspuiting van runderhaemoglobine praecipiteerende sera met een titer van 1 op 256000 tegen runderhaemoglobine, 1 op 24000 tegen schapenhaemoglobine, 1 op 32000 tegen menschenhaemoglobine en zonder merkbare titer tegen varkens-, paarden-, caviahaemoglobine en runderserum.

Vermenging van dit serum met gelijke deelen runderhaemoglobine 1 op 200 verdund met physiologische keukenzoutoplossing had tot gevolg, dat alle praecipitinen neersloegen; vermenging met eenzelfde hoeveelheid schapen- en menschenhaemoglobine had tot resultaat, dat alleen de antilichamen tegen schapen- en menschenhaemoglobine werden verwijderd. Door deze verzadiging was het serum specifiek geworden.

Boor en Hektoen [49], [83], [84]) merkten op, dat oxyhaemoglobine en carbhaemoglobine bij de praecipitatiereactie geen verwantschap vertoonden. Alleen ten aanzien van dezelfde eiwitten, afkomstig van verwante diersoorten, trad parapraecipitatie op. Door verdunning der praecipiteerende sera met physiologische keukenzoutoplossing of physiologisch konijnenserum, in een verhouding van 1 op 3, kon hier specifiteit bereikt worden.

B. en H. concludeerden hieruit, dat het gemeenschappelijke radicaal in het antigeenmolecule een zwakkere antigeen-functie bezit dan het soortspecifieke deel.

Naast de specifiteitsvergrooting door verdunning der sera heeft bij deze schrijvers eveneens *het principe der specifieke verzadiging* een onderwerp van onderzoek uitgemaakt. Veelal werden de verwantschapsreacties ten aanzien van eenige verwante antigenen geëlimineerd,

door toevoeging aan het immuunserum van *één enkel* antigeen, doch dit resultaat werd niet constant bereikt.

Overeenkomstige experimenten werden door de schrijvers uitgevoerd met respectievelijk 14- en 35-waardige praecipiteerende sera. Door absorptieproeven konden de meeste praecipitinen specifiek verwijderd worden; andere lieten zich echter niet volkomen elimineeren. Hierbij werd opgemerkt, dat relatief kleine hoeveelheden sterk verdund antigeen noodig waren om verzadiging te bewerkstelligen.

Een enkel antigeen verwijderde meestal verscheidene praecipitinen.

HEKTOEN en WELKER [76]) injiceerden bij konijnen „Benze-Jones" proteine en verkregen een serum, dat zoowel het ingespoten antigeen als normaal menscheneiwit praecipiteerde. Door aan het serum een gelijke hoeveelheid menschenserum, 1 op 200 verdund, toe te voegen en het gevormde neerslag te verwijderen, was het antiserum specifiek geworden voor Benze-Jones proteine.

MICHAELIS [67]) was in staat, door gebruik te maken van het principe der specifieke verzadiging, een praecipiteerend serum te verkrijgen, dat geen reactie meer gaf met euglobuline, daarentegen wel met pseudoglobuline.

OBERMAYER en PICK [68]) waren de meening toegedaan, dat eiwit een tweevoudige specifiteit bezit; de eerste is de originaire of *soortspecifiteit*, de andere is afhankelijk van de door physico-chemische invloeden bepaalde toestandsphase en kan de *constitutieve* of *toestandsspecifiteit* genoemd worden. Door verhitting van eiwit verkrijgt dit een andere toestandsspecifiteit. Injectie van verhit eiwit heeft tot gevolg het ontstaan van afzonderlijke kokto- en normale immuunlichamen, die beide door specifieke verzadiging verwijderd kunnen worden.

Doch de grootste beteekenis heeft deze methode gekregen bij het onderzoek van volledige „lichaamseiwitten".

UHLENHUTH en WEIDANZ [14]) wezen daarbij echter de specifieke verzadiging van de hand. Zij merkten op: „Die Herstellung derartiger einwandfreier Diagnosensera ist aber eine aüszert diffizile und stöszt selbst in der Hand des Geübten oft auf unüberwindliche Schwierigkeiten."

FÜRTH [77]) beschreef de verwantschapsreactie van een runderserumantiserum met schapen- en geitenserum. Door zoowel schapen- als geitenserum aan dit immuunserum toe te voegen kon specifiteit bereikt worden.

Geitenserum toegevoegd aan een schapenserumpraecipiteerend serum verwijderde alle praecipitinen, zoowel homologe als heterologe.

Waar UHLENHUTH niet in staat was door kruisgewijze immunisatie schapeneiwit en geiteneiwit te differentieeren, kwam F., mede op grond van de bovengenoemde resultaten, tot de conclusie, dat schapenantigeen en geitenantigeen identiek zijn. Door toevoeging van het homologe antigeen immers kunnen alle praecipitinen uit een antiserum verwijderd worden.

Echter verloren de aldus verzadigde sera spoedig hun homologe titer door de aanmerkelijke verdunning, die tijdens de verzadiging optrad, zoodat het de vraag is, of de argumentatie van F. wel steekhoudend genoemd mag worden.

HEKTOEN en DELVES [50]) verzadigden multivalent praecipiteerende sera successievelijk met de afzonderlijke antigenen. Sommige antigenen verwijderden een of twee praecipitinen tegelijk, andere daarentegen verwijderden zelfs de homologe antilichamen niet geheel.

SCHULZ [34]) was van meening, dat verwantschapsreacties moeten worden toegeschreven aan verschillende eiwitgroepen, die gemeenschappelijk bij verwante diersoorten aanwezig zijn. Hij kon door toepassing van specifieke verzadiging deze verwantschapsreacties elimineeren.

GAETHGENS [80]) voegde aan 5 cc lactoserum ½ cc verwant antigeen toe en verwijderde het daarop ontstane neerslag. Zoo noodig werd meer verwant antigeen toegevoegd. Op deze wijze werd een specifiek serum verkregen, dat echter een verlaagde homologe titer bezat.

WOLFE [81]) achtte slechts één goede methode beschikbaar om mengsels van verschillende bloedsoorten te identificeeren, namelijk met behulp van sera, die door verzadiging specifiek geworden waren. Een aantal sera werden door toevoeging van heteroloog antigeen verzadigd, waarbij de specifieke antilichamen in onverminderde mate werkzaam bleven.

Ook ten aanzien van vogelei-witten zijn onderzoekingen verricht met het doel de specifiteit der praecipitinereactie door middel van verzadiging te verbeteren.

Zoo konden WELSH en CHAPMANN [35]) aantoonen, dat door toevoeging van één verwant ei-wit aan een praecipiteerend ei-witantiserum de verwantschapsreactie van dit serum met ei-wit, afkomstig van een aantal verwante vogelsoorten, werd opgeheven. Zij concludeerden hieruit, dat in een ei-witantiserum een algemeen vogelei-witantilichaam aanwezig is tegelijk met een specifieke antistof.

FRIEDBERGER en JARRE [71]) merkten de parapraecipitatie op van een eendenei-witantiserum met kippen- en ganzenei-wit. Deze ver-

wantschapsreactie was met kippenei-wit sterker dan met ganzenei-wit. Door toevoeging van bloedlichaampjes afkomstig van verscheidene diersoorten gelukte het F. en J. slechts voor een deel de verwantschapspraecipitine te verwijderen.

HOOKER en BOYD [45]) bereidden praecipiteerende sera door injectie van eenden- en kippeneialbumine, dat in het geheel 6 keer omgekristalliseerd was. Wanneer deze sera hun maximale titer nog niet bereikt hadden, was de specifiteit vrij groot. Was later de hoogste titer bereikt, dan bleken beide sera gelijke reacties te geven met kippen- en eendeneialbumine. Door specifieke verzadiging toe te passen was specifiteit te bereiken. Dat door deze verzadiging de homologe titer geheel behouden bleef, werd mede gecontroleerd door middel van de methode der optimale proporties van Dean.

De resultaten van deze onderzoekingen werden door H. en B. geacht de opvatting te bevestigen, dat in een enkel molecule van een zuiver eiwit verschillende determinante groepen van uiteenloopende specifiteit bestaanbaar zijn.

Wij vestigen er in het bijzonder de aandacht op, dat in de literatuur *tevergeefs* werd gezocht naar onderzoekingen, die ten doel hadden dooierantisera door verzadiging een zoodanige specifiteit te geven, dat differentiatie van verschillende dooiersoorten mogelijk werd. Zooals in het verdere gedeelte van dit proefschrift zal blijken, zijn wij daarin als eerste geslaagd.

b. Enkele critische beschouwingen over de gegevens uit de literatuur.

Uit de bovenaangehaalde literatuur blijkt overduidelijk, dat de verwantschapsreactie een veelvuldig begeleidend verschijnsel van de homologe praecipitatiereactie is.

Bij een deel der praecipiteerende sera treedt echter nog een ander verschijnsel op den voorgrond, namelijk de heterologe reacties, die optreden met eiwitten van diersoorten, die in het zoölogische systeem vrij ver van de homologe verwijderd staan.

Het bijzondere van deze verwantschaps- en heterologe praecipitinen, die ontstaan zijn onder invloed van de inspuiting van één enkel antigeen, is, dat ze als regel alle geëlimineerd worden door toevoeging van één enkel verwant of heteroloog antigeen aan het praecipiteerende serum en verwijdering van het daardoor ontstane neerslag. In dit licht moeten ons inziens de successen worden bezien, die bereikt zijn met de toevoeging van schapenbloedlichaampjes aan praecipiteerende sera van uiteenloopende soort. Deze sera hebben ongetwijfeld verwantschaps-

reactie of heterologe reactie gegeven met schapeneiwit. Omgekeerd mag ons inziens worden aangenomen, dat wanneer een praecipiteerend serum geen verwantschapsreactie of heterologe reactie geeft met schapeneiwit, dus daarmede geen neerslag vormt, toevoeging van schapenbloedlichaampjes aan dit serum volkomen doelloos is.

Wij meenen deze werkwijze, voor zoover ze niet gericht is op de eliminatie van een verwantschapsreactie met schapeneiwit, als regel op toevallige omstandigheden berust en veelal inconstante resultaten geeft, een *niet specifieke verzadiging* te mogen noemen. Als een voordeel voor deze methode zou enkel kunnen gelden het feit, dat een eventueele overmaat aan toegevoegde bloedlichaampjes gemakkelijk quantitatief uit de sera kan worden verwijderd.

Eenzelfde argument kan worden aangevoerd ten voordeele van het gebruik van, door alkohol gecoaguleerd, verwant antigeen, om verzadiging te bereiken.

Het verdunnen van het serum met physiologische keukenzoutoplossing of physiologisch konijnenserum blijkt ook niet de meest geschikte methode te zijn om de specifiteit van een immuunserum te verhoogen. Enkele proeven, die door ons met deze methode zijn genomen, bevestigen de volkomen onbruikbaarheid daarvan.

Aantrekkelijker lijkt daarentegen de toevoeging van hetzelfde antigeen aan het praecipiteerende serum, tegenover hetwelk men de verwantschapsreactie wil opheffen. Bij de praecipitatie treedt immers een specifieke chemische binding op tusschen antilichaam en antigeen. Onder invloed der aanwezige electrolyten wordt deze verbinding uitgezouten en kan dus verwijderd worden. Er bestaat ons inziens geen enkele reden om aan te nemen, dat de verwantschapspraecipitine en het betreffende verwante antigeen niet eveneens op dezelfde wijze met elkaar reageeren en gezamenlijk uitgezouten worden.

Om dus op doelbewuste wijze een eendenei-witantiserum te bevrijden van de praecipitine, die reageert met kippenei-wit, dient kippenei-wit aan dit praecipiteerende serum toegevoegd te worden en het hierna ontstane neerslag te worden verwijderd. Op dezelfde wijze moet een serum, dat bereid is door injectie van eendenei-wit plus eendendooier van de verwantschapspraecipitine bevrijd worden door toevoeging van kippenei-wit plus kippendooier en verwijdering van het neerslag.

Deze behandeling mag met recht *specifieke verzadiging* genoemd worden.

Ons inziens dienen hierbij de volgende overwegingen in acht genomen te worden. Geen enkel onderzoeker zal *zonder redelijk doel*

eenig eiwit, welk dan ook, aan de te zijner beschikking staande praecipiteerende sera toevoegen of deze onnoodig meer of minder sterk verdunnen met physiologische keukenzoutoplossing. Om het één zoowel als het ander zooveel mogelijk te vermijden, dient dus verzadiging bereikt te worden door toevoeging van zoo *klein mogelijke hoeveelheid* verwant antigeen *in zoo sterk mogelijke concentratie.*

Aangezien redelijkerwijze verwacht mag worden, dat voor verzadiging der verschillende sera niet steeds een gelijke hoeveelheid verwant antigeen benoodigd is, kan zulks slechts bereikt worden door vooraf een aantal proefverzadigingen van kleine hoeveelheden serum te verrichten en op grond van den uitslag daarvan den geheelen voorraad te verzadigen. Door de concentratie der toegevoegde kippeneioplossing en/of de hoeveelheid daarvan telkens bij de afzonderlijke proefverzadigingen iets te laten opklimmen, kan gezorgd worden, dat geen nuttelooze overmaat antigeen wordt toegevoegd of een aanmerkelijke verdunning van het serum veroorzaakt wordt.

Rekening houdende met bovenstaande overwegingen zijn door ons de hierna te bespreken specifieke verzadigingen toegepast.

c. Toepassing der specifieke verzadiging ten aanzien van ei-wit.

Van de natieve *eendeneiantisera*, bereid door injectie van den geheelen eiinhoud, die genummerd zijn 62, 63, 64, 73 en 74 wordt telkens 1 cc nauwkeurig afgepipetteerd en in vooraf klaargezette en gemerkte steriele centrifugebuisjes overgebracht. De nummering der buisjes is als volgt: 62_1, 62_2, 62_3, 62_4, 62_5 en 62_6; 63_1, 63_2 enzoovoort.

Het ei-wit uit een *kippenei* wordt voorzichtig geklutst. Hiervan worden verdunningen in physiologische keukenzoutoplossing gemaakt van 1 op 40 en van 1 op 200. Deze oplossingen worden door steriele papierfilters ontdaan van niet opgeloste eiwitvlokjes.

Bij de buisjes 62_1, 62_2, en 62_3 voegt men respectievelijk 0.025 cc, 0.05 cc en 0.1 cc kippenei-witoplossing 1 op 200; bij de buisjes 62_4, 62_5 en 62_6 respectievelijk 0.025 cc, 0.05 cc en 0.1 cc kippenei-witoplossing 1 op 40. Dezelfde hoeveelheden ei-witoplossing in dezelfde concentratie worden toegevoegd aan de op overeenkomstige wijze gemerkte buisjes, welke met 1 cc serum 63, 64, 73 en 74 zijn gevuld.

De zooeven genoemde ei-witoplossingen worden afgemeten met een pipet van 1 cc, die in honderdsten gecalibreerd is. Tijdens het uitvloeien der betrekkelijk kleine hoeveelheden ei-witoplossing uit de pipet raakt de punt der pipet den binnenwand der buisjes onder een constanten hoek. Als de gewenschte hoeveelheid eioplossing uit de pipet gevloeid is, wordt de punt van de pipet over een korten afstand

in de richting van het open einde der buis langs den binnenwand daarvan gestreken. Deze maatregelen hebben ten doel om ook inderdaad precies de afgelezen hoeveelheid ei-witoplossing in de serumbevattende buis terecht te doen komen.

De buis wordt daarna in bijna horizontalen stand gebracht, zoodat het serum dat deel der buis bespoelt, waarlangs de afgemeten hoeveelheid eioplossing gevloeid is, zulks om te zorgen, dat de totale hoeveelheid oplossing ook inderdaad gemengd wordt met het serum en niet voor een deel aan den wand blijft kleven. Door daarna het buisje vrij plotseling in een verticalen stand te brengen worden serum en ei-witoplossing voldoende gemengd.

De buisjes met serum blijven daarna rustig op een koele plaats staan tot den volgenden dag om de reactie volledig te laten uitwerken. Tabel 2 geeft een overzicht van de verschillende „sera", die op deze wijze worden vervaardigd en van hunne nummering.

TABEL 2.

Toegevoegde ei-witoplossing.							
Verdunning		K.W.natief 1 : 200			K.W.natief 1 : 40		
Hoeveelheid in cc's		0.025	0.05	0.1	0.025	0.05	0.1
Overeenkomend met een hoeveelheid onverdund kippenei-wit in mm³'s		0.125	0.25	0.5	0.625	1.25	2.5
		Nummers der aldus bereide sera					
Telkens 1 cc eendenei-antiserum van de nevenstaande nummers	62	62_1	62_2	62_3	62_4	62_5	62_6
	63	63_1	63_2	63_3	63_4	63_5	63_6
	64	64_1	64_2	64_3	64_4	64_5	64_6
	73	73_1	73_2	73_3	73_4	73_5	73_6
	74	74_1	74_2	74_3	74_4	74_5	74_6

Om het gevormde praecipitaat tot een klein volume op den bodem der buisjes te comprimeeren worden deze daarna gedurende 10 minuten gecentrifugeerd.

Met de nu heldere sera worden, ten einde te controleeren in welke buizen reeds voldoende verzadiging is opgetreden, praecipitatiereacties uitgevoerd met als antigeen een gefiltreerde kippenei-witoplossing van 1 op 100 in physiologische keukenzoutsolutie.

De tabellen 2 en 3 geven een overzicht van deze bewerking en de resultaten daarvan.

TABEL 3.

Sera volgens tabel 2 bereid uit eendenei antisera No.	Tijd van aflezing en uitslag der praecipitatiereacties met als antigeen 1/100 verdunde kippenei-witoplossing					
	1	2	3	4	5	6
62	4 m +	4 m +	6 m +	6 m +	6 m +	7 m +
63	10 m +	10 m +	15 m +	15 m +	20 m +	20 m +
64	3 m +	3 m +	5 m +	5 m +	6 m +	7 m +
73	2 m +	2 m +	2 m +	2 m +	3 m +	4 m +
74	2 m +	3 m +	3 m +	3 m +	3 m +	3 m +

Zooals uit tabel 2 kan worden gelezen, werden bij de verzadiging der verschillende sera ten hoogste 2.5 mm³ onverdund kippenei-wit toegevoegd. De snelle vorming van een neerslag in de buisjes No. 6 bewijst, dat nog een sterke „verwantschapsreactie" bleef bestaan. Ter verwijdering van de „heterologe" praecipitinen moet dus blijkbaar nog meer kippenei-wit per cc eendeneiantiserum worden toegevoegd.

De rest van den inhoud der serumbuisjes wordt weer overgebracht in de voorraadflesch. In verband hiermede is het duidelijk, dat deze proefverzadigingen zoo aseptisch mogelijk behandeld dienen te worden om den geheelen serumvoorraad niet noodeloos te infecteeren.

Het blijkt dus noodig te zijn opnieuw verzadigingsproeven in te zetten met een vergroote hoeveelheid kippenei-wit.

De tabellen 4 en 5 geven een overzicht hiervan, alsmede van de daarmede bereikte resultaten.

Het eendenei-antiserum No. 63 blijkt bij toevoeging van 16.5 mm³ kippenei-wit (buisje No. 63_{10}) zoodanig van heterologe praecipitine bevrijd te zijn, dat, wanneer het daarna andermaal met kippenei-witoplossing in aanraking wordt gebracht, geen praecipitaat meer ontstaat. Bij het eendenei-antiserum No. 62 is dit eerst na toevoeging van 33 mm³ kippenei-wit per cc eendeneiantiserum het geval (buisje No. 62_{11}).

Bij de sera No. 64, 73 en 74 werd zelfs na „verzadiging" met 66 mm³ kippenei-wit per cc eendenei-antiserum (buisje no. 12) nog geen volledige verwijdering der „heterologe" praecipitinen bereikt.

TABEL 4.

Toegevoegde ei-witoplossing							
Verdunning		K.W.natief 1 : 8			K.W.natief 1 : 1½		
Hoeveelheid in cc's		0.025	0.05	0.1	0.025	0.05	0.1
Overeenkomend met een hoeveelheid onverdund kippenei-wit in mm³'s		3.125	6.25	12.5	16.5	33	66
		Nummers der aldus bereide sera					
Telkens 1 cc eendenei-antiserum van de nevenstaande nummers	62	62_7	62_8	62_9	62_{10}	62_{11}	62_{12}
	63	63_7	63_8	63_9	63_{10}	63_{11}	63_{12}
	64	64_7	64_8	64_9	64_{10}	64_{11}	64_{12}
	73	73_7	73_8	73_9	73_{10}	73_{11}	73_{12}
	74	74_7	74_8	74_9	74_{10}	74_{11}	74_{12}

TABEL 5.

Sera volgens tabel 2 bereid u t eendenei-antisera No.	Tijd van aflezing en uitslag der praecipitatiereacties met als antigeen 1/100 verdunde kippenei-witoplossing					
	7	8	9	10	11	12
62	8 m +	15 m +	25 m +	45 m +	**45 m —**	**45 m —**
63	10 m +	15 m +	45 m +	**45 m —**	**45 m —**	**45 m —**
64	3 m +	3 m +	4 m +	4 m +	10 m +	15 m +
73	3 m +	3 m +	4 m +	4 m +	6 m +	10 m +
74	3 m +	3 m +	4 m +	5 m +	15 m +	25 m +

De geheele voorraad serum van No. 62 en 63 wordt nu verzadigd met de overeenkomstige aan de buisjes 62_{11} en 63_{10} toegevoegde hoeveelheid kippenei-wit, dit is met resp. 33 en 16.5 mm³ per cc eendenei-antiserum en met gebruikmaking van de passende concentraties (zie tabel 4).

Het sediment wordt verwijderd, waarna de sera voor verdere bewerkingen gereed gehouden worden.

Met de resteerende sera 64, 73 en 74 worden de proeven voortgezet zooals tabel 6 en 7 aangeven.

Zooals tabel 7 laat zien zijn de proefverzadigingen 64_{16}, 73_{17} en 74_{15} de eerste in de opklimmende reeks, die juist verzadigd zijn.

TABEL 6.

Toegevoegde ei-witoplossing							
Verdunning		K.W.natief onverdund					
Hoeveelheid in cc's		0.07	0.08	0.09	0.1	0.12	0.14
Overeenkomend met een hoeveelheid onverdund kippen-eiwit in mm³'s		70	80	90	100	120	140
		Nummers der aldus bereide sera					
Telkens 1 cc eendenei-anti-serum van de nevenstaande nummers	64	64_{13}	64_{14}	64_{15}	64_{16}	64_{17}	64_{18}
	73	73_{13}	73_{15}	73_{15}	73_{16}	73_{17}	73_{18}
	74	74_{13}	74_{14}	74_{15}	74_{16}	74_{17}	74_{18}

TABEL 7.

Sera volgens tabel 6 bereid uit eendenei-antisera No.	Tijd van aflezing en uitslag der praecipitatiereacties met als antigeen 1/100 verdunde kippenei-witoplossing					
	13	14	15	16	17	18
64	12 m +	12 m +	15 m +	45 m —	45 m —	45 m —
73	45 m +	45 m +	45 m +	45 m +	45 m —	45 m —
74	45 m +	45 m +	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —

Overeenkomstig de samenstelling daarvan wordt ook van de sera 64, 73 en 74 de geheele voorraad verzadigd.

Hiervoor waren dus noodig:

voor serum	73,	een	hoeveelh.	v.	120 mm³	kippenei-wit	per	cc	eendenei-antiserum,		
„	„	64,	„	„	„ 100 mm³	„	„	„	„	„	„ ,
„	„	74,	„	„	„ 90 mm³	„	„	„	„	„	„ ,
„	„	62,	„	„	„ 33 mm³	„	„	„	„	„	„ ,
„	„	63,	„	„	„ 16.5 mm³	„	„	„	„	„	„ .

Een en ander werd bij den voorraad van elk serum toegevoegd, onder inachtneming van de meest gewenschte concentratie, die uit de tabellen 4 en 6 kan worden afgelezen.

In deze opgave zijn nogmaals de sera 62 en 63 vermeld, omdat daardoor een overzicht wordt verkregen van de zeer groote verschillen in de hoeveelheid kippenei-wit, die voor een voldoende „verzadiging" van de onderscheidene sera noodig zijn.

Nadat deze sera in verzadigden toestand gedurende een dag in de ijskast bewaard zijn, worden de neerslagen verwijderd door filtratie door steriel filtreerpapier.

d. Toepassing der specifieke verzadiging ten aanzien van dooier.

Zooals vroegere proefnemingen hebben uitgewezen, is na deze verzadiging met natief kippenei-wit de verwantschapsreactie met kippendooier volledig blijven bestaan, hetgeen volkomen overeenstemt met het feit, dat ei-wit en dooier van dezelfde „eisoort" immunologisch niet verwant zijn. Verzadiging der reeds eenmaal verzadigde sera met kippendooier blijkt dus nog noodzakelijk te zijn.

In verband met de zeer sterke verwantschapsreactie, die bijna even sterk is als de homologe, mag verwacht worden, dat een vrij sterke verzadiging met kippendooier noodig zal blijken te zijn.

Overeenkomstig deze overweging worden verzadigingsproeven met telkens 1 cc serum ingezet, waarbij vrij sterk geconcentreerde kippendooieroplossing wordt toegevoegd. Deze proefverzadigingen worden onderzocht minstens 24 uur, nadat ze ingezet zijn.

Door centrifugeering worden de uitslingerbare vlokjes praecipitaat verwijderd. Zoonoodig worden, wanneer de verhouding van het soortelijk gewicht van het praecipitaat tot dat van het serum uitslingering niet toelaat, de zwevende of drijvende vlokjes afgefiltreerd.

In verband met het feit, dat een dooieroplossing pas voldoende helder is in een verdunning van 1 op 1000, worden de verzadigde sera met behulp van deze oplossing gecontroleerd. De dooieroplossing

wordt bereid door een oplossing 1 op 100 verdund, welke gecentrifugeerd werd, tienvoudig te verdunnen.

De tabellen 8 en 9 geven een overzicht van deze verzadigingsproeven en de contrôle daarop.

TABEL 8.

Toegevoegde dooieroplossing

Verdunning		K.D.natief 1 : 8			K.D.natief 1 : 1½		
Hoeveelheid in cc's		0.025	0.05	0.1	0.025	0.05	0.1
Overeenkomend met een hoeveelheid onverdunde kippendooier in mm³'s		3.125	6.25	12.5	16.5	33	66
		Nummers van de aldus bereide sera					
Telkens 1 cc eendenei-antiserum van de nevenstaande nummers	62	62*a*	62*b*	62*c*	62*d*	62*e*	62*f*
	63	63*a*	63*b*	63*c*	63*d*	63*e*	63*f*
	64	64*a*	64*b*	64*c*	64*d*	64*e*	64*f*
	73	73*a*	73*b*	73*c*	73*d*	73*e*	73*f*
	74	74*a*	74*b*	74*c*	74*d*	74*e*	74*f*

Zooals tabel 9 laat zien is de juiste hoeveelheid kippendooier toegevoegd in de proefverzadigingen 62_e, 63_b, 64_c en 74_e.

Serum 73 vertoont in tabel 9 nog geen voldoende verzadiging, zoodat met nog grootere hoeveelheid dooier getracht werd het gewenschte resultaat te bereiken. Deze pogingen hebben niet tot succes geleid, doordat reeds zichtbare troebeling van het serum optrad, zonder dat de verwantschapsreactie geëlimineerd was.

Voor de verzadiging met *kippendooier* zijn dus noodig:

voor serum 74 (buisje e), 33 mm³ per cc eendenei-antiserum,
„ „ 62 (buisje e), 33 mm³ „ „ „ „ ,
„ „ 64 (buisje c), 12.5 mm³ „ „ „ „ ,
„ „ 63 (buisje b), 6.25 mm³ „ „ „ „ ,

terwijl bij serum 73 blijkt, dat zelfs 66 mm³ nog niet afdoende is om de verwantschapsreactie van dit serum op te heffen.

TABEL 9.

Sera volgens tabel 8 bereid uit eendenei-antisera No.	Tijd van aflezing en uitslag der praecipitatiereacties met als antigeen een 1/1000 verdunde kippendooier-oplossing					
	a	b	c	d	e	f
62	3 m +	4 m +	10 m +	15 m +	45 m —	45 m —
63	25 m +	45 m —	45 m —	45 m —	30 m +	45 m +
64	2 m +	10 m +	45 m —	45 m —	35 m +	45 m —
73	2 m +	3 m +	3 m +	4 m +	4 m +	15 m +
74	2 m +	3 m +	20 m +	34 m +	45 m —	45 m —

De geheele voorraad van deze sera wordt dienovereenkomstig verzadigd, met in achtneming van de meest gewenschte concentratie, die telkens uit tabel 8 kan worden afgelezen.

Het gevormde praecipitaat wordt den volgenden dag verwijderd door filtreeren door steriel filtreerpapier.

Door de dubbele verzadiging van deze sera is de carbolconcentratie eenigszins verlaagd, zoodat toevoeging van een kleine hoeveelheid daarvan het percentage weer op 0.1% terugbrengt.

In de reeks proefverzadigingen der sera 63 en 64 doet zich een zeer merkwaardig verschijnsel voor, namelijk, nadat tengevolge van de toevoeging van een zekere hoeveelheid verwant antigeen de verwantschapsrseactie verdwenen is, treedt deze reactie, hoewel zwak en onscherp, weer op in sera, waaraan een nog grootere hoeveelheid verwant antigeen was toegevoegd (zie de reacties in tabel 9 van 63_e, 63_f en 64_e). Bij toevoeging van nog grootere hoeveelheid kan ook deze reactie weer verdwijnen (zie de uitslag der reactie van 64_f).

Ons inziens moet dit verschijnsel verklaard worden met behulp van de leer der optimale verhoudingen van Dean en Webb [89]).

Antigeen en antilichaam moeten namelijk in een optimale verhouding met elkaar zijn gemengd, wanneer zoowel antigeen als antilichaam quantitatief gebonden zal zijn. De vorming van een praecipitaat in een mengsel van paardenserum en paardenserumimmuunserum wordt namelijk vertraagd of verhinderd als een van beide stoffen in relatieve overmaat aanwezig is.

Een overeenkomstig verschijnsel had reeds MICHAELIS [90]) opgemerkt; een praecipitaat was oplosbaar in overmaat praecipitabele stof.

DEAN [91]) is van meening, dat antigeen en antilichamen naast

elkaar in den bloedstroom van het proefdier aanwezig kunnen zijn, zonder dat er een praecipitaat gevormd wordt, hetgeen toegeschreven wordt aan het feit, dat zij niet in optimale verhouding van beider hoeveelheid voorhanden zijn. De zooevengenoemde onderzoekers merkten de beschreven verschijnselen op bij menging van antilichamen met het homologe antigeen.

Ons inziens zijn de reacties tusschen de verwantschapspraecipitine en de verwante antigenen aan overeenkomstige wetmatigheden gebonden. In het grensvlak tusschen de antisera 63_e, 63_f en 64_e en de betreffende verwante antigeenoplossing schijnt een zoodanige verschuiving in de concentratie van beide op te treden, dat de optimale verhouding meer benaderd wordt, zoodat de vorming van een zichtbaar praecipitaat optreedt.

Dergelijke zichtbaar oververzadigde sera geven ook herhaaldelijk een positieve reactie met physiologische keukenzoutoplossing.

De aflezing van dergelijke reacties, die ingezet worden met sera, die door toevoeging van een relatief groote hoeveelheid kippendooier oververzadigd zijn, is echter verre van gemakkelijk, doordat dergelijke sera meer of minder troebel zijn.

Par. 5. Uiteindelijke titer- en specifiteitsbepaling.

Na deze vrij uitgebreide bewerking, die veel geduld en accuratesse van den onderzoeker vraagt, rest nog de bepaling der meer of minder groote bruikbaarheid der sera. Ten behoeve daarvan worden op de reeds eerder beschreven wijze oplossingen gemaakt van ei-wit en dooier, zoowel uit een eenden- als uit een kippenei. Verzadigde sera worden voor het gebruik steeds gecentrifugeerd. De sera worden niet alleen beproefd met deze oplossingen, doch tevens met de voor verdunning gebruikte physiologische keukenzoutoplossing.

De oplossingen worden tevens onderzocht met een konijnenserum No. 29 van een dier, dat met geen enkel eiwit was ingespoten (physiologisch konijnenserum).

Tabel 10 geeft een overzicht van deze bepalingen.

Het blijkt uit deze tabel overduidelijk, dat de sera No. 62, 63, 64 en 74 met eendenei-wit een specifieke reactie vertoonen tot aan een verdunning dezer stof (titer) van 1 op 10^4, welke sterkte zij ook voor eendendooier bezitten.

Bij vergelijking van tabel 1 (blz. 41), die de eigenschappen der „onverzadigde" sera toont en tabel 10 in welke dezelfde sera in „verzadigden toestand" met dezelfde antigenen in dezelfde verdunningen

TABEL 10.

Definitieve titer- en specifiteitsbepaling van „natief" eendenei antisera.

	Verdunning der antigeenoplossing	Onderzocht antigeen	Nummers der sera				
			62	63	64	74	29 [1])
			Tijd van aflezing en uitslag der praecipitatiereactie				
I Eiwitoplossingen	1/100	*E*.W.natief	2 m +	2 m +	2 m +	2 m +	45 m —
		K.W.natief	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —
	1/1000	*E*.W.natief	2 m +	15 m +	10 m +	15 m +	45 m —
		K.W.natief	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —
	1/10000	*E*.W.natief	3 m +	15 m +	10 m +	15 m +	45 m —
		K.W.natief	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —
II Dooieroplossingen	1/1000	*E*.D.natief	2 m +	2 m +	2 m +	4 m +	45 m —
		K.D.natief	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —
	1/10000	*E*.D.natief	6 m +	8 m +	10 m +	8 m +	45 m —
		K.D.natief	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —
	Physiol. NaCl opl.		45 m —	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —

[1]) Het serum 29 is afkomstig van een konijn, dat met geen enkel eiwit werd voorbehandeld.

zijn gecontroleerd, valt boven alles het feit op, dat de sera zoodanig specifiek zijn geworden, dat zonder eenigen twijfel in de praktijk eenden- en kippeneibestanddeelen van elkaar kunnen worden onderscheiden.

Dit geldt voor dooier zoowel als voor wit.

Het principe der specifieke verzadiging, toegepast op de wijze, zooals boven omschreven is, blijkt een prachtig hulpmiddel te zijn om de specifiteit van dergelijke ovosera op te voeren. Het stelt ons niet alleen in staat eendenei-wit en kippenei-wit te differentieeren, het schept tevens de mogelijkheid om *eendendooier* en *kippendooier* van elkaar te onderscheiden, hetgeen tot dusverre niet mogelijk werd geacht.

Wel daalt de titer der sera tegen eendenei-wit iets, althans de tijd, die verloopt, voordat een positieve reactie kan worden afgelezen, wordt langer. Hetzelfde, hoewel in iets mindere mate, is het geval met de titer der sera tegenover eendendooier. Dit behoeft ons inziens in geenendeele eenig bezwaar op te leveren.

Par. 6. Bereiding van natief kippenei praecipiteerend serum.

Geheel op dezelfde wijze, waarop in dit hoofdstuk de bereiding van eendeneiantisera werd beschreven, kunnen kippeneiantisera worden bereid door injectie van den verdunden inhoud van kippeneieren bij konijnen. De specifiteit van deze sera blijkt na de winning ook niet voldoende te zijn om hiermede kippen- van eendeneibestanddeelen te onderscheiden.

Door verzadiging toe te passen met eendenei-wit en eendendooier verkrijgen deze sera de noodige specifiteit.

De juiste hoeveelheden ei-wit en dooier, die moeten worden toegevoegd, worden weer door proefverzadigingen bepaald. Voor nadere gegevens omtrent de techniek dezer proeven zie men de bewerking der eendeneiantisera.

Par. 7. Enkele critische beschouwingen over de bereidingswijze der sera.

Bij het onderzoek der proefbloedingen tijdens de serumbereiding blijkt, dat het serum over het algemeen eerder voldoend hooge titer bereikt heeft tegenover eendendooier dan tegenover eendenei-wit. Ook uit tabel 1 valt af te lezen, dat de reacties sneller ontstaan met dooier dan met wit. Toch is tijdens de immunisatie een grootere hoeveelheid eendenei-wit ingespoten dan eendendooier. Hieruit volgt, dat de antigeen-werkzaamheid van natieve dooier sterker is dan van natief ei-wit.

Dit heeft tot gevolg, dat af en toe konijnen nog een keer ingespoten moeten worden om de titer tegen wit voldoende op te drijven, terwijl de titer van het serum tegen dooier reeds voldoende hoog kon worden geacht. Over het algemeen wordt de voorkeur gegeven aan winning der praecipiteerende sera, zoodra de titer daarvan hoog genoeg is.

Door wijziging der verhouding in de hoeveelheden van de beide antigenen, die geinjiceerd worden, moet het ons inziens mogelijk zijn ongeveer gelijktijdig voldoende titerhoogte te bereiken zoowel tegen wit als tegen dooier. De hoeveelheid wit dient dan in verhouding tot de hoeveelheid dooier verhoogd te worden.

Verder zou het overweging kunnen verdienen de konijnen te immuniseeren met kleinere hoeveelheden antigeen. Verscheidene onderzoekers wijzen er namelijk op, dat de sterkte der *verwantschapsreactie* toeneemt met grootere antigeeninjectie.

Hoewel met de specifieke verzadiging een zeer opmerkelijke specifiteitsverbetering kan worden verkregen, dient ons inziens toch gestreefd te worden naar maximale specifiteit. Het volgende moge deze opvatting nader toelichten.

Ei-wit zoowel als dooier bevatten ieder een aantal langs physisch-chemischen weg te scheiden eiwit-fracties.

ASCOLI [64]) heeft voor de eiwitfracties uit bloedserum aangetoond, dat bij inspuiting tegenover ieder daarvan praecipitine gevormd wordt.

UMBER [29]) scheidde albumine en globuline uit ei-wit af en was met behulp van deze fracties in staat praecipiteerende sera te winnen zoowel tegen albumine als tegen globuline.

MYERS [24-25]) toonde evenals ASCOLI het bestaan van verwantschapsreacties aan van een globulineantiserum met globuline van een verwante diersoort.

Evenzoo kwamen LEWIS en WELLS [20]) tot de slotsom, dat er immunologische verwantschap bestaat tusschen mucoid uit verschillende vogeleieren.

HOOKER en BOYD [45]) bereidden praecipiteerende sera door injectie van eenden- en kippeneialbumine. Beide sera bleken gelijke reacties te geven met eenden- en kippeneialbumine. Door echter specifieke verzadiging toe te passen werd specifiteit bereikt. De homologe titer bleef geheel behouden, hetgeen bovendien gecontroleerd werd met behulp van de methode der optimale proporties van DEAN.

Waarschijnlijk moet dus worden aangenomen, dat tegen de afzonderlijke fracties, die in ei-wit zoowel als in dooier voorkomen, praecipitine wordt gevormd, evenals verwantschapspraecipitine.

De homologe titer van een serum tegen deze afzonderlijke fracties behoeft echter allerminst recht evenredig te zijn met de verhouding der hoeveelheden van elke fractie, die geinjiceerd werden. Nog onwaarschijnlijker wordt het aan te nemen, dat de sterkte der verwantschapsreacties tegen de afzonderlijke verwante fracties recht evenredig zou zijn met de quantiteit der afzonderlijke fracties, die in verwant eiwit voorkomen.

Redelijkerwijs mag dus worden aangenomen, dat toevoeging bij het serum van een zekere hoeveelheid verwante eibestanddeelen — dus een verzameling der fracties in natuurlijk voorkomende verhouding —

verzadiging veroorzaakt tegenover één enkele fractie, terwijl de verwantschapsreactie tegenover *andere* fracties nog niet volledig verdwenen is. Om deze laatste rest van verwantschapsreactie op te heffen, moet men echter opnieuw alle fracties toevoegen, zoodat die fractie, welke reeds volledige verzadiging bewerkstelligd had, in overmaat wordt toegevoegd.

Zooals ons gebleken is, wordt niet alleen door toevoeging aan een serum van een aanmerkelijke overmaat verwant antigeen de helderheid daarvan minder (dooier), maar tevens introduceert men een aantal verschijnselen, die de bruikbaarheid sterk vermindert, zoo niet geheel opheft. Zelfs kan hierdoor de homologe titer geheel verdwijnen of de specifiteit totaal opgeheven worden.

Ook komt het voor, dat opnieuw eenige „verwantschapsreactie" optreedt, die door toevoeging van nog grootere hoeveelheid verwant antigeen niet meer op te heffen is. In dit laatste geval reageeren de sera eveneens veelvuldig met physiologische keukenzoutoplossing.

Om de overmaat verwant antigeen, die volgens deze opvatting bij de verzadiging steeds wordt toegevoegd zooveel mogelijk te beperken, is het derhalve noodig, dat de verwantschapsreactie zoo zwak mogelijk zij.

Zooals reeds eerder werd opgemerkt kan een verkleining der antigeendosis tijdens de immunisatie daartoe bijdragen.

Toch wordt ook hier weer een limiet gesteld. Wij wenschen namelijk, dat de titer der sera na de verzadiging voldoende hoog is.

Door de specifieke verzadiging treedt steeds eenige titerverlaging op, zoodat de sera in onverzadigden toestand dus een hooge titer dienen te bezitten.

Om dit te bereiken mag de doseering der antigeenhoeveelheid tijdens de immunisatie dus weer niet te klein zijn.

Hoewel dezerzijds geen definitieve uitspraak kan worden gedaan omtrent de optimale dosis, waarmede konijnen moeten worden geimmuniseerd, meenen wij op grond van onze ervaringen, opgedaan bij het onderzoek van voedings- en genotmiddelen met verzadigde eiantisera, dat de antigeendoseering welke op bladzijde 35 werd aangegeven, vermoedelijk iets moet worden vergroot.

Door de resultaten, verkregen met de op reeds eerder beschreven wijze uitgevoerde specifieke verzadiging, mag het feit bewezen worden geacht, dat de homologe- en verwantschapspraecipitine niet aan eenzelfde globuline-molecule gebonden zijn, doch aan afzonderlijke.

Mag op grond daarvan nu ook geconcludeerd worden, dat afzonder-

lijke immunologisch ongelijke eiwitmoleculen verantwoordelijk zijn voor het ontstaan van homologe en verwantschapspraecipitine?

In dit verband zouden wij willen wijzen op de onderzoekingen van KISTER en WEICHARDT [65]). Zij bereidden praecipiteerende sera door injectie bij konijnen van menschenserum en paardenserum. Deze antisera gaven homologe reactie respectievelijk met menschenserum en paardenserum en verwantschapsreactie respectievelijk met paardenserum en menschenserum.

Eenerzijds konden zij door toevoeging van menschenbloed aan paardenserumpraecipiteerend serum en verwijdering van het gevormde neerslag, de verwantschapspraecipitine uit dit praecipiteerende serum verwijderen, zonder de homologe praecipitine nadeelig te beinvloeden.

Door toevoeging van paardenserumpraecipiteerend serum aan menschenserum en verwijdering van het gevormde neerslag, verkregen deze onderzoekers anderzijds een menschenserumoplossing, die geen reactie meer gaf met paardenserumpraecipiteerend serum.

Deze oplossing gaf echter een onverzwakte reactie met menschenserumpraecipiteerend serum.

Die praecipitogene eiwitfractie uit menschenserum, die in vitro reageert met de verwantschapspraecipitine aanwezig in paardenserumpraecipiteerend serum, kon dus daaruit verwijderd worden.

De vraag, welke hier gesteld kan worden is deze: onder invloed van welk proteine uit paardenserum is deze verwantschapspraecipitine in het konijn ontstaan? Wij zouden geneigd zijn te veronderstellen, dat dit proteine immunologisch identiek is met een fractie voorkomend in menschenserum, welke laatste fractie met de verwantschapspraecipitine uit paardenserumpraecipiteerend serum neerslaat.

Met andere woorden: in menschenserum en paardenserum zou een in immunologisch opzicht gelijke eiwitfractie moeten voorkomen, die verantwoordelijk gesteld moet worden voor het ontstaan van verwantschapspraecipitine in vivo en voor het ontstaan van de verwantschapsreactie in vitro.

Deze eiwitfractie kon volgens de onderzoekingen van K. en W. uit menschenserum verwijderd worden.

Evenzoo kon door toevoeging van menschenserumpraecipiteerend serum aan paardenserum een eiwitfractie uit paardenserum neergeslagen worden, die in vitro reageerde met de verwantschapspraecipitine voorkomende in menschenserumantiserum.

Zonder twijfel moet bij deze verzadiging voldaan worden aan de leer der optimale verhoudingen van Dean en Webb.

Wanneer wij de samenstelling nagaan van een menschenserum-

oplossing, waaraan paardenserumpraecipiteerend serum in optimale verhouding is toegevoegd, dan blijkt, dat deze vloeistof bevat: 1e. konijneneiwit, 2e. homologe praecipitine tegen paardenserum, 3e. verwantschapspraecipitine tegen menschenserum en 4e. menschenserum.

Tengevolge van de menging zijn quantitatief neergeslagen de bovengenoemde verwantschapspraecipitine (No. 3) en die fractie uit menschenserum, die reageert met dit verwantschapspraecipitine.

Door filtreering, eventueel centrifugeering, kunnen deze twee substanties uit de oplossing verwijderd worden, zoodat in oplossing overblijven 1e. konijneneiwit, 2e. homologe praecipitine tegen paardenserum en 3e. menschenserum minus bovenbedoelde fractie.

Bij injectie van deze vloeistof in het konijn heeft het aanwezige konijneneiwit in immunologisch opzicht niet de minste gevolgen (UHLENHUTH), evenmin als de homologe praecipitine tegen paardenserum (BERTARELLI [69]).

Immunologisch heeft alleen de injectie van het gezuiverde menschenserum de vorming van praecipitine tengevolge.

Dit, ons inziens zeer interessante experiment, zou kunnen leiden tot een geheel nieuwe methode tot het verkrijgen van volledig specifieke praecipiteerende sera, waarbij de vorming van verwantschapspraecipitine wordt voorkomen.

Wij willen deze beschouwingen echter niet beëindigen zonder er nadrukkelijk op te wijzen, dat immunologische experimenten, waarvan op louter theoretische gronden zekere verwachtingen gekoesterd worden, veelal niet daaraan blijken te beantwoorden.

Nochtans lijken deze proeven ons volkomen verantwoord.

Wij waren echter niet in de gelegenheid ons onderwerp in deze richting volledig experimenteel uit te werken en moeten dus met bovenstaande beschouwingen volstaan, ten bewijze dat ook deze zijde van het vraagstuk onze aandacht had.

HOOFDSTUK IV.

TOEPASSING DER SERA IN DE PRAKTIJK.

Par. 1. Voedings- en genotmiddelen, die met deze sera onderzocht kunnen worden op aanwezigheid van eenden- en kippeneibestanddeelen.

In Hoofdstuk III is aangetoond, dat het met behulp van praecipitine houdende sera en onder toepassing van de verzadigingsmethode, met absolute zekerheid mogelijk is van elk ter onderzoek aangeboden ei-wit of dooier of zelfs van „geheel ei" uit te maken of men met bestanddeelen van een kippen- dan wel van een eendenei te doen heeft, vooropgesteld, dat de aanbieder ook zijn keuze tot deze eisoorten beperkt. Zou het er dus in de praktijk uitsluitend om gaan de soort te bepalen van zulke eibestanddeelen, dan zou de beschreven methode als afdoende kunnen worden beschouwd. Bij het onderzoek van „bevroren eieren", die geen verhitting respectievelijk vermenging met andere stoffen hebben ondergaan, zou men haar dus eveneens kunnen toepassen.

De moeilijkheid is nu echter, dat in de praktijk van het levensmiddelenonderzoek de hier genoemde enkelvoudige en niet vermengde vorm van eieren weinig voorkomt. De voedingsmiddelen, waarvan in de praktijk de vraag gesteld wordt of zij al dan niet onder toevoeging van eendeneibestanddeelen werden vervaardigd, zijn van geheel anderen aard; het zijn in de eerste plaats „gedroogd ei-wit", „gedroogde dooier" en „gedroogd geheel ei". Hierbij heeft dus geen vermenging met andere stoffen plaats, maar bij het drogen zal allicht verwarming tot verschillende hooge temperaturen en gedurende verschillend langen tijd worden toegepast.

De vraag zal dus onderzocht moeten worden in hoeverre de hiervoor beschreven sera — die met „natief" geheel ei werden bereid — ook bruikbaar zijn voor de determinatie der bestanddeelen van bedoelde gedroogde eiprodukten.

Maar tevens komen voor dit onderzoek in aanmerking consumptieijs, advocaat en verschillende soorten gebak (cake). Bij beide eerstgenoemde „genotmiddelen" heeft niet alleen menging met tal van

andere stoffen plaats, maar volgt ook een zekere mate van verwarming van het mengsel. Dit is eveneens het geval bij de bereiding van gebaksoorten (cake). Men kan dit onderzoek beperken tot die soorten gebak, waarvan men aanneemt, dat de verwarming bij het bakken een zekere grens (althans in het inwendige) niet overschrijdt (zacht gebak). Bij de harde gebaksoorten en beschuit neemt men aan, dat de verwarming ook tot in het inwendige zoo hoog geweest is, dat eventueel aanwezige ziektekiemen (Salmonella's) wel zijn gedood, zoodat het uit dien hoofde onverschillig is of de waar met bestanddeelen van kippen- dan wel van eendeneieren wordt bereid.

Om de doelmatigheid van onze sera te beoordeelen moeten wij dus ook voor de genoemde drie waren nagaan in hoeverre determinatie van de gebruikte eibestanddeelen mogelijk is.

Voor alle vier genoemde groepen van voedingsmiddelen, te weten gedroogde eiprodukten, consumptieijs, advocaat en gebak zal tevens nagegaan moeten worden in hoeverre het gebruik van mengsels van bestanddeelen dezer beide eisoorten van invloed is op het welslagen van de proef. Met andere woorden; welk percentage toevoeging van eendeneibestanddeelen aan de gebruikte kippeneimassa is nog door de serologische reactie aantoonbaar?

Uit het bovenstaande blijkt wel, welk een groot veld van voorbereidenden arbeid nog bewerkt moest worden alvorens over de bruikbaarheid der methode bij de praktische contrôle op levensmiddelen een uitspraak gedaan kon worden.

De grenzen der bruikbaarheid van het natief-serum voor elk der genoemde soorten van levensmiddelen zullen wij in de volgende onderdeelen van dit hoofdstuk trachten te bepalen.

Par. 2. Orienteerend onderzoek van eiprodukten uit den handel.

Bij de bereiding van eet- en drinkwaren worden hier te lande niet alleen inlandsche eibestanddeelen, doch tevens een aanzienlijke hoeveelheid uit China ingevoerde, door bevriezing of op andere wijze geconserveerde eibestanddeelen, verbruikt.

Volgens mededeeling van het „Centraal Bureau voor de Statistiek" te 's-Gravenhage werden de laatste jaren de volgende hoeveelheden eibestanddeelen uit China ingevoerd.

Geconserveerde eiprodukten worden in hoofdzaak gebezigd in bakkerijen, consumptieijsbedrijven en sommige advocaatfabrieken.

Bevroren eieren uit de schaal, — eigeel en — eiwit	Bruto gewicht in K.G.	Waarde in gld.
Jaar 1934	162667	50063
„ 1935	61452	15329
„ 1936	3640	1582
„ 1937	46504	19086
„ 1938	32239	18843
Jan. Maart 1939	13381	8338
Ander eigeel en eiwit		
Jaar 1934	743322	331902
„ 1935	723394	366780
„ 1936	621640	347517
„ 1937	560331	407067
„ 1938	413296	439052
Jan. Maart 1939	98882	90713

Voor een deel worden deze eibestanddeelen voldoende verhit, voordat ze genuttigd worden, zoodat het gevaar voor het optreden van een Salmonella-infectie bij den consument uitgesloten mag worden geacht. Dit is onder anderen het geval met beschuit en ander hard en bruin gebak.

Voor een ander deel echter worden deze eiprodukten genuttigd zonder aan eenige verhitting onderworpen te zijn geweest, zooals in schuimgebak, dat steeds natieve eibestanddeelen bevat.

Daarnaast wordt een groot gedeelte van deze produkten verbruikt in voedings- of genotmiddelen, waarin ze weliswaar aan een zekere verhitting blootgesteld worden, maar waarvan niet met zekerheid kan worden gezegd, dat de verhitting hoog genoeg geweest is, eventueel voldoende lang heeft kunnen inwerken, om het optreden eener Salmonella-infectie te kunnen uitsluiten. Hierbij moet gedacht worden aan advocaat, zachte cake, consumptieijs, taartvullingen en dergelijke.

Hoewel ons geen gegevens bekend zijn omtrent het voorkomen van Salmonella-infecties bij eenden in China, dienen ons inziens Chineesche eendeneibestanddeelen zekerheidshalve in eenzelfde gevarenklasse te worden ondergebracht als Nederlandsche eendeneibestanddeelen.

Daarbij komt nog, dat Chineesche eibestanddeelen niet steeds een laag kiemgehalte bezitten. Integendeel, volgens DE BORD [125]) bedraagt het aantal levensvatbare kiemen in gedroogd Chineesch eipoeder van 350 — 2400.000 per gram. Deze kiemen kunnen van min of meer onschuldigen aard zijn, doch wanneer de eieren, waarvan deze produkten gemaakt werden, geheel of ten deele afkomstig zouden zijn van eenden, die aan Salmonellose leden, zouden onder deze kiemen ook Salmonella's kunnen voorkomen.

Omtrent het voorkomen van eendeneibestanddeelen in Chineesche eiprodukten, hetzij deze als kippen- dan wel als eendeneibestanddeelen worden verkocht, ontbraken tot op heden alle gegevens.

Bovenstaande overwegingen, alsmede de inhoud van artikel 3*bis* van het Algemeen Besluit Warenwet, waren aanleiding om een aantal in den handel voorkomende partijen *gedroogde of met boorzuur geconserveerde vloeibare Chineesche eiprodukten* te onderzoeken.

Dit voorloopig onderzoek had tot resultaat, dat *van de* 57 *onderzochte monsters* 29 *in meerdere of mindere mate eendeneibestanddeelen bleken te bevatten*, zonder dat zulks uit den naam, waarmede de waar werd aangeduid, was op te maken.

Een *drietal* dezer partijen werd verkocht als te zijn bereid uit *kippeneieren* en bleek te bestaan *uit eendeneibestanddeelen*.

Een negental werd verkocht als zijnde bereid uit *kippeneieren*, doch was *in geringe mate gemengd met eendeneibestanddeelen*.

Een *dertiental*, van welke de *samenstelling niet werd vermeld*, bestond *geheel of voor een belangrijk deel uit eendeneibestanddeelen*.

Een *viertal*, van welke de samenstelling *niet werd vermeld*, bleek uit kippeneibestanddeelen, vermengd met *een gering percentage eendeneibestanddeelen*, te bestaan.

Bij dit onderzoek kwam tevens aan het licht, dat het noodig is een goed gemiddelde der partijen te onderzoeken. Om dit met zekerheid te bereiken, dient minstens 5 gram gedroogd ei opgelost en onderzocht te worden.

Door dit voorloopig onderzoek kwam vast te staan, dat het ongetwijfeld noodig is, de in den handel voorkomende vloeibare en gedroogde Chineesche eiprodukten, op aanwezigheid van eendeneibestanddeelen te controleeren.

Par. 3. Bepaling van de betrouwbaarheid der methode.

Om het kleinste percentage *natieve* eendeneibestanddeelen, dat nog in *natieve* kippeneibestanddeelen kan worden aangetoond, te bepalen,

werden enkele experimenten verricht. Hierbij bleek, dat het met behulp van de eerder beschreven *„natieve" eendeneiantisera* mogelijk is een bijmenging van 1% *eendenei-wit* aan kippenei-wit en een bijmenging van 10% *eendendooier* aan kippendooier aan te toonen.

Evenzoo slaagden wij er in met *„natieve" kippeneiantisera* een bijmenging van 1% *kippenei-wit* aan eendenei-wit en van 10% *kippendooier* aan eendendooier vast te stellen. Voegden wij aan kippenei-wit minder dan 1% eendenei-wit toe of aan kippendooier minder dan 10% eendendooier, dan konden wij bij onderzoek met de ons ter beschikking staande sera binnen den gestelden waarnemingstijd geen neerslag meer opmerken. Wij moeten dus besluiten, dat de „gevoeligheid" der reactie door deze cijfers wordt weergegeven.

Hetzelfde resultaat bleek slechts ten deele bereikbaar, wanneer de eibestanddeelen in gedroogden toestand ter onderzoek kwamen en door toevoeging van gedestilleerd water, eventueel physiologische keukenzoutoplossing, weer in oplossing waren gebracht.

Door het drogen waren de „natieve eigenschappen" van *ei-wit* in 't geheel niet teruggegaan. De „natieve eigenschappen" van *dooier* daarentegen verminderden tijdens het drogen en wel meer, naarmate de temperatuur tijdens het drogen hooger en de tijd, die noodig was om de dooiermassa te drogen, langer was geweest.

Het bleek dus in de eerste plaats noodig een nader onderzoek in te stellen naar den invloed van temperatuur en duur der verwarming, diebij het drogen worden gebezigd, op de mogelijkheid om met behulp van *„natieve sera"* monsters ei, hetzij als „kippenei", dan wel als „eendenei" te onderkennen. Niet alleen „zuivere" monsters van één soort, maar ook mengsels van beide dienden in dit onderzoek te worden betrokken.

Aan verschillende Directeuren van Keuringsdiensten en van andere laboratoria werd verzocht een aantal door hen zelf gedroogde monsters ei-wit en dooier in te zenden. Overeengekomen werd niet alleen zuivere eenden- en kippeneibestanddeelen in te zenden, maar ook mengsels van beide.

Deze monsters kwamen ter onderzoek, terwijl noch omtrent de samenstelling, noch omtrent de temperatuur, waarbij werd gedroogd of omtrent den duur der droging, ons mededeelingen waren verstrekt.

Pas nadat de inzenders het resultaat van het onderzoek hadden ontvangen, werden ons de in de tabellen 11A tot 11D genoemde percentages eenden- en kippenei-wit en verdere gegevens over het drogen bekend gemaakt.

De monsters werden niet alleen onderzocht met sera, die eendenei-wit zoowel als eendendooier aantoonbaar maken, maar ook met „natieve"

kippeneiantisera. Deze sera waren op overeenkomstige wijze bereid en verzadigd als de „natieve" eendeneiantisera.

a. Onderzoek van voor dit doel gedroogde monsters ei-wit.

Teneinde het gedroogde ei-wit wederom in oplossing te brengen, werd ½ gram droog ei-wit gemengd met 3½ cc gedestilleerd water en 36 cc physiologische keukenzoutoplossing.

Extractie vond plaats gedurende 18 tot 24 uur.

Door daarna deze vloeistof nogmaals 1 op 10 te verdunnen, ontstond een oplossing, waarvan de eiconcentratie overeenkwam met die van een 1 op 100 verdunde oplossing van versch ei-wit in physiologische keukenzoutsolutie.

De oplossing, die na filtratie door steriel papier geschikt voor het onderzoek was, werd onderzocht met de sera 52 en 60, die natieve kippeneibestanddeelen en met de sera 62 en 64, die natieve eendeneibestanddeelen aantoonbaar maken.

Alle vloeistoffen werden eveneens gecontroleerd met een physiologisch konijnenserum 29.

Alle sera werden vóór het onderzoek gecentrifugeerd.

De resultaten van deze onderzoekingen werden neergelegd in de tabellen 11A, B en C.

TABEL 11 A.

Onderzoek van onvermengd gedroogd ei-wit

Kippen-eiwit					Eendenei-wit				
Monster no.	Temperatuur en duur van het drogen	Aantal minuten, waarna **neerslag** werd opgemerkt bij reactie met: kippen-serum 60	kippen-serum 52	Na 45 minuten werd geen neerslag opgemerkt bij reactie met de „eendensera" 62 en 64.	Monster no.	Temperatuur en duur van het drogen	Aantal minuten, waarna **neerslag** werd opgemerkt bij reactie met: eenden-serum 62	eenden-serum 64	Na 45 minuten werd geen neerslag opgemerkt bij reactie met de „kippen-sera" 60 en 52.
35	30°C.	3	5		53	30°C., 3 dg.	5	10	
38	30°C.	3	10		43	46°C., 4-5 dg.	5	10	
49	30°C., 3 dg.	5	15		33	50°C., 2-3 dg.	2	10	
13	45°C.	5	15		10	onbekend	5	5	
44	46°C., 4-5 dg.	3	12						
17	45-50°C.	5	20						
32	50°C., 2-3 dg.	5	15						
3	onbekend	5	15						
4	onbekend	5	15						
42	onbekend	3	30						

Bij het onderzoek van gedroogd onvermengd kippen- en eendenei-wit werden de volgende resultaten geboekt: zie tabel 11A.

Uit deze tabel blijkt, dat de specifiteit der reactie bij het onderzoek van onvermengde ei-witten niets te wenschen overlaat, zelfs wanneer verwarming tot 50° C. werd toegepast. Zulks geldt volledig voor de sera 60, 72 en 64.

Serum 52 blijkt niet die mate van gevoeligheid te bezitten, maar is toch voldoende bruikbaar.

Het behoeft nu geen verwondering te wekken, dat bij onderzoek van monsters gemengde ei-witten, die uit gelijke hoeveelheden van beide ei-witten bestaan of waarin een tiental of meer percenten van een van beide soorten aanwezig is, de reactie ondanks de verwarming tijdens het drogen met even goed resultaat wordt bekroond. Ten bewijze van het bovenstaande vermelden wij de resultaten van het onderzoek van de volgende monsters; zie tabel 11B.

TABEL 11 B.

Monster no.	Kippen-ei-wit %	Eenden-ei-wit %	Temperatuur en duur van het drogen	Aantal minuten, waarna neerslag werd opgemerkt bij reactie met:			
				kippen-serum 60	kippen-serum 52	eenden-serum 62	eenden-serum 64
51	50	50	30°C., 3 dg.	5	10	10	15
40	50	50	onbekend	10	15	3	15
25	71	29	35°C.	3	15	3	15
28	76,2	23,8	50°C.	3	7	3	7
26	79	21	35°C.	3	25	3	12
41	80	20	onbekend	3	25	3	15
29	82,6	17,4	50°C.	3	12	2	12
20	90	10	45-50°C.	4	20	4	15
21	90	10	60-67°C.	4	15	3	10
48	90	10	onbekend	3	20	3	15
47	90,1	9,9	46°C., 4-5 dg.	3	13	4	13
23	91	9	35°C.	3	15	3	15
9	31,4	68,6	onbekend	3	5	3	10

Maar nog belangwekkender wordt de uitslag, wanneer ongeveer 5 of slechts enkele percenten ei-wit van de eene soort onder de andere zijn gemengd. Wij noteerden van deze categorie de volgende monsters; zie tabel 11 C.

TABEL 11 C.

Monster no.	Kippen-ei-wit %	Eenden-ei-wit %	Temperatuur en duur van het drogen	Aantal minuten, waarna neerslag werd opgemerkt bij reactie met:			
				kippen-serum 60	kippen-serum 52	eenden-serum 62	eenden-serum 64
27	94,5	5,5	50°C.	3	10	5	20
46	94,9	5,1	46°C., 4-5 dg.	3	15	6	8
19	95	5	45-50°C.	4	25	4	8
1	95	5	onbekend	5	15	5	15
37	96	4	50°C.	3	6	3	6
22	97	3	35°C.	3	10	10	20
8	97	3	onbekend	5	5	5	10
30	97,5	2,5	50°C.	3	15	6	20
36	98	2	30°C.	4	15	6	15
15	98	2	45°C.	5	15	10	20
18	98	2	45-50°C.	4	10	7	10
16	98	2	50-70°C.	7	15	7	15
5	98	2	onbekend	5	20	10	15
7	98	2	onbekend	3	5	5	15
39	98	2	onbekend	4	20	8	20
24	98,6	1,4	35°C.	3	10	5	20
31	98,6	1,4	50°C.	3	15	12	20
45	98,8	1,2	46°C., 4-5 dg.	3	20	15	25
34	99	1	30°C.	3	6	6	15
50	99	1	30°C., 3 dg.	3	10	10	25
11	99	1	45°C.	5	8	15	15
12	99	1	50-70°C.	5	15	15	35
2	99	1	onbekend	5	20	15	20
6	99	1	onbekend	5	10	10	20
52	1	99	30°C., 3 dg.	20	35	5	12
14	99,5	0,5	45°C.	5	12	45 neg.	45 neg.

Uit den laatsten regel van tabel 11 C lezen wij, dat bijmenging van een ½% eendenei-wit in gedroogd kippenei-wit *niet* kan worden aangetoond, wanneer tijdens het drogen de massa tot 45° C. werd verwarmd.

Proeven, die wij namen met een bijmenging van een ½% natief eenden- in kippenei-wit, gaven geen betere resultaten.

TABEL 11 D. Onderzoek van gedroogd ei-wit

Monster						Opgegeven samenstelling
Leeuwarden A	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	95% kippen- en 5% eendenei-wit
Serum	52	60	62	64	29	
Uitslag en tijd	15m+	5m+	5m+	15m+	45m—	
Leeuwarden B	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	99% kippen- en 1% eendenei-wit
Serum	52	60	62	64	29	
Uitslag en tijd	20m+	5m+	15m+	20m+	45m—	
Leeuwarden C	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	100% kippenei-wit
Serum	52	60	62	64	29	
Uitslag en tijd	15m+	5m+	45m—	45m—	45m—	
Leeuwarden D	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	100% kippenei-wit.
Serum	52	60	62	64	29	
Uitslag en tijd	15m+	5m+	45m—	45m—	45m—	
Leeuwarden E	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	98% kippen- en 2% eendenei-wit
Serum	52	60	62	64	29	
Uitslag en tijd	20m+	5m+	10m+	15m+	45m—	
Assen 1	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	99% kippen- en 1% eendenei-wit
Serum	52	60	62	64	29	
Uitslag en tijd	10m+	5m+	10m+	20m+	45m—	

Aangenomen mag worden, dat de aantoonbaarheidsgrens hier is overschreden.

Uit den vóórlaatsten regel van tabel C blijkt echter, dat bijvoeging van 1% kippenei-wit aan gedroogd eendenei-wit nog met vrij groote stelligheid vermoed kan worden.

Echter uit de daarboven staande 7 regels blijkt — hetgeen voor de praktijk van veel belang is — dat bijmenging van 1 tot 1½% eendenei-wit aan gedroogd kippenei-wit in het bijzonder met serum 62 nog zeer duidelijk wordt aangetoond, zelfs wanneer bij het drogen temperaturen van 50 tot 70° C. worden toegepast. (zie monster 12).

Uit het nog niet besproken deel van tabel C blijkt verder, dat menging van 2 tot 5% gedroogd eendenei-wit onder gedroogd kippenei-wit ontwijfelbaar met onze sera, in het bijzonder met serum 62 kan worden opgespoord, zelfs wanneer, zooals in monster 16, bij het drogen een temperatuur van 70° C. werd toegepast.

Als voorbeeld op welke wijze deze onderzoekingen werden genoteerd, geven wij tabel 11 D, terwijl in tabel 11 E de noodzakelijke contrôleproeven zijn neergelegd.

TABEL 11 E.

Contrôles behoorende bij het onderzoek van gedroogd ei-wit

E.W.	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100
Serum	52	60	62	64	29
Uitslag en tijd	45m—	45m—	3m+	6m+	45m—
K.W.	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100
Serum	52	60	62	64	29
Uitslag en tijd	10m+	3m+	45m—	45m—	45m—
Physiologische keukenzout-oplossing	—	—	—	—	—
Serum	52	60	62	64	29
Uitslag en tijd	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—

b. Onderzoek van voor dit doel gedroogde monsters dooier.

Versche dooier bevat ongeveer 48% droge stof. Om dus gedroogde dooier, die zonder twijfel niet geheel watervrij is, wederom op de physiologische concentratie te brengen, is het voldoende daaraan een gelijke hoeveelheid gedestilleerd water toe te voegen.

Waar echter vóór het onderzoek nog een honderdvoudige verdunning met physiologische zoutoplossing plaats vindt, wordt gemakshalve deze relatief geringe hoeveelheid gedestilleerd water vervangen door physiologische zoutoplossing.

Een gram gedroogde dooier wordt in een steriel mortiertje zoo fijn mogelijk gewreven met 19 cc physiologische zoutoplossing. Men laat deze massa gedurende 18—24 uur bij kamertemperatuur extraheeren en wrijft daarna eventueele nog niet uiteengevallen deeltjes gedurende geruimen tijd, zoodat een zoo fijn mogelijke verdeeling der dooier is ontstaan.

Deze vloeistof wordt daarna nog 1 op 10 verdund, zoodat de ei-concentratie overeenkomt met een oplossing van versche dooier 1 op 100 verdund.

Versche dooier werd steeds onderzocht in een concentratie van 1 op 1000. Wanneer we echter gedroogde dooier in eenzelfde concentratie onderzoeken, blijkt, dat de praecipitogeen-eigenschappen van dooier door de droging sterk zijn teruggegaan. Deze teruggang in werkzaamheid bedraagt meer dan 90%. De behoefte treedt hier naar voren om gedroogde dooier in een sterkere concentratie te onderzoeken.

Een 1 op 100 verdunde oplossing is echter over 't algemeen te troebel voor onderzoek.

Daarom werd de volgende klaringsmethode uitgewerkt.

Bij 10 cc van een oplossing van gedroogde dooier, die eerst op physiologische sterkte is gebracht en daarna 1 op 100 werd verdund, wordt 400 mgr infusoriënaarde gevoegd. De massa wordt daarna gedurende korten tijd sterk geschud. Na filtreering door steriel filtreerpapier „Delta" no. 311 verkrijgt men een heldere vloeistof, die geschikt is voor onderzoek.

Hoewel onze sera verzadigd werden tegenover een kippendooier-oplossing 1 op 1000 behoeft geen vrees gekoesterd te worden, dat zich hier ongewenschte verwantschapsreacties zullen voordoen. Een groot aantal contrôleproeven heeft ons zulks aangetoond.

Een aantal monsters gedroogde dooier werd aldus behandeld en onderzocht.

Tabel 12A geeft een overzicht van de resultaten, verkregen bij het onderzoek van onvermengde dooiermonsters.

TABEL 12 A.

Onderzoek van onvermengde gedroogde dooier.

Kippendooier					Eendendooier				
Monster No.	Temperatuur en duur van het drogen	Aantal minuten, waarna *een neerslag* werd opgemerkt bij reactie met: kippenserum 60	kippenserum 52	Na 45 minuten werd *geen neerslag* opgemerkt bij reactie met de „eendensera" 62 en 64.	Monster No.	Temperatuur en duur van het drogen	Aantal minuten, waarna *een neerslag* werd opgemerkt bij reactie met: eendenserum 62	eendenserum 64	Na 45 minuten werd *geen neerslag* opgemerkt bij reactie met de „kippensera" 52 en 60.
18	35°C., 12 uur	2	2		17	40°C.-50°C. 1½ dag	3	3	
26	37°C.	4	4		24	onbekend	7	15	
28	37°C.	4	4						
16	40°C.-50°C.	2	2						
2	onbekend	2	2						
5	„	3	3						
23	„	15	10						

Uit deze tabel valt af te lezen, dat het mogelijk is monsters onvermengde eenden- en kippendooier met zekerheid van elkaar te onderscheiden.

De gebruikte sera stellen ons echter ook in staat mengsels van eenden- en kippendooier te determineeren; iets moeilijker wordt het daarbij om relatief kleine percentages eendendooier in kippendooier als zoodanig te herkennen, wanneer de droging bij te hooge temperatuur of gedurende te langen tijd heeft plaats gevonden. Zie voor deze onderzoekingen tabel 12 B.

Uit de tabel 12 B blijkt, dat het in vele gevallen mogelijk is toevoeging van eendendooier aan kippendooier aan te toonen, ook wanneer slechts 10% van eerstgenoemde stof werd bijgemengd en zelfs wanneer de droging geschiedde door verwarming gedurende 1½ etmaal op 40°—50° C. (zie Tabel 12 B monster 11.)

Dat hierbij toch uitzonderingen mogelijk zijn, bewijst het onderzoek van monster 29 (Tabel 12 B laatste regel). Hier bleef de vorming van het neerslag bij gebruik van „eendenserum" ook na den gebruikelijken tijd van 45 minuten uit.

TABEL 12 B.

Monster no.	Kippendooier %	Eendendooier %	Temperatuur en duur van het drogen	Aantal minuten, waarna *een neerslag* werd opgemerkt bij reactie met:					
				kippenserum 60	kippenserum 52	eendenserum 62	eendenserum 18	eendenserum 64	eendenserum 49
32	20	80	onbekend	15	45		10		10
31	50	50	onbekend	15	45		25		25
20	60	40	35°C. 12 uur	3	3	2		4	
15	61.3	38.7	40°C.-50°C. 1½ dag	5	6	8		15	
14	70	30	40°C.-50°C. 1½ dag	3	5	4		12	
3	70	30	onbekend	6	6	10		20	
22	80	20	35°C. 12 uur	2	2	4		6	
13	80	20	onbekend	15	45		35	20	
4	80	20	onbekend	3	3	6		10	
12	84.4	15.6	40°C.-50°C. 1½ dag	3	3	4		15	
19	85	15	35°C. 12 uur	2	2	6		8	
10	86	14	onbekend	3	3	8		15	
9	87	13	onbekend	3	3	15		30	
8	88	12	onbekend	4	4	25		30	
7	89	11	onbekend	6	4	20		40	
21	90	10	35°C. 12 uur	2	2	8		15	
25	90	10	37°C.	4	4			20	15
27	90	10	37°C.	4	4			20	15
11	89.4	10.6	40°C.-50°C. 1½ dag	3	3	5		15	
1	90	10	onbekend	5	5	10		30	
6	90	10	onbekend	3	3	15		25	
29	90	10	onbekend	12	45		45 neg.		45 neg.

Op grond van een opzettelijk tot dit doel ingesteld onderzoek nemen wij aan, dat bij dit monster een te langdurige droging of een droging bij te hooge temperatuur werd toegepast. Wij worden in deze meening versterkt, omdat de reacties van de monsters 30, 31 en 32, die afkomstig waren van denzelfden inzender en die op dezelfde wijze gedroogd waren, ook pas na langeren tijd ontstonden.

TABEL 12 C. Onderzoek van gedroogde dooier.

Monster						Opgegeven samenstelling
Leeuwarden F	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	90% kippen- en 10% eendendooier
Serum	52	60	62	64	29	
Uitslag en tijd	5m+	5m+	10m+	30m+	45m—	
Leeuwarden G	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	100% kippen-dooier
Serum	52	60	62	64	29	
Uitslag en tijd	2m+	2m+	45m—	45m—	45m—	
Leeuwarden H	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	70% kippen- en 30% eendendooier
Serum	52	60	62	64	29	
Uitslag en tijd	6m+	6m+	10m+	20m+	45m—	
Leeuwarden J	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	80% kippen- en 20% eendendooier
Serum	52	60	62	64	29	
Uitslag en tijd	3m+	3m+	6m+	10m+	45m—	
Leeuwarden K	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	100% kippen-dooier
Serum	52	60	62	64	29	
Uitslag en tijd	3m+	3m+	45m—	45m—	45m—	
Assen 1	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	90% kippen- en 10% eendendooier
Serum	52	60	62	64	29	
Uitslag en tijd	3m+	3m+	15m+	25m+	45m—	

Als voorbeeld van de wijze, waarop de resultaten dezer onderzoekingen volledig werden genoteerd, geven wij hier de tabel 12 C, terwijl in tabel 12 D de uitslagen der contrôleproeven zijn neergelegd.

Hoewel de gedetailleerde gegevens daaromtrent niet in dit proefschrift zijn opgenomen, bleek ons bij een aantal voorbereidende experimenten, dat het eveneens mogelijk was een bijmenging van 10 of meer percenten *kippendooier* aan eendendooier te achterhalen.

Het was, zooals op blz. 71 is vermeld, ons evenzeer uit voorbereidende onderzoekingen gebleken, dat bijmenging van een geringere hoeveelheid eendendooier aan kippendooier dan 10%, in vloeibaren toestand door onze sera ook niet aangetoond kon worden. Het had dus geen zin proeven te nemen met mengsels *gedroogde* dooier, waaraan minder dan 10% dooier was toegevoegd.

TABEL 12 D. Contrôles behoorende bij het onderzoek van gedroogde dooier.

E.D.	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100
Serum	52	60	18	49	62	64	29
Uitslag en tijd	45m—	45m—	4m+	2m+	3m+	3m+	45m—
K.D.	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100
Serum	52	60	18	49	62	64	29
Uitslag en tijd	3m+	3m+	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—
Physiologische keukenzout-oplossing	—	—	—	—	—	—	—
Serum	52	60	18	49	62	64	29
Uitslag en tijd	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—

c. Onderzoek van voor dit doel gedroogde monsters geheel ei.

Door den Keuringsdienst van waren te Enschede werden nog 3 monsters gelijkend op gedroogd geheel ei, dus dooier en wit in gemengden toestand ingezonden. Deze monsters bezaten namelijk de hardheid van gedroogd eiwit en waren evenals gedroogde dooier ondoorzichtig, hoewel minder geprononceerd.

Bij enkele voorbereidende onderzoekingen bleek, dat gedroogd geheel ei evenals gedroogde dooier fijngewreven moet worden, omdat anders niet alle bestanddeelen in oplossing gaan. Een gram gedroogd ei wordt afgewreven met 21 cc physiologische keukenzoutoplossing. Extractie vindt plaats gedurende 18—24 uur. Zoo noodig worden daarna de deeltjes, die niet heelemaal uiteen gevallen zijn, fijngewreven. Deze oplossing wordt daarna nogmaals 1 op 10 verdund en geklaard met infusoriënaarde, zooals nader uiteengezet is bij het dooieronderzoek. Het onderzoek van deze geklaarde oplossingen vond plaats met de natieve kippeneiantisera 52 en 60 en met de natieve eendeneiantisera 62 en 64, alsmede met een physiologisch konijnenserum 29.

Tabel 13 A geeft een overzicht van dit onderzoek.

TABEL 13 A.

Onderzoek van gedroogd geheel ei.

Monster						Opgegeven samenstelling
Enschede 1*b*	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	90% kippenei-wit en 10% eendendooier. Droging gedurende 3 dagen bij 30° C.
Serum	52	60	62	64	29	
Uitslag en tijd	12m+	6m+	6m+	8m+	45m—	
Enschede 2*b*	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	50% kippenei-wit en 50% eendendooier. Droging gedurende 3 dagen bij 30° C.
Serum	52	60	62	64	29	
Uitslag en tijd	20m+	5m+	3m+	3m+	45m—	
Enschede 1*c*	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	90% eendenei-wit en 10% kippendooier Droging bij 30° C. gedurende 3 dagen.
Serum	52	60	62	64	29	
Uitslag en tijd	15m+	10m+	3m+	10m+	45m—	

Uit tabel 13A blijkt, dat het eveneens mogelijk is 10% eendendooier gemengd met kippenei-wit onderling te differentieeren, evenals 10% kippendooier gemengd met eendenei-wit.

TABEL 13 B.

Contrôles bij het onderzoek van gedroogd geheel ei.

E.E.	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100
Serum	52	60	62	64	29
Uitslag en tijd	45m—	45m—	2m+	3m+	45m—
K.E.	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100
Serum	52	60	62	64	29
Uitslag en tijd	3m+	2m+	45m—	45m—	45m—
Physiologische keukenzout-oplossing	—	—	—	—	—
Serum	52	60	62	64	29
Uitslag en tijd	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—

Veel practische beteekenis bezit de mogelijkheid van deze differentiatie echter niet, omdat dergelijke samenstellingen bij monsters gedroogd ei, welke in den handel zijn, wel niet zullen voorkomen.

Wel komen in de praktijk mengsels voor, waarbij een aantal *geheele eendeneieren* gemengd worden met een grooter aantal *geheele kippeneieren* en dan in gedroogden vorm in den handel worden gebracht.

De aantoonbare grens der menging komt te liggen bij ongeveer 2½ % toegevoegd geheel ei, zooals een daartoe ingesteld onderzoek ons leerde.

d. Contrôles.

Bij het onderzoek van de monsters gedroogd eiwit, dooier en geheel ei, kon telkens volstaan worden met enkele eenvoudige contrôles.

Kleine hoeveelheden kippen- en eendenei-wit, kippen- en eendendooier en geheel kippen- en eendenei werden gedroogd bij 37°C. en wederom in oplossing gebracht op dezelfde wijze, als bij het onderzoek der respectievelijke monsters is beschreven.

De ei-witoplossingen werden in een verdunning, overeenkomend met die van versch ei-wit 1 op 100, gefiltreerd. De oplossingen van

dooier en geheel ei werden eveneens in een verdunning, overeenkomend met die van versche dooier en van versch geheel ei 1 op 100, geklaard met infusoriënaarde.

Gedroogd en wederom in oplossing gebracht eenden- en kippenei-wit werd in tabel 11 E (blz. 76) respectievelijk aangegeven met E.W. en K.W., gedroogd en in oplossing gebrachte eenden- en kippendooier werd in tabel 12 D (blz. 81) respectievelijk aangegeven met E.D. en K.D. en gedroogd en in oplossing gebracht geheel eenden- en kippen-ei werd in tabel 13 B (blz. 83) respectievelijk voorgesteld door E.E. en K.E. De contrôlereacties toonen zoowel de werkzaamheid als de specifiteit der gebruikte eiantisera aan. In geen enkel geval geeft het physiologisch konijnenserum 29 een positieve reactie.

De droging en wederoplossing mag derhalve geacht worden geen nadeeligen invloed te hebben op het totstandkomen der praecipitatie reactie.

Alle sera geven negatieve reacties met physiologische keukenzoutoplossing.

Op grond van positieve reacties van de eendeneiantisera mag derhalve met zekerheid worden geconcludeerd tot de aanwezigheid van eendeneibestanddeelen.

Evenzoo mag uit positieve reacties van de kippeneiantisera met zekerheid worden besloten tot de aanwezigheid van kippeneibestanddeelen.

Par. 4. Onderzoek van uit den handel betrokken monsters ei-wit en dooier.

1. *Ei-wit.*

Na de ervaringen, opgedaan met het onderzoek van opzettelijk, ten behoeve van dit proefschrift vervaardigde, gedroogde ei-witmonsters, leek het ons nuttig, teneinde dit deel van het onderzoek tot een geheel te maken, een aantal uit den handel genomen monsters ei-wit te differentieeren. De tabellen 14A en 14B geven een overzicht van het onderzoek van een twintigtal dergelijke monsters, genomen uit evenveel verschillende partijen. Deze partijen werden alle als kippenei-wit aangeduid.

Deze onderzoekingen leveren echter het verbluffende resultaat op, dat van de 20 partijen in den handel voorkomend kippenei-wit, die voor het grootste deel uit China afkomstig zijn, er 10 gemengd zijn met een meer of minder groot percentage eendenei-wit. Hoewel het niet mogelijk is een schatting te maken van het percentage eendenei-wit voorkomende in deze monsters, mag op grond van het aantal minuten,

TABEL 14 A

Onderzoek van monsters ei-wit, waarin geen eendeneibestanddeelen werden opgemerkt.

Monster no.	Gedroogd of vloeibaar	Aantal minuten, waarna *een praecipitaat* werd opgemerkt bij reactie met kippensera		Aantal minuten, waarna *nog geen praecipitaat* werd opgemerkt bij reactie met eendensera		
		60	61	62	63	64
39	gedroogd	4		45		
2721	vloeibaar	3			45	
2722	vloeibaar	3			45	
2720	gedroogd	4			45	
26B	gedroogd	4			45	
27B	gedroogd	4			45	
34B	gedroogd	4			45	
60	gedroogd	5			45	
116	gedroogd	4		45		
73	gedroogd		30			45

TABEL 14 B

Onderzoek van monsters, in den handel gebracht als kippenei-wit, die echter eendeneibestanddeelen blijken te bevatten.

Monster no.	Gedroogd of vloeibaar	Aantal minuten, waarna *een praecipitaat* werd opgemerkt bij reactie met kippensera		Aantal minuten, waarna *een praecipitaat* werd opgemerkt bij reactie met eendensera		
		60	61	62	63	64
61	gedroogd	5			45	
59	gedroogd	5			45	
58	vloeibaar	5			15	
66	gedroogd	2			30	
72	gedroogd		25			20
38	gedroogd	3		3		
2719	gedroogd	4			15	
2873	gedroogd	4			4	
33B	gedroogd	4			35	
33A	gedroogd	2			20	

waarna bij reactie met eendeneiantisera een praecipitaat optrad, toch veilig worden aangenomen, dat de monsters 2873 en 72 gemengd waren met een groot percentage eendenei-wit. Ook monster 58 bevatte een niet onbelangrijke eendeneibijmenging. De andere 7 bevatten een bijmenging van eendenei-wit, die minstens 1% bedroeg.

2. Dooier.

Met inachtneming van in de vorige par. bepaalde nauwkeurigheidsgrens van onze werkwijze, interesseerde het ons de samenstelling na te gaan van een aantal uit den handel genomen monsters vloeibare of gedroogde dooier. De monsters, die ons ter beschikking stonden, werden verkocht onder de aanduiding „kippendooier", „eendendooier" of „eidooier".

De tabellen 14C en 14D geven een overzicht van dit onderzoek, waaruit blijkt, dat het meerendeel der monsters uitsluitend uit eendendooier bestaat, terwijl 14 der 17 monsters geen aantoonbare hoeveelheid kippendooier bevatten. Van deze monsters zijn echter 5 verkeerd aangeduid met de benaming „eidooier". Bovendien werd *één monster No 63 verkocht als kippendooier, terwijl het volgens tabel 14C vermengd is met een aanmerkelijk percentage eendendooier.* Een monster No. 1 werd aangeduid als eidooier, terwijl het voor het grootste deel bestaat uit eendendooier, waaronder een kleiner percentage kippendooier is gemengd. Een ander monster namelijk No. 65 werd aangeduid als eendendooier en bevat een kleine bijmenging van kippendooier.

TABEL 14 C.

Onderzoek van monsters „kippendooier", „eendendooier" of „eidooier" uit den handel.

Monster no.	Gedroogd of vloeibaar	Verkocht als *kippendooier* eidooier of eendendooier	Aantal minuten, waarna *een praecipitaat* optrad bij reactie met		
			kippenserum 60	kippenserum 61	eendenserum 63
63	vloeibaar	kippendooier	5		7
65	gedroogd	eendendooier	45		20
1	vloeibaar	eidooier		20	5

Deze monsters bevatten behalve kippendooier blijkbaar ook eendendooier.

TABEL 14 D.

Onderzoek van „eidooier" of „eendendooier" uit den handel.

Monster no.	Gedroogd of vloeibaar	Verkocht als eidooier of eendendooier	Aantal minuten, waarna *geen neerslag* optrad bij reactie met de kippensera		Aantal minuten, waarna *een neerslag* optrad bij reactie met de eendensera	
			60	61	63	64
3	vloeibaar	eidooier	45		2	
62	vloeibaar	eendendooier	45		5	
28	vloeibaar	eendendooier		45	5	
3B	vloeibaar	eendendooier		45	5	
2	gedroogd	eidooier		45	5	
2723	vloeibaar	eendendooier	45		2	
57	gedroogd	eendendooier	45		10	
3379	gedroogd	eidooier		45		20
3388	gedroogd	eendendooier		45		15
3609	vloeibaar	eidooier		45		5
34	gedroogd	eendendooier	45			4
35	gedroogd	eendendooier	45			5
55	vloeibaar	eendendooier	45			4
1665	gedroogd	eidooier	45			7

De hiervermelde monsters „dooier" bevatten blijkbaar geen „kippendooier" in aantoonbare hoeveelheid, doch uitsluitend eendendooier.

Par. 5. Serologisch onderzoek van consumptieijs.

a. Bereiding van consumptieijs.

Over 't algemeen worden bij de bereiding van consumptieijs eenige der volgende grondstoffen gebruikt: suiker, melk, room, zetmeel — in den vorm van maizena en dergelijke — eieren, eidooier, bindmiddelen en de meest uiteenloopende smaak- en kleurstoffen.

Steeds wordt bij de samenstelling van een ijsmix suiker en een of ander bindmiddel gebruikt. Verder veelal melk of room. Het verdikkingsmiddel kan bestaan uit zetmeel in den vorm van maizena, dat in een vloeistof bij verhitting tot dicht bij het kookpunt verstijfselt en aldus de mix dikvloeibaar maakt. Eibestanddeelen, die verhit worden tot ongeveer 75° C., hebben een overeenkomstige werking,

evenals gelatine, tragacanth en andere stoffen. Hoogere verhitting van eibestanddeelen heeft over 't algemeen tot gevolg, dat schifting optreedt, hetgeen ongewenscht is. Na de bereiding der mix wordt deze met behulp van koude tot bevriezing gebracht.

Een aantal recepten worden vermeld in de vakboeken voor de brood- en banketbakkerij van BUISMAN [94]) en BLESSINGA [95]).

Ten behoeve van ons onderzoek werd steeds een gesteriliseerde pap, die per L. melk 150 gram suiker en 28 gram maizena bevatte, in hoeveelheden van 50 cc in voorraad gehouden. Door toevoeging van verschillende grondstoffen aan deze pap kon consumptieijs volgens de meest uiteenloopende recepten worden bereid.

b. Klaring van consumptieijs.

Uit den aard der zaak is een ijsmix troebel, zoodat de praecipitatie-reactie daarmee zonder verdere bewerking niet uitvoerbaar is. Door sterke verdunning van het consumptieijs toe te passen wordt de helderheid daarvan beter, doch deze verdunning moet zoo hoog worden opgevoerd, dat de eiconcentratie te gering wordt om met behulp van het serologische onderzoek te kunnen worden gedifferentieerd.

Daarom werd de volgende methode uitgewerkt om de mix te klaren.

In een centrifugebuis, die een inhoud van ongeveer 50 cc heeft, werd 10 gram ijspap afgewogen. Hieraan werd toegevoegd 30 cc gekookte melk, 24 druppels van een 10% calciumchlorideoplossing, benevens 1 druppel leb.

De inhoud van de buis werd daarna met een steriele glasstaaf goed gemengd en bij kamertemperatuur geplaatst.

Na ongeveer 2 uren, als de geheele inhoud van de buis gestremd was, werd deze flink met een glasstaaf geroerd en de buis gedurende 10 minuten gecentrifugeerd. De buis werd daarna voorzichtig uit de centrifuge genomen om te voorkomen, dat het dunne roomlaagje uitwolkte in de heldere wei. De benoodigde wei werd opgezogen met een steriele pipet, die via een opening in de roomlaag, — ontstaan door de buis scheef te houden —, in de wei gebracht was. Tijdens dit opzuigen werd de pipet ten opzichte van de buis gefixeerd. Eventueel aanklevende room werd onder de waterkraan afgespoeld. De opgezogen wei werd nog vijftigvoudig verdund met physiologische keukenzoutoplossing.

Een aldus verkregen antigeenoplossing was meer dan voldoende helder om met een praecipiteerend serum te worden onderzocht.

c. Onderzoek van consumptieijs.

Voor de praktische beproeving der sera werden uiteenloopende hoeveelheden eibestanddeelen door de in voorraad gehouden pap geroerd. De verschillende mixen werden op een wijze gemerkt, die oogenblikkelijk de samenstelling aangaf. Zoo beteekende E.W.R. 5%, dat de pap 5% rauw eendenei-wit bevatte. Aangezien consumptieijs, bereid volgens een der ons bekende recepten, nooit minder dan 5% ei bevatte en nooit meer dan 20%, werden deze percentages als minimum en maximum genomen.

De volgende concentraties eibestanddeelen werden aan de pap toegevoegd:

a. 5% eendenei-wit, E.W.R. 5%,
b. 5% kippenei-wit, K.W.R. 5%,
c. 5% eendendooier, E.D.R. 5%,
d. 5% kippendooier, K.D.R. 5%,
e. 20% eendenei-wit, E.W.R. 20%,
f. 20% kippenei-wit, K.W.R. 20%,
g. 20% eendendooier, E.D.R. 20%,
h. 20% kippendooier, K.D.R. 20%,
j. 5% geheel eendenei, E.E.R. 5%,
k. 5% geheel kippenei, K.E.R. 5%,
l. 20% geheel eendenei, E.E.R. 20%,
m. 20% geheel kippenei, K.E.R. 20%,
n. contrôle-pap zonder eitoevoeging.

Alle bovenomschreven monsters consumptieijs werden geklaard, zooals hierboven onder *b.* nader werd beschreven en daarna 1 op 50 verdund met physiologische keukenzoutoplossing.

De aldus verkregen oplossingen werden onderzocht met de natieve eendeneiantisera 18, 62, 64 en 74, alsmede met een physiologisch konijnenserum 29.

Tevens werden contrôles ingezet van alle sera met de voor verdunning der ijsmix gebruikte physiologische keukenzoutoplossing.

Tabel 15 A geeft een overzicht van deze onderzoekingen.

Niet alleen, wanneer 20% eendeneibestanddeelen werden toegevoegd, doch ook, wanneer de pap slechts 5% „eendenei" bevatte, werden duidelijke neerslagen waargenomen. Dit laatste is het minimum, dat in de praktijk gebruikelijk is. Onze sera bezitten dus een voldoende gevoeligheid.

TABEL 15 A.

Tijd van aflezing en uitslag der praecipitatiereactie bij het onderzoek van eigenhandig bereide ijsmixen met dalend gehalte aan eenden- resp. kippenei-wit, eidooier en geheel ei.

Verdunning van de antigeenoplossing 1/50.
De mixen werden niet verwarmd.

	De pap bevat	Nummers der eendenei-antisera				Physiol. konijn. serum 29
		18	62	64	74	
I. IJsmix met ei-wit	*E*.W.R. 20%	10 m +	3 m +	8 m +	8 m +	45 m —
	K.W.R. 20%	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —
	E.W.R. 5%	15 m +	5 m +	8 m +	8 m +	45 m —
	K.W.R. 5%	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —
II. IJsmix met dooier	*E*.D.R. 20%	2 m +	2 m +	2 m +	3 m +	45 m —
	K.D.R. 20%	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —
	E.D.R. 5%	2 m +	2 m +	5 m +	4 m +	45 m —
	K.D.R. 5%	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —
III. IJsmix met geheel ei	*E*.E.R. 20%	2 m +	2 m +	2 m +	2 m +	45 m —
	K.E.R. 20%	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —
	E.E.R. 5%	8 m +	4 m +	7 m +	6 m +	45 m —
	K.E.R. 5%	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —
IJsmix zonder ei		45 m —	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —
Physiolog. NaCl opl.		45 m —	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —

In alle gevallen, waarin kippeneibestanddeelen zijn toegevoegd, zijn de reacties negatief; de reactie is dus inderdaad specifiek.

De contrôle-pap, waaraan geen eibestanddeelen zijn toegevoegd, alsmede de voor verdunning gebruikte physiologische keukenzoutoplossing, geven negatieve reacties.

Het physiologisch konijnenserum 29 geeft in geen enkel geval een positieve reactie.

d. Welke temperatuur denatureert eendeneibestanddeelen?

De eibestanddeelen, die waren toegevoegd aan de monsters ijspap onderzocht in tabel 15 A, waren niet verhit. Over het algemeen echter worden in de practijk der consumptieijsbereiding de eibestanddeelen meer of minder verwarmd. Het interesseerde ons daarom te weten bij welke temperatuur de aantoonbaarheid van eendeneibestanddeelen verdwijnt.

Te dien einde werden papmonsters bereid, respectievelijk met 10% eendenei-wit en 10% eendendooier. In kleine bekerglaasjes werden geringe hoeveelheden van beide monsters in een waterbad onder voortdurend sterk roeren gedurende 5 minuten verhit, respectievelijk op 60° C., 65° C., 70° C., 75° C., 80° C. en 85° C. Deze monsters werden daarop gemerkt E.W.R. 60, E.W.R. 65, en E.D.R. 60, E.D.R. 65, enzoovoort.

Na de gebruikelijke klaring werden de monsters in een verdunning van 1 op 50 onderzocht met de natieve eendeneiantisera 18, 62, 64 en 74. De resultaten van dit onderzoek zijn weergegeven in tabel 15 B.

TABEL 15 B.

Tijd van aflezing en uitslag der praecipitatiereactie bij het onderzoek van *eigenhandig bereide ijsmixen* met 10% eiwit of dooier van *eendeneieren*, welke mixen *op verschillende temperatuur gedurende 5 minuten werden verwarmd.*
Verdunning der antigeen oplossing 1/50.

De pap bevat	Temperatuur, waarop verwarmd werd	Eendenei-antiserum No.			
		18	62	64	74
I	60° C.	12 m +	4 m +	8 m +	6 m +
	65° C.	10 m +	4 m +	7 m +	6 m +
	70° C.	12 m +	6 m +	8 m +	8 m +
	75° C.	30 m +	20 m +	25 m +	25 m +
10% *Eiwit*	80° C.	**45 m —**	**45 m —**	**45 m —**	**45 m —**
	85° C.	**45 m —**	**45 m —**	**45 m —**	**45 m —**
II	60° C.	2 m +	2 m +	3 m +	3 m +
	65° C.	2 m +	2 m +	2 m +	3 m +
	70° C.	5 m +	5 m +	5 m +	5 m +
	75° C.	20 m +	20 m +	25 m +	25 m +
10% Dooier	80° C.	**45 m —**	**45 m —**	**45 m —**	**45 m —**
	85° C.	**45 m —**	**45 m —**	**45 m —**	**45 m —**

Uit de resultaten opgenomen in tabel 15 B volgt, dat bij een verhitting zoowel van eendenei-wit als van eendendooier gedurende korten tijd op 75° C., de praecipitogeen-functie daarvan vrij sterk verminderd is, terwijl een kortstondige verhitting op 80° C. voldoende is om beide eibestanddeelen zoodanig te denatureeren, dat reactie met natieve eendeneiantisera niet meer optreedt.

Hierdoor wordt dus een grens gesteld aan de aantoonbaarheid der eendeneibestanddeelen.

e. Invloed op de reactie van bevriezing der eibestanddeelen en van toevoeging van conserveermiddelen, bindmiddelen en essences.

Na de bereiding der ijsmix wordt deze met behulp van kunstmatige koude bevroren. In verband daarmede werd door ons een aantal eibevattende monsters consumptieijs bevroren en gedeeltelijk gedurende eenigen tijd in bevroren toestand bewaard. Na ontdooiing bleek de aantoonbaarheid der eendeneibestanddeelen door de bevriezing in geen enkel opzicht geleden te hebben.

Hoewel over het algemeen bij de bereiding van eet- en drinkwaren en meer in het bijzonder van consumptieijs, het gebruik van conserveermiddelen verboden is, werd het toch noodig geoordeeld een onderzoek in te stellen naar den invloed daarvan op de praecipitatiereactie.

Bindmiddelen en essences daarentegen zijn veelvuldig gebruikte grondstoffen om deze waren een juiste consistentie en smaak te geven. Dienovereenkomstig werd de invloed nagegaan van de volgende bindmiddelen, conserveermiddelen en essences op de serologische aantoonbaarheid van eendeneibestanddeelen in consumptieijs: pectine, tragacanth, gelatine, naphkagant, zetmeel, benzoëzuur, salicylzuur, ingedikt ananassap, vanilleëssence, ingedikt aardbeiensap, marasquinessence, citroenessence, moccaäroma, pistacheëssence, notenaroma, amandelessence, abrikozenessence, cherrybrandyessence en koffieextract.

In geen enkel geval, waarin een der bovengenoemde stoffen in normale hoeveelheid aan consumptieijs was toegevoegd, kon een reactiebelemmerende of verhinderende invloed worden opgemerkt.

Evenmin werd bij toevoeging van bovengenoemde stoffen aan consumptieijs, dat kippeneibestanddeelen bevatte, reactie opgewekt.

Dit resultaat komt geheel overeen met de ervaringen door andere onderzoekers opgedaan bij de vleeschdifferentieering in worst; conserveermiddelen of kruiden oefenden geen nadeeligen invloed uit op dit onderzoek.

f. Onderzoek van een aantal ingezonden monsters consumptieijs.

Door welwillende medewerking van verscheidene Directeuren van Keuringsdiensten van waren in den lande kregen wij de beschikking over een aantal monsters consumptieijs. Noch wat samenstelling, noch wat bereidingswijze der monsters betrof, waren ons mededeelingen verstrekt. Nadat de uitslag van het onderzoek aan den betreffenden inzender was medegedeeld, werden pas de gegevens omtrent de samenstelling en de bereidingswijze ontvangen.

Deze monsters werden op de reeds in Hoofdstuk IV beschreven wijze geklaard en verdund. Het onderzoek van deze vloeistoffen vond plaats met de natieve eendeneiantisera 18, 62, 64 en 74 en een physiologisch konijnenserum 29.

De ervaringen, verkregen met de in het eigen laboratorium vervaardigde monsters „consumptieijs", werden volledig bevestigd door hetgeen bij het onderzoek van monsters, die aan ons laboratorium werden toegezonden, kon worden opgemerkt. Ook hierbij bleek in de eerste plaats, dat de zonder ei of met natief kippenei vervaardigde monsters geen aanleiding gaven tot de vorming van een neerslag, wanneer de extracten met „eendeneiantisera" werden onderzocht. Wij geven daarvan de volgende voorbeelden.

TABEL 16 A.

Onderzoek van consumptieijs, dat geen eendeneibestanddeelen bevat.

Monster no.	Hoeveelheid toegevoegd kippenei	Temperatuur en duur der verwarming bij de bereiding	Aantal minuten, waarna *nog geen praecipitaat* werd opgemerkt bij reactie met:			
			eendenserum 18	eendenserum 62	eendenserum 64	eendenserum 74
5	geen	geen	45	45	45	45
20	geen	geen	45	45	45	45
25	ei-wit 20%	geen	45	45	45	45
3	geheel ei 7%	20 min. 65° C.	45	45	45	45
14	dooier 7%	tot 70° C.	45	45	45	45

Daar staat tegenover, dat die monsters, bij de bereiding waarvan eendeneibestanddeelen waren gebezigd, wel steeds herkend werden, vooropgesteld, dat de verwarming niet tot boven 75° C. was opgevoerd. Zie tabel 16 B.

TABEL 16 B.

Onderzoek van consumptieijs, dat eendenei-bestanddeelen bevat.

Monster no.	Hoeveelheid toegevoegd eendenei	Temperatuur en duur der verwarming bij de bereiding	Aantal minuten, waarna *een praecipitaat* werd opgemerkt bij reactie met:			
			eenden-serum 18	eenden-serum 62	eenden-serum 64	eenden-serum 74
4	geheel ei 20%	20 min. 65° C.	5	5	5	5
21	dooier 5%	tot 70° C.	4	4	4	4
15	dooier 9%	tot 70° C.	5	5	5	5
11	dooier 3% + geheel ei 15%	tot 70° C.	5	5	5	5

Zette men de verwarming nog hooger door, dan kon met deze „natief" sera de aanwezigheid van eendeneibestanddeelen in de toegezonden monsters niet meer worden aangetoond.

TABEL 16 C.

Onderzoek van consumptieijs, dat eendenei-bestanddeelen bevat, doch dat verwarmd is op temperaturen boven 80° C.

Monster No.	Hoeveelheid toegevoegd ei		Temperatuur en duur der verwarming bij de bereiding	Aantal minuten, waarna *nog geen praecipitaat* werd opgemerkt bij reactie met:			
	eendenei	kippenei		eenden-serum 18	eenden-serum 62	eenden-serum 64	eenden-serum 74
12	dooier 3% + geheel ei 15%	geen	tot 85° C.	45?	45?	45?	45?
16	dooier 4½%	dooier 4%	tot 90° C.	45	45	45	45
9	geheel ei 5%	geheel ei 5%	10 min. 95° C.	45	45	45	45
10	geheel ei 5%	geheel ei 5%	10 min. 95° C.	45	45	45	45
2	dooier 9%	geen	10 min. 98° C.	45	45	45	45
17	dooier 5%	geen	doorgekookt	45	45	45	45
18	dooier 3%	dooier 3%	doorgekookt	45	45	45	45

Bij monster 12, dat volgens opgave verhit was tot 85° C., werd wel is waar een dubieuze reactie opgemerkt, doch dit moet o.i. worden toegeschreven aan het feit, dat een klein deel van deze ijsmix niet boven 75° C. verhit is geweest. Dit is zeer goed mogelijk, wanneer de dik vloeibare mix tijdens de verwarming niet zeer goed geroerd wordt.

Herhaald onderzoek heeft ons namelijk geleerd, dat bij verhitting tot 80° C. of hooger alle eibestanddeelen gedenatureerd zijn.

Dat er tenslotte geen neerslag werd opgemerkt bij het onderzoek met *eendeneiantisera* van die extracten van monsters consumptieijs, die met kippeneibestanddeelen waren bereid en dan tot 80° C. of hooger werden verwarmd, behoeft geen verwondering te wekken. Opgemerkt zij, dat juist door de verwarming, deze proeven niet kunnen worden opgevat als een bewijs van de specifiteit onzer sera.

Volledigheidshalve zijn zij in tabel 16 D opgenomen.

TABEL 16 D.

Onderzoek van monsters consumptieijs, die kippen- en geen eendeneibestanddeelen bevatten en die bij de bereiding boven 75° C. werden verwarmd.

Monster no.	Hoeveelheid toegevoegd kippenei	Temperatuur en duur der verwarming bij de bereiding	Aantal minuten, waarna *nog geen praecipitaat* werd opgemerkt bij reactie met:			
			eendenserum 18	eendenserum 62	eendenserum 64	eendenserum 74
7	geheel ei 5%	5 min. 80° C.	45	45	45	45
8	geheel ei 5%	10 min. 80° C.	45	45	45	45
6	geheel ei 5%	10 min. 85° C.	45	45	45	45
13	dooier 7%	tot 85° C.	45	45	45	45
1	dooier 5%	10 min. 98° C.	45	45	45	45
19	dooier 5%	doorgekookt	45	45	45	45

Met de „natieve" eendeneiantisera 18, 62, 64 en 74 konden volgens de uitkomsten van tabel 16 B in de volgende monsters consumptieijs met zekerheid natieve eendeneibestanddeelen worden aangetoond; monster 4, 11, 15 en 21. De reacties, verkregen bij het onderzoek van monster 12 (zie tabel 16 C), wijzen eveneens op eendeneitoevoeging.

Voorzichtigheidshalve zouden wij hier echter niet tot een vaststaande aanwezigheid daarvan willen besluiten.

Van de 21 monsters consumptieijs, die onderzocht werden, bevatten echter 11 monsters eendeneibestanddeelen. Van deze monsters konden, klaarblijkelijk tengevolge van de toegepaste verwarming, in 7 eendeneibestanddeelen niet worden aangetoond. De methode is dus voor de praktijk nog niet bruikbaar.

In hoeverre komen deze monsters, die opzettelijk ten behoeve van onze onderzoekingen werden bereid, overeen met consumptieijs, zooals dat in den handel voorkomt? Ons inziens is dit wel degelijk het geval.

Wanneer wij de recepten voorkomende in de vakboeken voor de banketbakkerij beschouwen, blijkt, dat bij een deel der recepten kokende melk en onverwarmde eimassa bij elkaar worden gevoegd. De eibestanddeelen bereiken daarbij volgens eigen onderzoek een temperatuur van ongeveer 70° C. — 80° C.

De aantoonbaarheid der eendeneibestanddeelen is hierbij dus afhankelijk van een relatief geringe wijziging der temperatuur. Immers, zooals uit de tabellen 15 B, 16 B en 16 C blijkt, zijn uitsluitend eendeneibestanddeelen, die niet hooger verhit zijn dan tot 75° C., op deze wijze aantoonbaar.

Bij een ander deel der recepten wordt de mix doorgekookt, zoodat hierin geen natieve eibestanddeelen meer aanwezig zijn.

Het is op grond van deze overwegingen, dat wij tot de overtuiging kwamen, dat ons onderzoek eerst volledig genoemd zou kunnen worden, wanneer wij ook de mogelijkheid hadden onderzocht de aanwezigheid van „verwarmde" eendenei-bestanddeelen op serologische wijze aan te toonen. Hierover zijn in het derde deel van dit proefschrift uitvoerige mededeelingen opgenomen.

Par. 6. Serologisch onderzoek van advocaat.

a. Bereiding van advocaat.

Bij de bereiding van advocaat wordt een mengsel van den geheelen eiinhoud, verdunden alcohol en suiker, waaraan verder een weinig vanille of vanilline is toegevoegd, door zachte verwarming onder voortdurend roeren tot stolling gebracht. Deze stolling mag niet beschouwd worden als een volledige coagulatie der eibestanddeelen, maar heeft ten doel een dikvloeibare massa te verkrijgen. De temperatuur, waarbij deze stolling optreedt, bedraagt omstreeks 65° C. Door de aanwezige alkoholconcentratie is het stolpunt der eibestanddeelen lager dan dit het geval is in consumptieijs.

Veelal wordt nog eenig bindmiddel toegevoegd, om reeds bij iets lagere temperatuur voldoende dikvloeibaarheid te verkrijgen. Dit heeft een gering voordeel, omdat een iets te hooge verhitting direct schifting der eibestanddeelen tengevolge heeft, hetgeen ongewenscht is. Om een enkel te sterk gecoaguleerd eiwitvlokje te verwijderen, wordt de advocaat voor ze gebotteld wordt, door een paardenharen zeef gefiltreerd.

Het eigeelgehalte van advocaat moet volgens de zoogenaamde „Advocaatovereenkomst" tenminste 10% bedragen, het alkoholgehalte tenminste 14% (volume procenten). Een zeer dure advocaatsoort wordt uitsluitend met eidooier bereid en bevat dan ongeveer 25—30% eidooier, bij een veelal hooger alkoholgehalte dan 14%.

b. Klaring van advocaat.

Advocaat is een zeer troebele massa, die daardoor ontoegankelijk is voor serologisch onderzoek. Om een voldoende heldere vloeistof te verkrijgen moet deze geklaard worden.

Geheel dezelfde klaringsmethode als gebruikt werd bij het consumptieijsonderzoek kon hier worden toegepast. Opvallend was daarbij, dat de enzymwerking van de leb in geenendeele gestoord werd door den aanwezigen alkohol.

In een centrifugebuis met een inhoud van ongeveer 50 cc werd 10 gram advocaat afgewogen. Men voegde daarna 30 cc gekookte melk toe, alsmede 24 druppels van een 10% calciumchlorideoplossing en 1 druppel leb. Met een steriele glasstaaf werd deze massa goed dooreen gemengd en daarna gedurende ongeveer 2 uren bij kamertemperatuur geplaatst, waarna de inhoud der buis volkomen gestremd was. Hierna werd wederom met een glasstaaf flink geroerd en nadat de gestremde inhoud meer of minder fijn verdeeld was, de buis gedurende 10 minuten gecentrifugeerd.

Met de noodige voorzichtigheid werd daarna 1 cc wei uit de buis afgepipetteerd, waarbij vermeden werd, dat het door het centrifugeeren gevormde vetlaagje in de wei uitwolkte. Nadat de pipet zoo noodig onder den waterstraal ontdaan was van aan den buitenkant aanklevend vet, werden verdunningen van 1 op 50 met physiologische keukenzoutoplossing gemaakt.

c. Onderzoek van een aantal ingezonden monsters advocaat.

Bovengenoemde 1 op 50 verdunde oplossing van geklaarde advocaat kon onderzocht worden met natief eendeneiantiserum. Bij een dergelijk

TABEL 17.

Contrôles bij het advocaat-onderzoek.

Monster						Samenstelling en bereidingswijze
E.D.R.	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50	25% eendendooier in verdunden alkohol.
Serum	18	62	64	74	29	Niet verhit.
Uitslag en tijd	3m+	3m+	3m+	4m+	45m—	
E.E.R.	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50	25% eendenei in verdunden alkohol.
Serum	18	62	64	74	29	Niet verhit.
Uitslag en tijd	2m+	2m+	2m+	2m+	45m—	
K.D.R.	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50	25% kippendooier in verdunden alkohol.
Serum	18	62	64	74	29	Niet verhit.
Uitslag en tijd	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	
K.E.R.	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50	25% kippenei in verdunden alkohol
Serum	18	62	64	74	29	Niet verhit.
Uitslag en tijd	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	
Physiologische keukenzout-oplossing	/	/	/	/	/	De voor verdunning gebruikte physiologische keukenzout-oplossing.
Serum	18	62	64	74	29	
Uitslag en tijd	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	

onderzoek bleek ons, wanneer de advocaat lege artis bereid was, dat hierin juist geen natieve eibestanddeelen meer voorkwamen.

Alleen, wanneer onvoldoende verhitting was toegepast, veelal

gepaard gaande met meerdere of mindere dunvloeibaarheid der advocaat, waren daarin de eibestanddeelen met „natieve" sera differentieerbaar.

Aan een twintigtal zelfbereide advocaatmonsters, bereid zoowel met kippen- als met eendeneibestanddeelen als met mengsels van beide, konden wij dit constateeren.

Dat de eendeneibestanddeelen in „alcoholische oplossing" of gemengd met alkohol van een zoodanig percentage, dat het uiteindelijk alcoholgehalte 14 volumeprocenten bedraagt, nog zeer goed herkend worden, moge blijken uit het verslag van de in tabel 17 opgenomen contrôleproeven.

Overigens bevestigde het onderzoek van ingezonden monsters, die wij evenzeer aan de welwillende medewerking van verschillende Directeuren van Keuringsdiensten van waren danken, volledig onze bevindingen met de zelf bereide monsters. Ook bij deze ingezonden advocaatmonsters vernamen wij de details over samenstelling en verwarming eerst, nadat wij het onderzoek verricht haddden en den betrokkene den uitslag hadden medegedeeld. Wij geven hieronder de volgende voorbeelden ter illustratie van onze mededeelingen. Zie de tabellen 18 A en 18 B.

TABEL 18 A.

Monster No.	Hoeveelheid toegevoegd ei		Temperatuur en duur der verwarming	Aantal minuten, waarna *een praecipitaat* werd opgemerkt bij reactie met:			
	eendenei	kippenei		eenden-serum 18	eenden-serum 62	eenden-serum 64	eenden-serum 74
11	geheel ei 30%	geen	geen	5	5	5	5
10	geheel ei 15%	geheel ei 15%	tot dikwordens	35	25	30	35
6	geheel ei 30%	geen	tot dikwordens	45	45	45	45

Dat ook bij het onderzoek van de toegezonden monsters advocaat, die uitsluitend met kippeneibestanddeelen waren vervaardigd, geen neerslag werd waargenomen bij onderzoek met natief eendeneiantiserum, spreekt vanzelf. Dit zal zeer zeker ook het geval zijn, wanneer zulke monsters nog tot schifting of tot dikwordens toe worden

TABEL 18 B.

	Hoeveelheid toegevoegd ei		Temperatuur en duur der verwarming	Aantal minuten, waarna *nog geen praecipitaat* werd opgemerkt bij reactie met:			
	eendenei	kippenei		eenden-serum 18	eenden-serum 62	eenden-serum 64	eenden-serum 74
2	dooier 16%	geen	tot schifting	45	45	45	45
5	dooier 10%	dooier 4%	tot schifting	45	45	45	45
9	geheel ei 9%	geheel ei 21%	tot dikwordens	45	45?	45	45
3	dooier 8%	dooier 5%	tot schifting	45	45	45	45
1	dooier 5%	dooier 9%	tot schifting	45	45	45	45
8	geheel ei 3%	geheel ei 27%	tot dikwordens	45	45	45	45

verwarmd. Met kippendooier waren vervaardigd de monsters No. 4 en 7. Wij meenen van het afzonderlijk mededeelen van de resultaten van deze onderzoekingen te mogen afzien.

Van de 21 onderzochte monsters advocaat waren 9 met eendeneibestanddeelen of met een mengsel van eenden- en kippeneibestanddeelen bereid. In de monsters 6, 10 en 11 kon met zekerheid eendenei worden aangetoond.

Wanneer we de eigenschappen van de ingezonden advocaatmonsters beschouwen, blijkt, dat de monsters 1—5 alle niet voldeden aan redelijke eischen, die aan advocaat gesteld mogen worden.

Deze advocaat was namelijk dunvloeibaar en geschift. Het eigehalte was te laag, namelijk 13—16%, waardoor bij een normale verhitting geen dikvloeibaarheid kon ontstaan, zooals ons bij onderzoek bleek.

Gezien de opgetreden schifting werd, blijkbaar door hoogere verhitting toe te passen, getracht een betere consistentie te verkrijgen, hetgeen niet gelukte. Deze monsters waren ongetwijfeld hooger verhit, dan bij de advocaatbereiding gebruikelijk is.

De advocaatmonsters 6—10 voldeden beter aan redelijke eischen wat eigehalte en vloeibaarheid betreft. Toch vloeide de advocaat iets vlugger uit dan normale handelsadvocaat, speciaal de monsters

6 en 10. Vermoedelijk is de verhitting van deze monsters iets te laag geweest. Het monster 11 was een onverhit mengsel van eendendooier en verdunden alkohol van ongeveer 20 volumeprocenten.

De resultaten van het advocaatonderzoek zijn dus anders, dan onder meer normale omstandigheden verwacht mag worden.

Het is ons namelijk gebleken bij het onderzoek van een vrij groot aantal zelfbereide monsters advocaat — dat, wanneer de bereiding daarvan lege artis geschiedt, daarin geen natieve eendeneibestanddeelen meer aantoonbaar zijn.

Ook hier blijkt, dat wij door onderzoek met onze „natief" sera niet in staat zijn een oordeel uit te spreken over de vraag of bij de bereiding van advocaat van eendeneibestanddeelen gebruik gemaakt is of niet. Zoodra de massa te hoog verwarmd of wel geschift is, is ons reactief onvoldoende.

Voor het onderzoek van advocaat zal de methode dus eveneens verbeterd moeten worden.

Par. 7. Serologisch onderzoek van zachte cake.

a. Bereiding van zachte cake.

Cake wordt meestal gebakken van een mengsel van tarwebloem, den geheelen eiinhoud, suiker en boter of eenig vervangmiddel daarvan. Als regel wordt nog een geringe hoeveelheid vanille of vanilline toegevoegd, soms ook een kleine hoeveelheid citroenrasp alsmede een rijsmiddel. Van deze ingrediënten wordt eerst een beslag gemaakt, dat meer of minder taai wordt onder invloed van de gluten (tarweëiwit), aanwezig in de bloem.

Tijdens het bakken wordt uit het rijsmiddel gas gevormd, dat in min of meer groote gasbellen in de massa aanwezig blijft. Ontwijken der gasbellen is niet mogelijk door de taaiheid van het deeg. In het verdere verloop van het bakproces coaguleeren de eiwitten, waardoor een vast geheel ontstaat, dat meer of minder luchtig is. Het aanwezige zetmeel verstijfselt tijdens het bakken. Verschillende recepten van cake en de bereidingswijze daarvan zijn vermeld in de vakboeken voor de brood en banketbakkerij van BUISMAN [94]) en BLESSINGA [95]).

De hoogste temperatuur in het inwendige van de cake wordt bereikt op het moment, dat deze den oven verlaat. Volgens eigen onderzoek bedraagt deze ongeveer 100° C. Erg waarschijnlijk lijkt het niet, dat eventueele Salmonella's deze temperatuur overleven, hoewel er ons inziens rekening mee moet worden gehouden, dat de inwerking der temperatuur op eventueele bacteriën minder sterk is in cake dan in

een vloeistof. Hier is ongetwijfeld sprake van een steriliseering, die de droge methode nadert.

Volgens KATZ [126]) overleefden inderdaad enkele kiemen het bakproces, wanneer men opzettelijk groote hoeveelheden typhusbacteriën aan brooddeeg toevoegde. Hierbij werd in het brood bij het verlaten van den oven een temperatuur gemeten van 95°—100° C.

NEUMANN [127]) heeft deze temperatuur bepaald op 94°—95° C. Brood werd echter volgens KATZ reeds gaar, zoodra de temperatuur 90° C. bedroeg. Cake of brood, gebakken in een te heeten oven, waarbij de korst van het gebak reeds dreigt te verbranden, als het inwendige nog niet voldoende hooge temperatuur heeft bereikt, wordt echter niet geheel gaar. Ook, wanneer de oventemperatuur te laag is, bestaat de kans, dat het gebak inwendig niet gaar wordt.

Speciaal onder deze omstandigheden lijkt ons de kans, dat eventueele Salmonella's het bakproces overleven, grooter.

b. Extractie van zachte cake.

Om zachte cake te kunnen onderzoeken op eendeneitoevoeging, is het noodig eventueele natieve eibestanddeelen in oplossing te brengen.

Aangezien versche cake zich niet fijn laat verdeelen, hetgeen noodig is om haar met physiologische keukenzout te extraheeren, werd een klein gedeelte van een cake bij 37° C. gedroogd en daarna fijngewreven. Bij 1 gram van de gedroogde en fijngewreven kruimels werd 10 cc physiologische zoutoplossing gevoegd; dit mengsel werd gedurende 24 uur bij kamertemperatuur geplaatst. De vloeistof werd daarop afgegoten, gedurende 10 minuten gecentrifugeerd en opvolgend 10-voudig verdund met physiologische keukenzoutoplossing.

c. Onderzoek van een aantal zelfbereide en ingezonden monsters zachte cake.

Van een tiental onder ons toezicht gebakken cakes, waarvan de samenstelling vaststond, werden extracten gemaakt zooals boven omschreven is, 1 op 10 verdund en onderzocht met natieve eendeneiantisera. In geen enkele gaar gebakken cake waren nog natieve eendeneibestanddeelen aantoonbaar. Ook mochten wij een tiental monsters zachte cake door bemiddeling van eenige Directeuren van Keuringsdiensten van waren ontvangen. Hierbij werden dezelfde voorwaarden in acht genomen als bij de inzending van monsters consumptieijs en advocaat. Wij vernamen de samenstelling dus eerst nàdat het onderzoek was verricht. Als een voorbeeld van zulk een onderzoek wordt hierbij Tabel 19 overgelegd.

TABEL 19.

Cake-onderzoek.

Monster						Opgegeven samenstelling
Amsterdam 1	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	Bereid met ± 25% kippenei.
Serum	18	62	64	74	29	
Uitslag en tijd	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	
Amsterdam 2	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	Bereid met ± 25% eendenei.
Serum	18	62	64	74	29	
Uitslag en tijd	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	
Amsterdam 3	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	Bereid met ± 25% kippenei.
Serum	18	62	64	74	29	
Uitslag en tijd	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	
Amsterdam 4	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	Bereid met ± 12½% kippenei en ± 12½% eendenei.
Serum	18	62	64	74	29	
Uitslag en tijd	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	

In geen enkel der ontvangen monsters vermochten wij eendeneibestanddeelen aan te toonen. Echter van de 10 onderzochte monsters zachte cake bevatten 7 wel degelijk eendeneibestanddeelen, te weten vier 12½% en drie 25% eendenei.

Hoe moeten wij dezen teleurstellenden uitslag verklaren?

Volgens KATZ [126]) is de laagste temperatuur, waarbij brood gaar wordt, 90° C. Ons inziens zal dit eveneens de laagste temperatuur zijn, waarbij cake gaar wordt. Aangezien deze temperatuur ver ligt boven de laagste temperatuur, waarbij eendeneibestanddeelen gedenatureerd worden, namelijk ruim 75° C, is het volkomen begrijpelijk, dat gaar

gebakken cake geen aantoonbare natieve eibestanddeelen meer bevat. De negatieve uitkomsten zijn dus volkomen verklaarbaar.

Voor het onderzoek van cake kunnen onze „natief-sera" dus niet dienen.

Par. 8. Samenvatting der resultaten. — Richtlijnen voor het verder onderzoek.

Samenvatting.

De door ons gebruikte praecipiteerende sera werden bereid door injectie van den verdunden geheelen inhoud van kippen- en eenden-eieren bij konijnen. De specifiteit van deze sera was onvoldoende om ei-wit naar herkomst te differentieeren, terwijl bij het onderzoek van dooier nauwelijks eenige specifiteit kon worden opgemerkt.

Door verzadiging toe te passen met verwant ei-wit zoowel als met verwante dooier, waarbij de hoeveelheid verwante eiwitten noodig voor deze verzadiging vooraf nauwkeurig werd bepaald, gelukte het sera te verkrijgen, die streng specifiek waren.

Vatten wij het resultaat der onderzoekingen met deze sera samen, dan komen wij tot de volgende conclusie:

De sera laten bij het onderzoek van eibestanddeelen met zeer groote zekerheid een uitspraak toe over de vraag, of men met eenden- of met kippenei-wit te maken heeft. Evenzoo is het mogelijk eendendooier van kippendooier te differentieeren.

Bij het voortgezet onderzoek kwam vast te staan, dat een bijmenging van 1% of meer van één van beide ei-witsoorten aan de andere, kon worden vastgesteld. Voor dooier bleek het kleinste percentage, dat in een mengsel van beide kon worden vastgesteld, 10% te bedragen. Dezelfde resultaten konden eveneens geboekt worden, wanneer deze eiprodukten in gedroogden toestand ter onderzoek kwamen.

In voedings- en genotmiddelen was het mogelijk de aanwezigheid, van eendeneibestanddeelen vast te stellen, zelfs in kleine hoeveelheden, zoolang deze stoffen niet boven een bepaalde temperatuur zijn verhit. Voor consumptieijs konden wij deze temperatuur op circa 75° C. bepalen. Zoodra de eieren zich in een alkoholische vloeistof bevinden, moet er mede gerekend worden, dat deze temperatuur lager ligt.

Richtlijnen voor het verder onderzoek.

Wij moeten nu in de eerste plaats de vraag onderzoeken, of in de praktijk der levensmiddelencontrôle volstaan zou kunnen worden met een onderzoek uitsluitend door natief-sera. Daarbij dient het volgende overwogen.

Wij hebben geen proeven genomen over temperatuur en duur der verwarming, waarbij Salmonella's afsterven. Wij vinden daarover opgeteekend in de publicatie van „VAN OYEN" [1])

„In laboratoriumproeven bleek mij, dat vele culturen van Salmo-
„nella's reeds door verwarming gedurende korten tijd op 54° C. werden
„gedood . . . . . Verwarmt men echter mengsels van culturen met „ei",
„dan komt er van het dooden der bacteriën niets terecht, zelfs wanneer
„men zeer langdurige verwarming bij deze lagere temperatuur toepast
„. . . . . Door het instellen van een reeks proeven kon ik vaststellen,
„dat door verhitting gedurende 20 minuten op ten minste 65° C. alle
„Salmonellaculturen, die aan de eimassa waren toegevoegd, volkomen
„werden gedood."

Waar nu de reactie met natief serum in intensiteit vermindert resp. uitblijft na verwarming op 75° C. of hooger, zou men op het eerste gezicht het vermoeden kunnen uitspreken, dat uit een oogpunt van preventie tegen infectie met „Salmonella" met een onderzoek door middel van „natief" serum zou kunnen worden volstaan. Daartegen zijn echter zeer ernstige bedenkingen aan te voeren.

Het is in de eerste plaats de vraag, of in *alle* levensmiddelen voor het vernietigen der eigenschappen van het gebruikte eendenei, die het mogelijk maken dit met natief serum aan te toonen, zoodanige verwarming noodig is, dat alle Salmonella's worden gedood (advocaat!).

Ook is het mogelijk, dat voor het ter onderzoek genomen gedeelte van de waar de verwarming van dien aard was, dat zoowel bovenbedoelde eigenschappen van het gebruikte eendenei werden verstoord, terwijl tevens alle „Salmonella's" werden gedood, maar dat in een ander deel van de waar de verwarming voor dit laatste doel ontoereikend is geweest.

Men heeft den bereiders van verschillende levensmiddelen (consumptieijs — zacht gebak enz.) dan ook terecht *geheel verboden* eendeneieren te gebruiken. Zouden zij zulks wel doen en zooals het in het praktische leven nu eenmaal gaat, om de meest uiteenloopende redenen de afdoende verwarming eens een keer nalaten, dan zou het gevaar voor voedselvergiftiging blijven bestaan.

Wij moeten dus over een middel beschikken om zoo streng mogelijk na te gaan, of zij zich aan dit verbod tot verbruik van eendenei nauwgezet houden en het is daarbij van geen beteekenis, of in bij hen genomen monsters dit ei al dan niet zoodanig is verhit, dat de aanwezigheid van levende „Salmonella's" kan worden uitgesloten.

---

[1]) VAN OYEN. Gepasteuriseerde bevroren eendeneieren. Tijdschrift voor Diergeneeskunde 1940, Bnd. 67, blz. 689.

Daarom kan bij het toezicht op de hier bedoelde levens- en genotmiddelen *niet* met het onderzoek door middel van „natief"-serum worden volstaan. Het is zeker onze taak na te gaan of het ook mogelijk is de aanwezigheid van eendenei aan te toonen in voedingsmiddelen, die op hooger temperaturen dan 75° C. zijn verhit, zelfs wanneer bij die verwarming coagulatie van het eiwit zou zijn opgetreden.

Hiervoor zijn sera noodig, die op andere wijze dan de natief-sera zijn vervaardigd. Wij zullen ons in de derde afdeeling van dit proefschrift met het vervaardigen en toepassen van zulke sera uitvoerig bezig houden.

DERDE AFDEELING.

DE DIFFERENTIEERING VAN GECOALULEERDE EIBESTANDDEELEN.

HOOFDSTUK V.

BEREIDING VAN SERUM, DAT DIFFERENTIEERING VAN GECOAGULEERDE EIBESTANDDEELEN MOGELIJK MAAKT.

De overwegingen genoemd in de laatste par. van Hoofdstuk IV waren voor ons aanleiding in de literatuur na te gaan:

1e De invloed van verhitting op de praecipitogeen-eigenschappen van eiwit.

2e De invloed van verhitting op de antigeen-eigenschappen van eiwit.

3e De invloed van hittecoagulatie op de praecipitogeeen-eigenschappen van eiwit.

4e De invloed van hittecoagulatie op de antigeen-eigenschappen van eiwit.

5e De antigeen- en praecipitogeen-eigenschappen van eiwitten, die in opgelosten of gecoaguleerden toestand door loog, zuur of fermenten zijn aangetast.

Par. 1. Literatuuroverzicht.

a. Literatuur.

Het eerst komen voor bespreking in aanmerking de onderzoekingen, waarbij normale praecipiteerende sera, dus sera bereid door injectie van onverwarmd natief eiwit, met verwarmd eiwit werden samengebracht en aldus de invloed van verhitting op de praecipitogeen-eigenschappen van eiwit werd nagegaan. De volgende auteurs berichten hierover.

Door SCHÜTZE [96]) werd gevonden, dat de specifieke praecipitogeen-eigenschappen van melk door koken voor het grootste deel verloren gingen.

VERSELL [100]) kwam tot de conclusie, dat bij verschillend lang en

hoog verhitten van melk de reactie met antisera meer in sterkte afneemt, naarmate de melk langer en hooger verhit is geweest. Hetzelfde geldt voor een caseineoplossing. In dit verband stelde V. voor de uitdrukking „coctostabiliteit" te vervangen door „relatieve thermoresistentie".

Volgens de onderzoekingen van ZINSSER [101]) coaguleert niet alle eialbumine bij koken, doch een klein deel blijft in oplossing, hetgeen met een praecipiteerend serum kon worden aangetoond. Z. concludeerde, dat de praecipitogeen-eigenschappen zeer resistent zijn tegen verhitting. Volledige coaguleering bewerkstelligt een opheffing der reactie, doordat de eiwitten onoplosbaar zijn geworden, doch deze opheffing mag niet worden toegeschreven aan verlies der praecipitogeen-eigenschappen.

OBERMAYER en PICK [104]) onderscheiden in een eiwit een tweevoudige specifiteit. De eerste is de originaire of soortspecifiteit, de tweede is afhankelijk van de door physico-chemische invloeden bepaalde toestandsphase en kan genoemd worden de constitutieve- of toestandspecifiteit. Door verhitting wordt eiwit in een andere toestandspecifiteit overgebracht.

De bovenaangehaalde onderzoekers bestudeerden de eigenschappen van verhit eiwit, terwijl zij bij dit onderzoek gebruik maakten van antisera, ontstaan door injectie van onverhit eiwit. Op deze wijze is het betreffende onderwerp slechts op eenzijdige wijze belicht.

Door andere onderzoekers daarentegen werd *verhit* eiwit bij konijnen geinjiceerd en werden de eigenschappen van aldus bereide sera, zoowel ten aanzien van verhit eiwit als van onverhit eiwit, bestudeerd. Sommige onderzoekers betrokken verder „afbraakprodukten" van eiwitten in het onderzoek.

Zoo merkten OBERMAYER en PICK [106]) op, dat sera ontstaan door inspuiting van verhit eiwit een *grootere reactiebreedte bezaten*, dan sera gewonnen na injectie van hetzelfde eiwit in onverhitten toestand. Het antiserum tegen verhit eiwit reageerde namelijk niet alleen met de injectievloeistof, doch ook met onverhit eiwit, evenals met verschillende afbraakprodukten der peptische of tryptische vertering. Antiserum, door injectie van onverhit eiwit bereid, reageerde vrijwel uitsluitend met de injectievloeistof. Zij merkten verder op, dat de zoogenaamde cocto- en de normale immuunlichamen afzonderlijk in de sera voorkwamen. Beide konden namelijk door specifieke verzadiging worden verwijderd.

LOEFFLER [105]) verhitte eiwit in de autoclaaf tot 150° C. Het eiwit

veranderde door deze behandeling in een dik vloeibare in water oplosbare massa. Door voorbehandeling van konijnen met dergelijk eiwit werd een serum verkregen, dat autoclaafeiwit sterk praecipiteerde; onverhit of droog verhit eiwit werd niet neergeslagen.

Een overeenkomstig resultaat werd verkregen door W. A. SCHMIDT [98]). Hij verhitte ei-wit gedurende 30 tot 60 minuten op 70°C. en immuniseerde hiermede konijnen. Een op dergelijke wijze gewonnen serum praecipiteerde verhit ei-wit uitstekend. Sera, die verkregen waren door injectie van onverhit ei-wit, reageerden slechts gebrekkig met verhit ei-wit.

FORNET en MÜLLER [107]) bereidden eveneens sera, door proefdieren te immuniseeren met eiwit, dat op 80°C. was verhit. Zij merkten op, dat dergelijke sera *verwant eiwit* sterker praecipiteerden, dan sera, die met behulp van hetzelfde eiwit in onverhitten toestand waren bereid. Antisera tegen verhit eiwit reageerden sterker met verhit eiwit, dan sera bereid door injectie van onverhit eiwit.

F. en M. zagen hierin een overgang van de soortspecifiteit der eiwitten in de toestandspecifiteit.

FÜRTH [109]) vond, dat verhitting van bloedserum of eialbumine tot 100° C. een nieuwe specifiteit schiep. Antisera, verkregen door injectie van dergelijk materiaal, praecipiteerden de injectievloeistof in sterke mate. Deze sera gaven met hetzelfde eiwit in onverhitten toestand slechts zwakke reacties. De soortspecifiteit van dergelijke verhitte eiwitten was echter slechts klein.

In verband met de bovengenoemde veranderingen, die eiwitten tijdens verhitting ondergaan, zij nog gewezen op de opvattingen van TORIKATA en TAMAKI [110]), die van meening waren, dat zekere in water opgeloste microbiotische stof, door hen „impedin" genoemd, in natieven toestand immunisatorische reacties zoowel in vivo als in vitro eenigermate paralyseert. Deze „remmende stof", onder anderen voorkomend in cultuurfiltraten, was „coctolabiler" dan de „bevorderende stof", het antigeen, zoodat door verhitting het impedin onschadelijk gemaakt kon worden, terwijl de werkzaamheid van het antigeen onverzwakt bleef.

Over den invloed van *coaguleering* op de praecipitogeen-eigenschappen van eiwit berichtten onder anderen de volgende onderzoekers:

W. A. SCHMIDT [97], [98]) was van meening, dat eiwitten oplosbaar moeten zijn om in vitro met praecipiteerende sera gedifferentieerd te kunnen worden. Onoplosbare eiwitten kan men alleen met een zekere

kans op succes onderzoeken, nadat deze weer in oplossing zijn gebracht.

Verhitting heeft over 't algemeen in zooverre invloed, dat coagulatie optreedt, waardoor de reactie-mogelijkheid verdwijnt.

Eenzelfde opvatting is WELLS [99]) toegedaan. Hij merkte op, dat hitte coagulatie van een eiwit onwerkzaamheid veroorzaakt, doordat het eiwit onoplosbaar is geworden.

Dat door coaguleering de *antigeen*-eigenschappen van eiwit niet verloren zijn gegaan, bewezen FUJIWARA [102]) en TSUKASAKI [103]). Zij bereidden met veel succes sera door inspuiting van fijnverdeeld gecoaguleerd eiwit. Deze sera waren uitstekend geschikt om natieve eiwitten te differentieeren. Zij meenden op deze wijze zelfs sera met grootere specifiteit te verkrijgen en gaven derhalve de voorkeur aan injectie van gecoaguleerd eiwit boven natief eiwit.

ROSENBERG [120]) wekte eveneens soortspecifieke praecipitine op door injectie van gecoaguleerd bloedserum. Deze praecipitine gaf niet alleen een soortspecifiek neerslag met natief bloedserum, doch ook met door koken gecoaguleerd eiwit, dat, volgens een door W. A. SCHMIDT (zie blz. 112) aangegeven methode, na pulveriseering, met loog werd opgelost.

CHICK en MARTIN [111]) hebben verder aangetoond, dat physicochemisch „verhitting" (denatureering) van eiwit en „coaguleering" daarvan, scherp van elkaar onderscheiden dienen te worden.

Bij denatureering van eiwit door verhitting is sprake van een chemische reactie tusschen eiwit en heet water. Bij coaguleering echter wordt de op deze wijze ontstane verbinding onder invloed van een voldoende waterstofionenconcentratie of electrolytconcentratie geagglutineerd.

Uit bovenaangehaalde onderzoekingen blijkt, dat coaguleeren van eiwit oorzaak is, dat — met het onoplosbaar worden — de reactiemogelijkheid (in vitro) verdwijnt. Derhalve werd in de literatuur nagegaan welke invloed het bewerken van eiwit — dat in opgelosten of in gecoaguleerden toestand verkeert — met loog, zuur of fermenten heeft op de antigeen- en praecipitogeen-eigenschappen daarvan. Hetzelfde werd nagegaan, wanneer eiwitten met behulp van bovengenoemde stoffen werden opgelost.

OBERMAYER en PICK [106]) waren in staat door verschillende chemische stoffen, o.a. door loog, op eiwit te laten inwerken, de zoogenaamde constitutieve specifiteit zoodanig te wijzigen, dat bij immunisatie van proefdieren met deze kunstmatige eiwitten een groote reeks specifiek

werkende immuunsera ontstonden, die in hun eigenschappen alle van elkaar verschilden.

Het aantal immuunlichamen was echter grooter dan het aantal bij één dier geinjiceerde stoffen. Men verklaart dit, door de aanwezigheid aan te nemen van een groot aantal partieele praecipitinen, overeenkomende met de verschillende veranderingen, die het immuniseerende produkt gedurende de chemische inwerking ondergaan had. Deze partieele praecipitinen waren door de verzadigingsmethode van elkaar te onderscheiden. Men duidt het verschijnsel aan door te zeggen, dat zulk een serum „een vergroote reactie breedte" bezit.

SCHÜTZE [112]) onderzcht het immunologische gedrag van eiwitten, die door ingrijpende chemische behandeling gedeeltelijk gedestrueerd waren. Het antigeen werd op de volgende wijze bereid:

Nadat 500 gr menschelijk spierweefsel was fijngehakt, werd het in 1 L. water gedurende een half uur gekookt. Het afgefiltreerde neerslag werd in 500 cc kokende ½% NaOH oplossing wederom opgelost. De hierbij in oplossing gegane eiwitten werden door toevoeging van azijnzuur neergeslagen en daarna gewasschen met alkohol en aether. Het neerslag werd daarop wederom opgelost in een zwakke sodaoplossing.

Met behulp van deze vloeistof werden konijnen geimmuniseerd, door gedurende 3 tot 4 weken om de 2 of 3 dagen 10 tot 15 cc in te spuiten. Na inspuiting van in totaal 90—100 cc vloeistof per konijn, werden de sera gewonnen.

Wanneer 0.8—1 cc van dit serum werd samengebracht met 6 cc van de injectievloeistof, trad na weinige minuten troebeling op.

„Physiologisch" konijnenserum gaf geen troebeling, wanneer het met deze injectievloeistof werd samengebracht.

Het antiserum reageerde niet met eiwithoudende menschenurine of menschen- en caviabloed.

Op geheel dezelfde wijze werd door PIORKOWSKI [113]) een serum bereid tegen paardenvleesch, dat met loog was behandeld. Dit serum gaf positieve reactie met alkalisch extract van natief en gekookt paardenvleesch, echter geen reactie met alkalische extracten uit schapen- en varkensvleesch.

MICHAELIS [90]) liet een mengsel van pepsine en zoutzuur op serumeiwit inwerken en verkreeg op deze wijze een oplossing van eiwit, dat min of meer „afgebroken" was. Door hiermede konijnen te immuniseeren, verkreeg hij praecipiteerende sera met een zoogenaamde „vergroote" reactiebreedte. Zij gaven niet alleen reactie met de injectievloeistof, maar ook met genuin — dus niet met pepsinezoutzuur behandeld — serumeiwit.

OBERMAYER en PICK [106]) onderzochten de praecipitogeen-werkzaamheid van alkalialbuminaat. Het bleek hun, dat bij omzetting van eiwit in alkalialbuminaat een overeenkomstig proces plaats vond, als bij verhitting van eiwit. In beide gevallen vonden, uit serologisch oogpunt bezien, noch ingrijpende wijzigingen in de structuur, noch andere belangrijke veranderingen plaats. De soortspecifiteit bleef na beide behandelingen behouden; de constitutieve specifiteit veranderde alleen. Het antiserum tegen alkalialbuminaat reageerde praktisch even sterk met acidalbuminaat als met alkalialbuminaat.

Pepsine verstoorde, zoodra alle coaguleerbaar eiwit was omgezet, de potentie om immuunlichamen op te wekken. Door inwerking van trypsine op gecoaguleerd runderserum of ei-wit bleven de eiwitten hun immuniseerend vermogen behouden, evenals hun soortspecifiteit.

WELLS [99]) merkte op, dat omzetting van albumine in acidalbuminaat niet het vermogen om „anaphylaxie" bij caviae op te wekken vernietigde, wanneer de dieren gesensibiliseerd waren met albumine; sensibilisatie met albuminaat bleek niet mogelijk te zijn.

W. A. SCHMIDT [97-114]) bereidde op de volgende wijze een *alcalische eiwitoplossing*, die als antigeen dienst deed:

60 cc paardenserum werd met een gelijke volume physiologisch keukenzoutoplossing verdund en gedurende een half uur in een waterbad bij 70° C. verwarmd. Door de toegepaste verdunning trad geen coaguleering van het eiwit op. Vervolgens werd bij deze vloeistof 10 cc 1 N. NaOH-oplossing gevoegd, waarna het geheel nog gedurende 15 tot 20 minuten op 70° C. werd verhit. Onder invloed van de natronloog werd de eenigszins dikvloeibare grijze massa weer dun vloeibaar en helder. Na toevoeging van 7 tot 8 cc 1 N. HCL werd de vloeistof, die dan nog zwak alkalisch was, afgekoeld en direct bij konijnen ingespoten. Ieder konijn kreeg 20 cc van deze vloeistof intraperitoneaal geinjiceerd. Na 5 tot 10 dergelijke injecties werden bruikbare sera verkregen.

De werkzaamheid van deze sera werd gecontroleerd met behulp van een eiwitoplossing, die op de volgende wijze bereid was:

Paardenserum, dat met een kleine hoeveelheid water was verdund, werd in een kokend waterbad gedurende drie uren verhit. De gedurende deze verhitting ontstane coagulae werden, om ieder spoor van niet gecoaguleerd eiwit te verwijderen, grondig met physiologische keukenzoutoplossing uitgewasschen. Daarna werden zij gedroogd en tot poeder fijngemaakt. Een mespunt van dit poeder werd in een reageerbuis met ongeveer 10 cc van een keukenzout-bevattende 0.1 N. NaOH-oplossing gedurende 10 tot 20 minuten bij 60°—70° C. in een waterbad verhit. Gedurende dien tijd zwol het serum op en loste het langzaam op. Wanneer het eiwit bijna opgelost was, werd de massa uitgegoten in een kleine hoeveelheid koude physiologische keukenzoutoplossing en daarna gefiltreerd. Na neutralisatie met 1/20 N. HCL tot een zwak alkalische reactie, was de vloeistof gereed.

Het immuunserum reageerde met deze vloeistof tot in vrij groote verdunning; deze reactie bleek soortspecifiek te zijn.

Een praecipitaat werd eveneens verkregen, wanneer het serum werd samengebracht met *natief* paardenserum, dat met loog behandeld was. De reactie was optimaal, wanneer de looginwerking zoo sterk was, dat de oplossing juist niet meer reageerde met een immuunserum, verkregen door injectie van natief paardenserum. Verder werd ook reactie verkregen met verhit, doch niet gecoaguleerd paardenserum, zonder dat een behandeling met loog noodig was.

In verband met de eigenschappen van dit serum beveelt S. aan, een extract van verhit vleesch, waarvan niet bekend is van welke diersoort het afkomstig is, steeds ook te onderzoeken met „natief" serum. Hij adviseert slechts in noodgevallen een loogbehandeling van het materiaal toe te passen.

Pogingen, om een serum te bereiden door proefdieren te immuniseeren met spiereiwit, dat met loog was behandeld, leidden niet tot het gewenschte resultaat.

De onderzoekingen van SCHMIDT werden gecontroleerd door CHAPCHEV [115]), waarbij de meritis van deze methode aan de eischen der praktijk werden getoetst. C. kwam daarbij tot de volgende conclusie:

1e De specifiteit van de praecipitine ten aanzien van gedenatureerd eiwit is betrekkelijk slecht.

2e De reactie van deze praecipitine met gedenatureerd spiereiwit is heel zwak.

Ter opheffing van deze bezwaren werd getracht een serum te bereiden door injectie van spierperssap, dat met alkali gedenatureerd was. Ook dit serum had geen hooge titer en was gering specifiek.

SCHENK en BURMEISTER [116]) trachtten op overeenkomstige wijze aardappeleiwit te differentieeren. Zij immuniseerden hun konijnen door injectie van aardappeleiwitalbuminaat.

Dit albuminaat werd op de volgende wijze bereid:

Een extract van geraspte rauwe aardappelen werd verhit op 70° C. en aangezuurd met enkele druppels zoutzuur. Het tijdens deze behandeling gevormde neerslag werd opgelost in 10% NaOH-oplossing, zoo noodig onder verhitting op 70° C. Deze vloeistof werd gedialyseerd om de overmaat loog te verwijderen, totdat de reactie zwak alkalisch was.

Zij werd in hoeveelheden van 5 cc bij konijnen intraveneus ingespoten. Reeds na 4 injecties, die om de 5 dagen waren toegediend, had het serum een titer bereikt, die voldoende hoog was.

Bij aflezing volgens de ringreactie [1]) bedroeg de titer van het beste serum 1 op 73937, waarbij de antigeenverdunning werd berekend voor zuiver watervrij eiwit.

[1]) Zie Hoofdstuk III, blz. 39.

Het serum reageerde niet met alkalialbuminaat uit rogge, haver of tarwe.

Het bleek mogelijk een toevoeging van 10% aardappelmeel aan brood nog aan te toonen, door dit brood met loog te behandelen en het aldus verkregen extract met het „aardappel-albuminaat-serum" te onderzoeken.

Eiwit in pharmaceutische eiwitpraeparaten heeft volgens SCHENK [117]) tijdens de bereiding deels door colloidale, deels door chemische binding, deels door hooge verhitting, zijn genuine eigenschappen meer of minder verloren, zoodat het onderzoek naar de herkomst daarvan met een natief eiwitpraecipiteerend serum slechts bezwaarlijk of in het geheel niet meer mogelijk is.

Door S. werd getracht de herkomst van deze praeparaten te bepalen met behulp van een serum tegen alkalialbuminaat uit kippeneiwit. De bereiding der injectievloeistof geschiedde als volgt:

Kippenei-wit werd met een viervoudige hoeveelheid physiologische zoutoplossing verdund. Door koken werd het gecoaguleerd en nadat het viermaal met water gedecanteerd was, werd het gesuspendeerd in water. Nadat de suspensie op een temperatuur van 70° C. was gebracht, werd druppelsgewijs een 10% NaOH-oplossing toegevoegd, totdat alle eiwit opgelost was. Daarna werd de vloeistof nog gedurende 20 minuten op een temperatuur van 70° C. gehouden. Om de loog uit de oplossing te verwijderen, werd 1 tot 2 dagen gedialyseerd. Na neutralisatie met zoutzuur werd de vloeistof nog tienvoudig verdund en intraveneus bij konijnen ingespoten.

Telkens om de 5 tot 8 dagen werd een injectie van 5 cc gegeven. Na het toedienen van 5 inspuitingen was de titer der sera voldoende hoog en werden ze verzameld.

„Tannine-albuminaat" werd, vóór het met dit serum onderzocht werd, behandeld met loog en daarna geneutraliseerd. Wanneer het albuminaat was bereid uit kippenei-wit, werd met dit serum een positieve reactie verkregen; was het bereid uit andere eiwitten, dan was de reactie negatief.

Het gelukte echter niet rundereiwit in „tannine-albuminaat" aan te toonen met sera, die op overeenkomstige wijze bereid waren met serumeiwit van het rund.

„Liquor-ferri-albuminati" gaf in onveranderden toestand een positieve reactie met natief kippenei-wit praecipiteerend serum.

Na behandeling met loog werd eveneens reactie verkregen met sera tegen alkalialbuminaat uit kippenei-wit.

ROSENBERG [120]) wekte soortspecifieke praecipitine op door injectie van gecoaguleerd bloedserum volgens FUJIWARA (zie blz. 110.) Deze

praecipitine gaf niet alleen een soortspecifiek neerslag met natief bloedserum, doch ook met door verhittting gecoaguleerd eiwit, dat na gepulveriseerd te zijn, wederom opgelost was volgens de methode van W. A. SCHMIDT.

Verder bereidde R. sera door injectie van gecoaguleerd bloedserum, dat met loog was opgelost. Deze sera reageerden niet alleen specifiek met de injectievloeistof, maar eveneens met verwarmd bloedserum, alsook met natief bloedserum. R. kwam op grond van zijn onderzoekingen tot de conclusie, dat sera bereid volgens SCHMIDT of FUJIWARA, bij het onderzoek van gekookte worst en vleeschwaren betere resultaten geven, dan sera bereid door injectie van natieve eiwitten.

WU, TEN BROECK en LI [121]) deden mededeeling over uitgebreide onderzoekingen omtrent de antigeen-eigenschappen van proteinen, die door zuur, alkali, alkohol of verhitting gedenatureerd waren.

Zuuralbuminaat werd bereid door toevoeging van 500 cc 0.1 N. zoutzuur aan 500 cc van een 1% eialbumineoplossing, waarna men het zuur gedurende 3 dagen bij kamertemperatuur liet inwerken. Het gevormde albuminaat werd gepraecipiteerd door neutralisatie en wederom opgelost in 200 cc water, waaraan 50 cc 0.1 N. HCl was toegevoegd.

Alkalialbuminaat werd bereid door toevoeging van 500 cc 0.1 N. NaOH aan 500 cc van een 1% eialbumineoplossing, terwijl de loog gedurende 2 dagen bij kamertemperatuur inwerkte. Het albuminaat ,dat uitvlokte door de vloeistof te neutraliseeren, werd weer in oplossing gebracht met 200 cc water en 30 cc 0.1 N. NaOH.

Verder werd albumine door verhitting in zuur-, alkalisch- en neutraal milieu gedenatureerd. Aan telkens 300 cc van een 1% albumineoplossing werd respectievelijk 1.5 cc 1 N. HCl en 1.5 cc 1 N. Na_2CO_3 toegoevoegd, terwijl bij verhitting in neutraal milieu iedere toevoeging achterwege bleef.

Coaguleering van de albumineoplossing, tijdens de verhitting gedurende 1 uur in kokend water, werd voorkomen door deze oplossing tevoren afdoende te dialyseeren.

Alkoholdenatureering werd bewerkstelligd, door bij 100 cc van een 1% eialbumineoplossing 4 cc van een 1 N. Na_2CO_3-oplossing, 16 cc water en 80 cc alkohol van 95%, toe te voegen. De alkoholinwerking vond plaats gedurende één nacht.

Met alle bovenomschreven oplossingen van gedenatureerd albumine werden konijnen geimmuniseerd.

Bij de onderzoekingen met behulp van aldus verkregen praecipiteerende sera bleek, dat de antigeen-functie van het albumine door de denatureering verminderd was. De oorspronkelijke specifiteit was verdwenen, terwijl een nieuwe specifiteit was opgetreden. Tevens bleek, dat een antiserum, ontstaan door injectie van één dezer gedenatureerde albuminen, reageerde met alle gedenatureerde albuminen, zij het in iets verschillende mate.

De onderzoekers concludeerden op grond van deze uitkomsten, dat alle beschreven gedenatureerde eiwitten nauw aan elkaar verwant zijn.

Dat de looginwerking op eiwitten ook zoo sterk kan zijn, dat de antigeen-eigenschappen volkomen verloren gaan, bewezen LANDSTEINER en BARRON [118]) en TEN BROEK [119]). De eersten behandelden serumeiwit met 1 N. NaOH gedurende 16 uur bij kamertemperatuur; de tweede behandelden eiwit met loog van dezelfde sterkte gedurende drie weken bij 37° C.

In beide gevallen was de antigeen-functie der eiwitten door deze behandeling verloren gegaan.

b. Samenvatting.

Op grond van de bovenvermelde onderzoekingen mag worden aangenomen, dat door *verhitting* de soortspecifiteit van eiwit niet verloren gaat. Wel blijkt, dat de oorspronkelijke specifiteit, eigen aan „onverhit-natief-"eiwit, door verwarming gedeeltelijk verdwijnt, hetgeen zich uit in de sterk verminderde reageerbaarheid van „verhit-eiwit" tegenover een praecipiteerend serum, dat verkregen werd door injectie van hetzelfde eiwit in onverwarmden toestand.

Wordt echter voor de immunisatie *verhit* eiwit gebruikt, dan blijkt uit de eigenschappen van een aldus verkregen immuunserum, dat de praecipitogeen-functie van eiwit door verhitting allerminst verloren is gegaan. Een dergelijk verhit eiwit geeft namelijk een uitstekende reactie met het homologe serum.

Verder volgt uit de besproken literatuur, dat laatstgenoemd serum een zoogenaamde vergroote reactiebreedte bezit. Het geeft namelijk niet alleen reactie met de injectievloeistof, in casu een oplossing van verhit eiwit, maar eveneens met onverhit eiwit evenals met een reeks van „afbraakprodukten" van het homologe eiwit. *Tevens is de sterkte der verwantschapsreactie toegenomen.*

Redelijkerwijs mag worden aangenomen, dat bij *coagulatie* van een eiwit door verhitting, de hierboven besproken verschijnselen eveneens aanwezig zijn, immers coagulatie is een agglutinatie van door verhitting gedenatureerd eiwit. Door coagulatie gaan in wezen de antigeen-eigenschappen niet verloren, alleen de reageerbaarheid in vitro verdwijnt, doordat het eiwit onoplosbaar is geworden. De door de coaguleering verloren gegane reageerbaarheid kan weer hersteld worden, door het eiwit met chemische agentia of enzymen wederom in oplossing te brengen.

Zeer opmerkelijk is hierbij het feit, dat ondanks coaguleering en

heroplossing van het eiwit, de soortspecifieke eigenschappen niet teloor zijn gegaan. Bij deze heroplossing treedt wederom een vergrooting der reactiebreedte op bij antisera, die zijn ontstaan door injectie van dergelijke produkten. (OBERMAYER en PICK).

c. Keuze der methode van oplossing van gecoaguleerde eendeneibestanddeelen.

Het bij toenemende verhitting vrij plotseling verdwijnen der reactie met „natief" eendeneipraecipiteerend serum van „consumptieijs", dat eendeneibestanddeelen bevat, moet ons inziens worden toegeschreven aan de coaguleering der eibestanddeelen. Wij namen namelijk waar, dat het verdwijnen der reactie juist optreedt bij zoodanige verwarming, dat de ijsmix dik vloeibaar wordt, terwijl, wanneer het eigehalte groot genoeg is, zichtbare coagulae optreden.

Om dergelijke „gecoaguleerde" eibestanddeelen met behulp van de praecipitatiereactie te kunnen differentieeren, moeten deze wederom in oplossing worden gebracht. Hierbij zou gebruik gemaakt kunnen worden van fermenten (pepsine b.v.). Echter moet men bij het onderzoek van eet- en drinkwaren rekening houden met de aanwezigheid van zeer uiteenloopende stoffen, die de enzymwerking zouden kunnen belemmeren. Volgens OPPENHEIMER en KUHN [122]) beinvloeden een groot aantal stoffen, zooals neutrale zouten, capillair-actieve organische stoffen (alkohol) en conserveermiddelen, enzymatische processen veelal in ongunstigen zin. Daar veel van deze stoffen in eet- en drinkwaren voorhanden kunnen zijn, meenen wij, dat deze methode voor ons doel minder geschikt is.

Van de chemische agentia, die in staat zijn gecoaguleerde eiwitten weer in oplossing te brengen, zonder de soortspecifieke eigenschappen te destrueeren, is natronloog in niet te sterke concentratie het meest gebruikt.

Zonder de mogelijkheid te willen uitsluiten, om met andere eiwitoplossende middelen dan loog tot het doel te geraken, werd besloten natronloog te gebruiken om gecoaguleerde eibestanddeelen op te lossen en met deze opgeloste eiwitten in geneutraliseerden toestand konijnen te immuniseeren.

Par. 2. Bereiding van „eendenei-NaOH"-serum.

a. Bereiding der injectievloeistof.

Twee eendeneieren werden in een waterbad verwarmd tot 85° C. en gedurende 20 minuten bij deze temperatuur gehouden. De geheele inhoud der eieren was door deze verhitting gecoaguleerd.

Met goed gereinigde en daarna met spiritus dilutis ontsmette handen, werden de eieren gepeld. De eieren werden door een gesteriliseerde zeef verkleind en daarna opgevangen in een steriel bekerglas.

Twee manieren van oplossing der gecoaguleerde eibestanddeelen werden beproefd:

a. Per geheel eendenei werd toegevoegd 150 cc 0.1 N. NaOH.

b. Per gram eendenei werd toegevoegd 4 cc 0.2 N. NaOH, dus per geheel ei ongeveer 275 cc loog van deze sterkte.

De verdere behandeling was in beide gevallen precies dezelfde.

Direct na de loogtoevoeging werd de massa in een waterbad op een temperatuur van 45° C. gebracht en in een broedstoof van 45° C. geplaatst. Na een verblijf van twee uren in de stoof werd de vloeistof geneutraliseerd met ½ N. zoutzuur, terwijl als indicator phenolphtaleïne werd gebruikt. Door de troebelheid der oplossing, alsmede door het feit, dat de aanwezige dooierkleurstof zelf min of meer als indicator werkt, is de bij deze neutralisatie optredende kleuromslag niet gemakkelijk waarneembaar. Men verkrijgt echter spoedig eenige routine, door steeds te controleeren of nog roodkleuring wordt waargenomen, wanneer men een druppel phenolphtaleïne voorzichtig op de vloeistof laat vallen. Is dit juist niet meer het geval dan is de neutraliseering voltooid.

Na deze neutraliseering werd het keukenzout gehalte der vloeistof op 0.9% gebracht door toevoeging van respectievelijk 2.9 gr en 400 mg keukenzout per L. De hoeveelheid keukenzout, die de vloeistof bevatte en derhalve de hoeveelheid, die moest worden toegevoegd om het gehalte op 0.9% te brengen, werd als volgt berekend. Het volume van een gram ei werd benaderend gelijkgesteld met 1 cc, terwijl de vloeistof, die ei physiologisch bevat, geacht werd een zoutconcentratie te bezitten van 0.9%.

Aan de eibestanddeelen wordt loog toegevoegd, terwijl later neutralisatie plaats vindt. Hierbij wordt keukenzout gevormd. Echter niet alle loog, die werd toegevoegd wordt teruggetitreerd, omdat het loogbindend vermogen van de eiwitten oorzaak is, dat een deel der OH-ionen gebonden blijft. Dit loogbindend vermogen is afhankelijk van de pH, die bestaat tijdens de looginwerking, van de temperatuur, waarbij de loog inwerkt en van den duur der looginwerking. Basis voor de berekening van het keukenzoutgehalte is derhalve de hoeveelheid zoutzuur, die noodig is om de eioplossing te neutraliseeren.

Cryoscopisch onderzoek bevestigde de juistheid van dit berekende zoutgehalte. Voor uitvoeriger gegevens zie TILLMANS en HIRSCH [124]).

De vloeistof werd tenslotte door steriel neteldoek gefiltreerd en was hierna gereed voor injectie.

b. Immunisatie der proefdieren.

De bovenomschreven eioplossing werd voor iedere injectie opnieuw bereid; de injectie vond intraperitoneaal plaats op een wijze, zooals in de Tweede Afdeeling reeds werd beschreven. De temperatuur der vloeistof werd voor de inspuiting op 45° C. gebracht. Tweemaal per week, dus om de 3 of 4 dagen, werd het antigeen toegediend.

Wanneer de eibestanddeelen waren opgelost door toevoeging van 150 cc $^1/_{10}$ N. NaOH per eendenei, bedroegen de eerste 3 inspuitingen 10 cc, de 4e, de 5e en eventueel de 6e ongeveer 40 cc.

De injecties van 10 cc werden geappliceerd met een recordspuit; die van 40 cc werden met behulp van canule, slang en trechter geinfundeerd.

Waren de eibestanddeelen opgelost door toevoeging van 4 cc $^1/_5$ N. NaOH per gram ei, dan bedroegen de eerste 3 injecties 5 cc, de 4e, de 5e en eventueel de 6e injectie ieder 10 cc.

c. Proeftitratie van het serum.

Een week na de 5e injectie bezat het serum van een deel der proefdieren reeds een voldoend hooge titer. Om dit te controleeren werd een kleine hoeveelheid bloed uit een der oorvenen afgetapt en het daaruit tredende serum verzameld en gecentrifugeerd.

De vloeistoffen, met behulp waarvan de titer van de sera werd bepaald, werden op de volgende wijze bereid:

Een eendenei werd gedurende 20 minuten in een waterbad op 85° C. verhit. Dooier en wit werden daarna gescheiden, waarbij om een volledige scheiding te verkrijgen, niet alle ei-wit en dooier beschikbaar kwamen. Het gecoaguleerde ei-wit werd daarna verkleind door middel van een steriele zeef.

Per gram ei-wit werd daarna 4 cc van een waterige $^1/_5$ N. NaOH-oplossing toegevoegd. Nadat deze massa op 45° C. was gebracht, werd ze gedurende 2 uren in een broedstoof van 45° C. geplaatst. Daarna vond neutralisatie plaats door toevoeging van $\frac{1}{2}$ N. HCl. tot de indicator phenolphtaleïne juist was omgeslagen.

De dooier werd afgewreven met behulp van een glazen stamper, waarbij per gram dooier 4 cc $^1/_5$ N. NaOH werd toegevoegd. Dit afwrijven, waarbij de loog bij kleine hoeveelheden werd toegevoegd, was noodig om een homogene emulsie te verkrijgen. De dooieremulsie werd eveneens op een temperatuur van 45°C. gebracht, waarna ze gedurende 2 uren in de broedstoof van 45°C. verbleef. Neutralisatie vond eveneens plaats door toevoeging van $\frac{1}{2}$ N. HCl. met als indicator phenolphtaleïne. Door toevoeging van een of meer druppels phenolphta-

leïne werd gecontroleerd of de neutraliseering voldoende was gevorderd.

Na de neutralisatie werd de ei-witoplossing, zoowel als de dooieroplossing, 1 op 5 verdund met een buffermengsel, bestaande uit gelijke deelen „physiologische keukenzoutoplossing" en „bufferoplossing" volgens CLARK en LUBS met een pH van 7.0, zooals KOLTHOFF [123]) deze aangeeft. Deze bufferoplossing wordt bereid door 29.63 cc 0.1 N. NaOH te voegen bij 50 cc 0.1 molair monokaliumphosphaat en aan te vullen met aqua destillata tot 100 cc. De pH van deze oplossing werd vergeleken met een standaardmengsel, verkregen door oplossing van een buffertabletje van apotheker Slis te Utrecht, waarbij broomthymolblauw als indicator werd gebruikt. Zoo noodig werd nog een kleine hoeveelheid natronloog toegevoegd om de juiste pH te verkrijgen.

Nadat de eioplossingen op deze wijze tot het vijfvoudige verdund waren, werden ze gedurende 10 minuten gecentrifugeerd. De aldus verkregen vloeistof werd daarna nog 2000 keer verdund met gewone physiologische keukenzoutoplossing (totale verdunning der eiwitoplossing 1 op 10000.) Er diende zorg te worden gedragen, dat het roomlaagje, dat zich tijdens het centrifugeeren op de opgeloste dooier vormde, bij het ontnemen der vloeistof niet daarin uitwolkte.

Het centrifugebuisje werd daarom, tijdens het inbrengen van de punt der pipet in de vloeistof, scheef gehouden, zoodat het vloeistofoppervlak grooter werd dan het oppervlak van het roomlaagje en de pipet naast de roomlaag kon worden ingebracht. De vetlaag hechtte zich op deze wijze aan den buitenkant van de pipet en kon onder den waterstraal worden afgespoeld.

Met behulp der ringreactie, zooals beschreven in Hoofdstuk III (blz. 39), werden de uit de proefbloedingen verkregen sera met deze vloeistoffen onderzocht.

Wanneer na 20 minuten of eerder een positieve reactie optrad, werd de titer der sera voldoende hoog geacht en werden derhalve de konijnen den volgenden dag gedood. Was de titer der sera nog niet voldoende hoog, dan werd een 6e injectie gegeven en de konijnen een week hierna verbloed.

De konijnen genummerd 81, 82 en 83 werden 6 keer ingespoten, de konijnen genummerd 84, 85 en 86 ontvingen in 't geheel 5 injecties. De immunisatie vond plaats met eibestanddeelen, die door middel van 4 cc $^1/_5$ N. NaOH per gram ei, in oplossing waren gebracht.

Een overzicht van deze proeftitraties bij de bereiding der sera 81,

82, 83, 84, 85 en 86 geeft tabel 20. In deze tabel werden de op bovenomschreven wijze met loog behandelde eibestanddeelen respectievelijk met E.W. NaOH en E.D.NaOH aangeduid. Opgemerkt mag worden, dat de verdunning „E.W.NaOH 1/10000", de verdunning van de vloeistof nà de loogbehandeling en neutralisatie voorstelt, zoodat de werkelijke eiverdunning belangrijk grooter was, temeer, omdat niet mag worden aangenomen, dat alle eibestanddeelen in oplossing waren gegaan.

TABEL 20.

E.W.NaOH	1/10000	1/10000	1/10000	1/10000	1/10000	1/10000
Serum	81	82	83	84	85	86
Uitslag en tijd	45 m —	45 m —	45 m —	15 m +	20 m +	20 m +
E.D.NaOH	1/10000	1/10000	1/10000	1/10000	1/10000	1/10000
Serum	81	82	83	84	85	86
Uitslag en tijd	45 m —	45 m —	45 m —	20 m +	20 m +	20 m +

Zooals tabel 20 toont was de titer der sera, afkomstig van de konijnen 84, 85 en 86, voldoende hoog, zoodat van deze dieren reeds na 5 injecties het serum gewonnen kon worden.

De konijnen 81, 82 en 83 waren nog niet voldoende geimmuniseerd en kregen derhalve nog een zesde injectie. Een week na deze injectie werden deze proefdieren door verbloeding gedood. De sera bleken bij onderzoek toen een voldoende sterkte te hebben.

d. Verzameling van het serum.

Nadat bij de proeftitratie gebleken was, dat de werkzaamheid der sera voldoende geacht mocht worden, werden de konijnen in lichte chloroform-aethernarcose uit de arteria carotis verbloed op dezelfde wijze als reeds in Hoofdstuk III werd aangegeven. Het bloed werd gedurende een nacht in een koelen kelder bewaard en het uitgetreden serum den volgenden dag gefiltreerd en gecentrifugeerd. De bloedkoek werd daarna gedurende enkele uren bij kamertemperatuur onder een steriele petrischaal op het filter bewaard en verloor op die wijze nog een aanzienlijke hoeveelheid serum.

Conserveering van het serum vond plaats door toevoeging per 50 cc serum van 1 cc 5% carbol in physiologische zoutoplossing, onder licht schudden van het serum, om neerslagvorming te voorkomen. Het serum werd verder in de ijskast bewaard.

Par. 3. Eerste titer- en specifiteitsbepaling.

De bovenomschreven sera waren bestemd om in voedings- en genotmiddelen eendeneibestanddeelen in gecoaguleerden toestand te differentieeren. Aangezien eiwitten alleen in opgelosten toestand kunnen reageeren met een praecipiteerend serum, dienen eventueele, over 't algemeen in een relatief klein percentage in voedingsmiddelen voorkomende gecoaguleerde eibestanddeelen, met behulp van loog weer in oplossing te worden gebracht. Teneinde eenig inzicht te verkrijgen in de hiervoor geldende wetmatigheden, werden door ons een aantal omvangrijke voorbereidende onderzoekingen verricht. Een korte bespreking van de resultaten van een deel daarvan moge hier volgen.

De door loogbehandeling van voedingsmiddelen verkregen oplossingen zijn over 't algemeen troebel, maar worden door centrifugeering en verdunning voldoende helder.

Deze verdunning moet echter zoo gering mogelijk gehouden worden om nog een zichtbaar neerslag bij de praecipitatiereactie te krijgen. Oplossing van gecoaguleerd eendenei in onvermengden toestand met de daarbij behoorende optimale looghoeveelheid levert, blijkbaar door gunstiger verloopende hydrolyse, een veel grootere hoeveelheid soortspecifieke afbraakprodukten op. Titerbepaling der sera met deze laatste vloeistof geeft dus veel hoogere waarden, dan titerbepaling onder meer praktisch voorkomende omstandigheden. Niet alleen, dat de homologe titer hoog is met deze vloeistof, ook de titer met het in zuiveren toestand opgeloste verwante eiwit is hoog.

Daarnaast levert de oplossing der eibestanddeelen, die met een relatief groot percentage andere stoffen gemengd zijn, zelfs met een „optimale" hoeveelheid loog, een betrekkelijk kleine hoeveelheid soortspecifieke afbraakprodukten op. De homologe titer der sera met deze in de praktijk voorkomende vloeistoffen is dus niet zoo hoog, als bij onderzoek van eendenei in onvermengden toestand wordt waargenomen. Doch ook de verwantschapsreactie met kippeneibestanddeelen is onder deze omstandigheden minder hoog.

Zooals in par. 4 nog zal worden aangetoond, treedt door de specifieke verzadiging der sera een aanmerkelijke homologe titerverlaging

op. Deze titerverlaging is sterker, naarmate een sterkere verzadiging wordt toegepast, zoodat het zelfs kan voorkomen, dat de homologe titer onvoldoende wordt om onder minder gunstige omstandigheden nog positieve reacties met de homologe praecipitogeen-stof te verkrijgen. Deze minder gunstige omstandigheden doen zich in het bijzonder voor, wanneer voedings- of genotmiddelen, die relatief kleine percentages ei bevatten, met loog worden behandeld.

Vandaar, dat het noodzakelijk is de verwantschapsreacties niet verder door verzadiging terug te dringen, dan voor praktisch gebruik noodzakelijk is. Het verdient dus aanbeveling deze verzadiging te bewerkstelligen aan de hand van vloeistoffen, die wat eigehalte betreft, overeenkomen met in de praktijk voorkomende.

Onder deze omstandigheden is het verkieslijk eveneens de titerbepalingen met dergelijke vloeistoffen te verrichten.

Deze titerbepalingsvloeistoffen werden als volgt bereid:

Een 15% oplossing van natief ei-wit in physiologische keukenzoutoplossing werd in een waterbad verwarmd tot 95° C. en gedurende enkele minuten op deze temperatuur gehouden. Het ei-wit was door deze behandeling meer of minder sterk gecoaguleerd.

Bij 10 gram van deze massa werd 17 cc $^1/_5$ N. loog gevoegd. Deze loog bestond voor 5 deelen uit waterige $^1/_5$ N. NaOH en voor 1 deel uit alkoholische loog van dezelfde sterkte. Na deze loogtoevoeging werden de oplossingen in een waterbad op 45°C. gebracht en gedurende 2 uren in een broedstoof op deze temperatuur gehouden. Gedurende dezen tijd was het min of meer gecoaguleerde ei-wit weer volledig opgelost. Daarna vond neutralisatie plaats door toevoeging van $\frac{1}{2}$ N. HCl, waarbij als indicator phenolphtaleïne werd gebruikt.

De titerbepalingsvloeistof voor dooier werd bereid door een 15% oplossing van dooier *in melk* gedurende enkele minuten te verhitten op 95°C. Bij 10 gram van deze massa werd 35 cc $^1/_5$ N. loog gevoegd. Deze loog bestond uit een mengsel van 3 deelen waterige $^1/_5$ N. NaOH en 1 deel $^1/_5$ N. NaOH in 75 % aceton. Evenals de ei-witoplossingen werden de dooieroplossingen daarna op een temperatuur van 45°C. gebracht en in een broedstoof gedurende 2 uren op deze temperatuur gehouden.

Na de neutralisatie werden zoowel de ei-wit- als de dooieroplossingen 1 op 5 verdund met een gebufferde physiologische keukenzoutoplossing, welke een pH van 7.0 had; zij werden daarna gedurende 10 minuten gecentrifugeerd. Verdere verdunning van deze vloeistoffen vond plaats met physiologische keukenzoutoplossing. Bij deze verdunning werd zorgvuldig vermeden, dat afgecentrifugeerd sediment of room uit het centrifugebuisje werd overgebracht.

a. Titer- en specifiteitsbepaling.

De bovenomschreven eioplossingen werden voor de titerbepalingen in verdunden toestand gebruikt, waarbij de verdunning genoteerd werd, welke plaats vond na de zoojuist beschreven neutraliseering.

De oplossingen werden als volgt omschreven:

Een 15% *eendenei-wit*oplossing werd aangeduid met E.W.15% NaOH, een 15% *kippenei-wit*oplossing als K.W.15% NaOH, een 15% *eendendooier*oplossing als E.D.15% NaOH en een 15% *kippendooier*-oplossing als K.D.15% NaOH.

TABEL 21.

Uitslag en tijd der praecipitine-reactie bij de titer- en specifiteitsbepaling van eendenei-NaOH sera.

	Antigeen oplossing		Nummers der sera					
	Verdunning	Aard	81	82	83	84	85	86
Onderzoek van ei-wit-oplossingen	1/25	*E*.W. 15% NaOH	3 m +	2 m +	3 m +	2 m +	2 m +	2 m +
		K.W. 15% NaOH	3 m +	2 m +	5 m +	2 m +	2 m +	3 m +
	1/125	*E*.W. 15% NaOH	5 m +	4 m +	6 m +	5 m +	5 m +	5 m +
		K.W. 15% NaOH	6 m +	4 m +	6 m +	3 m +	4 m +	5 m +
	1/625	*E*.W. 15% NaOH	8 m +	7 m +	10 m +	6 m +	7 m +	7 m +
		K.W. 15% NaOH	15 m +	13 m +	20 m +	15 m +	10 m +	15 m +
Onderzoek van dooieroplossingen	1/25	*E*.D. 15% NaOH	5 m +	5 m +	6 m +	5 m +	7 m +	4 m +
		K.D. 15% NaOH	5 m +	5 m +	6 m +	5 m +	6 m +	6 m +
	1/125	*E*.D. 15% NaOH	4 m +	4 m +	5 m +	6 m +	6 m +	4 m +
		K.D. 15% NaOH	8 m +	8 m +	12 m +	8 m +	12 m +	10 m +
	1/625	*E*.D. 15% NaOH	25 m +	20 m +	30 m +	35 m +	35 m +	25 m +
		K.D. 15% NaOH	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —

Bij dit onderzoek werd afgeweken van de gewoonlijk gevolgde methode (men zie bijv. tabel 1 blz. 41) om de opeenvolgende verdunningen der praecipitogeen-stof tienvoudig te doen opklimmen. Het is bij ons bij dit soort van onderzoekingen doelmatiger gebleken, de verdunningen slechts vijfvoudig te doen opklimmen.

Bij het lezen van tabel 21 valt op, dat er zoowel bij onderzoek van *eenden*eiwitoplossingen als van *kippen*eiwitoplossingen in de meeste gevallen practisch geen verschil bestaat in den tijd, die er verloopt, totdat een neerslag wordt waargenomen, wanneer deze oplossingen met hetzelfde antiserum in gelijke verdunning worden onderzocht.

Slechts in de laatste horizontale kolom, bij het onderzoek van dooieroplossingen in een verdunning van 1/625, blijkt, dat bij het onderzoek van *kippen*dooieroplossing het neerslag na 45 minuten meestal nog wegblijft, terwijl het bij onderzoek van *eenden*dooieroplossingen na 20 tot 35 minuten wordt waargenomen.

Uit deze tabel moet dus geconcludeerd worden, dat *het met behulp van deze* — niet verder behandelde — *sera niet mogelijk is, gecoaguleerde eendeneibestanddeelen met voldoende zekerheid te onderscheiden van gecoaguleerde kippeneibestanddeelen.* Deze conclusie wordt niet aangetast door het feit, dat deze sera — in tegenstelling met hetgeen bij het onderzoek van „natieve eendeneiantisera" werd waargenomen — blijkbaar een iets grootere specifiteit bezitten bij de „dooierreactie" dan bij de „ei-witreactie".

Gebruik makende van de ervaringen, opgedaan bij het onderzoek, dat in de tweede afdeeling van dit proefschrift beschreven is, werd getracht door middel van verzadiging de specifiteit der sera op te voeren.

Par. 4. Specifieke verzadiging.

a. Bereiding der verzadigingsvloeistoffen.

Voordat werd overgegaan tot deze verzadiging, werd nagegaan welke de gunstigste looghoeveelheid is, waarmede gecoaguleerd kippenei moet worden opgelost, ten einde de „verwantschapsreacties" der tegen eendenei bereide sera met deze vloeistoffen zoo sterk mogelijk te doen zijn. De hydrolyse doet dan de verwante praecipitogeenbestanddeelen in maximale hoeveelheid ontstaan, zoodat een minimale hoeveelheid daarvan in staat is de gewenschte verzadiging te bewerkstelligen.

Het bleek, dat per gram kippenei 2 cc waterige $^1/_5$ N. NaOH moest worden toegevoegd, wanneer coaguleering der eibestanddeelen had plaats gevonden in een waterbad bij 85°C. gedurende 20 minuten. Na deze coaguleering werd het ei met goed gereinigde en ontsmette handen gepeld en ei-wit en dooier zorgvuldig gescheiden. Het ei-wit werd verkleind in een steriele zeef en opgevangen in een bekerglas, waarna loog werd toegevoegd.

De gecoaguleerde dooier werd afgewreven met 2 cc $^1/_5$ N. loog per gram dooier.

Na de loogtoevoeging werden de eisuspensies in een waterbad op een temperatuur van 45°C. gebracht en gedurende 2 uren in de broedstoof bij 45°C. geplaatst. Daarna vond neutralisatie plaats met $\frac{1}{2}$ N. HCl, waarbij als indicator phenolphtaleïne werd gebruikt. De pH der eioplossingen werd met behulp van Lyphan indicatorpapier zorgvuldig op 7.0 gebracht.

Het keukenzoutgehalte van de vloeistoffen werd daarna op 0.9% gebracht door toevoeging van 60 mgr droog keukenzout per L.

b. Uitvoering der verzadiging met opgelost kippenei-wit.

In gesteriliseerde centrifugebuisjes werd van ieder serum 6 keer 1 cc afgepipetteerd. De buisjes werden gemerkt met het nummer van het serum en bovendien met de cijfers 1 tot en met 6 (zie tabel 22).

Bij den inhoud der buisjes genummerd 1 tot en met 3 werd resp. gevoegd 0.025 cc, 0.05 cc en 0.1 cc van de bovenomschreven kippenei-witoplossing, 1 op 250 verdund met physiologische keukenzoutsolutie. Bij den inhoud der buisjes genummerd 4 tot en met 6 werden dezelfde hoeveelheden kippenei-witoplossing, nu 1 op 50 verdund, gevoegd.

Na deze eitoevoeging vond menging van het in de buisjes aan-

TABEL 22.

Toegevoegde K.W. NaOH oplossing							
Verdunning		K.W. NaOH 1 : 50			K.W. NaOH 1 : 250		
Hoeveelheid in cc's		0.025	0.05	0.1	0.025	0.05	0.1
Overeenkomend met een hoeveelheid onverdund K.W. NaOH in mm³'s		0.1	0.2	0.4	0.5	1	2
		Nummers der vervaardigde antisera					
Telkens 1 cc gecoaguleerd eendenei-antiserum van nevenstaande nummers	81	81_1	81_2	81_3	81_4	81_5	81_6
	82	82_1	82_2	82_3	82_4	82_5	82_6
	83	83_1	83_2	83_3	83_4	83_5	83_6
	84	84_1	84_2	84_3	84_4	84_5	84_6
	85	85_1	85_2	85_3	85_4	85_5	85_6
	86	86_1	86_2	86_3	86_4	86_5	86_6

wezige serum en de ei-witoplossing plaats. Deze mengsels werden daarop één nacht bij kamertemperatuur bewaard. Den volgenden dag werden de buisjes gecentrifugeerd, waardoor het neerslag tot een klein volume op den bodem der buisjes werd gecomprimeerd. De heldere sera konden nu gecontroleerd worden of voldoende verzadiging was opgetreden.

Voor de contrôle van deze „verzadigde" sera werd gebruik gemaakt van eioplossingen, zooals deze omschreven werden in Hoofdstuk V par. 3 blz. 123. De kippenei-witoplossing werd voor deze contrôle 1 op 125 verdund.

Uitgebreide proefnemingen hadden deze concentratie als de meest geeigende aangemerkt.

De tabellen 22 en 23 geven een overzicht van de inrichting der proefverzadigingen en de controleering van het resultaat daarvan.

TABEL 23.

Sera bereid volgens tabel 22 uit eendenei-antiserum No.	Tijd van aflezing en uitslag der praecipitatie-reacties met als antigeen een met 15% NaOH bereide oplossing van *kippenei-wit*, verdund 1/125.					
	1	2	3	4	5	6
81	7 m +	12 m +	20 m +	12 m +	30 m +	**45 m —**
82	4 m +	7 m +	9 m +	7 m +	12 m +	17 m +
83	12 m +	30 m +	45 m ±	45 m +	**45 m —**	**45 m —**
84	6 m +	10 m +	15 m +	13 m +	20 m +	30 m +
85	7 m +	8 m +	10 m +	8 m +	12 m +	35 m +
86	6 m +	8 m +	10 m +	8 m +	25 m +	45 m ±

Zooals de kolommen 5 en 6 van tabel 23 ons laten zien, zijn de sera 81_6 en 83_5 juist verzadigd. De geheele voorraad van die sera werd verzadigd overeenkomstig de behandeling, die de proeven 81_6 en 83_5, door toevoeging van resp. 2 mm^3 en 1 mm^3 verdunde met NaOH bereide „gecoaguleerde" kippenei-witoplossing per cc antiserum, hadden ondergaan.

Geen der andere proefbepalingen vertoont nog voldoende verzadiging, zoodat hiervan opnieuw proeven dienden te worden ingezet. Er werden wederom van ieder der sera 6 keer 1 cc in centrifugebuisjes afgepipetteerd, behalve van serum 86, waarvan slechts 3 keer 1 cc werd genomen. De uitslag van de eerste verzadiging, zooals

deze vermeld is in tabel 23, wekte namelijk het vermoeden, dat voldoende verzadiging spoedig zou zijn bereikt bij verhooging der doseering van de verwante ei-witoplossing.

Nadat ei-witoplossing en serum gedurende een nacht op elkaar hadden ingewerkt, werden de buisjes gecentrifugeerd en de verzadiging gecontroleerd.

De resultaten van deze proeven werden neergelegd in de tabellen 24 en 25.

TABEL 24.

Toegevoegde K.W. NaOH oplossing.							
Verdunning		K.W. NaOH 1 : 10			K.W. NaOH 1 : 2		
Hoeveelheid in cc's		0.025	0.05	0.1	0.025	0.05	0.1
Overeenkomend met een een hoeveelheid onverdund K.W. NaOH in mm³'s		2.5	5	10	12.5	25	50
		Nummers der vervaardigde sera					
Telkens 1 cc gecoaguleerd eendeneiantiserum van nevenstaande nummers	82	82_7	82_8	82_9	82_{10}	82_{11}	82_{12}
	84	84_7	84_8	84_9	84_{10}	84_{11}	84_{12}
	85	85_7	85_8	85_9	85_{10}	85_{11}	85_{12}
	86	86_7	86_8	86_9			

TABEL 25.

Sera bereid volgens tabel 24 uit eendenei-antiserum No.	Tijd van aflezing en uitslag der praecipitatie-reacties met als antigeen een „15% NaOH" oplossing van *kippenei-wit*, verdund 1/125					
	7	8	9	10	11	12
82	10 m +	15 m +	35 m +	45 m —	45 m —	45 m —
84	20 m +	30 m +	45 m ±	45 m —	45 m —	45 m —
85	20 m +	30 m +	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —
86	15 m +	45 m ±	45 m —			

Deze tabel laat zien, dat de proeven 82_{10}, 84_{10}, 85_9 en 86_9 juist voldoende verzadigd zijn, zoodat de geheele voorraad van deze sera dienovereenkomstig kon worden behandeld.

Hiervoor werden dus per cc antiserum toegevoegd:

aan serum No. 82 en 84, 12.5 mm³ verdunde „gecoaguleerde-kippenei-wit" opl.,
„ „ „ 85 „ 86, 10 mm³ „ „ „ „ „,
„ „ „ 83, 2 mm³ „ „ „ „ „,
„ „ „ 81, 1 mm³ „ „ „ „ „.

Deze hoeveelheden blijken geringer te zijn, dan noodig waren voor de verzadiging der natieve sera. (zie blz. 57).

De toevoeging van deze hoeveelheden geschiedde uit den aard onder gebruikmaking van de meest geschikte concentratie. Men zie hiervoor tabel 24.

Een dag na deze verzadiging werden de neerslagen afgefiltreerd door steriele papierfilters.

c. Uitvoering der verzadiging met opgeloste kippendooier.

Geheel overeenkomstig de verzadiging met kippenei-witoplossing werd ook de verzadiging der sera met kippendooieroplossing uitgevoerd. In steriele centrifugebuisjes werd telkens 1 cc der sera afgepipetteerd; de buisjes werden behalve met het nummer van het serum gemerkt met de letters a, b enz.

TABEL 26.

Toegevoegde K.D. NaOH oplossing							
Verdunning		K.D. NaOH 1 : 250			K.D. NaOH 1 : 50		
Hoeveelheid in cc's		0.025	0.05	0.1	0.025	0.05	0.1
Overeenkomend met een hoeveelheid onverdund K.D. NaOH in mm³'s		0.1	0.2	0.4	0.5	1	2
		Nummers der aldus bereide sera					
Telkens 1 cc gecoaguleerd eendeneiantiserum van nevenstaande nummers	81	81*a*	81*b*	81*c*	81*d*	81*e*	81*f*
	82	82*a*	82*b*	82*c*	82*d*	82*e*	82*f*
	83	83*a*	83*b*	83*c*	83*d*	83*e*	83*f*
	84	84*a*	84*b*	84*c*	84*d*	84*e*	84*f*
	85	85*a*	85*b*	85*c*	85*d*	85*e*	85*f*
	86	86*a*	86*b*	86*c*	86*d*	86*e*	86*f*

Aan de verschillende buisjes werd een opklimmende hoeveelheid kippendooieroplossing toegevoegd.

Den volgenden dag werden de sera helder afgecentrifugeerd en getest tegenover een kippendooieroplossing 1 op 25 verdund. In de tabellen 26 en 27 worden de resultaten van deze proefverzadigingen vermeld.

TABEL 27.

Sera bereid volgens tabel 26 uit eendenei-antiserum No.	Tijd van aflezing en uitslag der praecipitatie-reacties met als antigeen een „15% NaOH" oplossing van gecoaguleerde *kippendooier*, verdund 1/25					
	a	*b*	*c*	*d*	*e*	*f*
81	20 m +	45 m +	45 m ±	45 m ±	45 m ±	**45 m —**
82	8 m +	8 m +	10 m +	10 m +	12 m +	20 m +
83	45 m ±	45 m ±	**45 m —**	**45 m —**	**45 m —**	**45 m —**
84	20 m +	45 m +	45 m +	45 m +	45 m +	45 m +
85	45 m +	45 m +	45 m +	45 m +	**45 m —**	**45 m —**
86	15 m +	20 m +	30 m +	20 m +	30 m +	35 m +

Uit tabel 27 blijkt, dat de proefverzadigingen 81*f*, 83*c* en 85*e* geen neerslag meer gaven met een kippendooieroplossing 1 op 25 verdund. De geheele voorraad van deze sera kon dus verzadigd worden met een

TABEL 28.

	Toegevoegde K.D. NaOH oplossing					
Verdunning	K.D. NaOH 1 : 10			K.D. NaOH 1 : 2		
Hoeveelheid in cc's	0.025	0.05	0.1	0.025	0.05	0.1
Overeenkomende met een hoeveelheid onverdunde K.D. NaOH in mm³'s	2.5	5	10	12.5	25	50
	Nummers der aldus bereide sera					
Telkens 1 cc gecoaguleerd eendeneiantiserum van de nevenstaande nummers: 82	82*g*	82*h*	82*j*	82*k*	82*l*	82*m*
84	84*g*	84*h*	84*j*	84*k*	84*l*	84*m*
86	86*g*	86*h*	86*j*	86*k*	86*l*	86*m*

overeenkomstige hoeveelheid kippendooieroplossing. De proeven 82, 84 en 86 bleken geen van alle nog voldoende verzadigd te zijn, zoodat nieuwe moesten worden ingesteld. Deze proeven werden op geheel dezelfde wijze ingericht, met dit verschil echter, dat een grootere hoeveelheid kippendooier werd toegevoegd.

De tabellen 28 en 29 geven een verslag daarvan alsmede van de verzadigingscontrôle.

TABEL 29.

Sera bereid volgens tabel 28 uit eendenei-antiserum No.	Tijd van aflezing en uitslag der praecipitatie-reacties met als antigeen een „15% NaOH" oplossing van gecoaguleerde *kippendooier*, verdund 1/25					
	g	*h*	*j*	*k*	*l*	*m*
82	25 m +	45 m +	45 m —	45 m ±	45 m —	45 m —
84	45 m +	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —
86	45 m +	45 m —	45 m —	45 m —	45 m —	

Uit tabel 29 valt af te lezen, dat de proefbuisjes 82*j*, 84*h* en 86*h* juist voldoende verzadigd waren. Het monster 82*k* vormde een onregelmatigheid, waarvan de oorzaken niet konden worden achterhaald.

Deze sera werden derhalve overeenkomstig de bij de buisjes 82*j*, 84*h* en 86*h* gevoegde hoeveelheden „kippendooier" geheel verzadigd.

Deze hoeveelheden werden in de gewenschte concentratie, die uit tabel 28 kan worden afgelezen, bij het serum gevoegd.

Voor de verzadiging der diverse sera werd dus per cc gebruikt:

voor serum No. 82, 10 mm³ verdunde „gecoaguleerde kippendooier" opl.,
„ „ „ 84 en 86, 5 mm³ „ „ „ „ ,
„ „ „ 81, 2 mm³ „ „ „ „ ,
„ „ „ 85, 1 mm³ „ „ „ „ ,
„ „ „ 83, 0.4 mm³ „ „ „ „ .

Nadat de verzadigde sera een nacht in de ijskast verbleven, werden deze den volgenden dag door steriel papier gefiltreerd.

De voor verzadiging gebruikte eioplossingen zijn, niettegenstaande de verhitting tijdens de coaguleering der eibestanddeelen en niettegenstaande de loogbehandeling daarvan, niet kiemvrij te achten. Toch spreekt het van zelf, dat de geheele behandeling der oplossingen tijdens de bereiding op aseptische wijze dient te geschieden.

Ook de behandeling der sera tijdens de verzadiging dient op een zoodanige wijze te geschieden, dat besmetting zooveel mogelijk wordt voorkomen.

Par. 5. Uiteindelijke titer- en specifiteitsbepaling.

Na deze bewerking rest nog de definitieve titer- en specifiteitsbepaling der verzadigde sera, waarbij door vergelijking van de eigenschappen der sera vóór en na de verzadiging, de resultaten daarvan kunnen worden beoordeeld. Voor deze bepalingen werden dezelfde eioplossingen gebruikt, die ook toepassing vonden bij de eerste titer- en specifiteitsbepaling. Voor de bereiding van deze vloeistoffen, alsmede voor de verdunning daarvan, wordt verwezen naar par. 3 van dit hoofdstuk.

Tabel 30 geeft een overzicht van deze bepalingen.

TABEL 30.

Tijd van aflezing en uitslag der praecipitatie-reacties bij de titer- en specifiteitsbepaling van antisera, die vervaardigd zijn door inspuiting van oplossingen van gecoaguleerd eendenei en na de vervaardiging verzadigd werden met oplossingen van gecoaguleerd kippenei-wit en kippendooier.

	Antigeenoplossing		Nummers der sera						Contrôle normaal serum No. 29
	Verdunning	Aard	81	82	83	84	85	86	
Onderzoek van ei-wit-oplossingen	1/25	*E*.W. 15% NaOH *K*.W. 15% NaOH	20m+ 45m—	10m+ 45m—	10m+ 45m—	10m+ 45m—	25m+ 45m—	30m+ 45m—	45m— 45m—
	1/125	*E*.W. 15% NaOH	45m±	30m+	30m+	30m+	35m+	45m+	45m—
Onderzoek van dooier-oplossingen	1/25	*E*.D. 15% NaOH *K*.D. 15% NaOH	4m+ 45m—	4m+ 45m—	4m+ 45m—	4m+ 45m—	4m+ 45m—	4m+ 45m—	45m— 45m—
	1/125	*E*.D. 15% NaOH	6m+	6m+	8m+	8m+	6m+	8m+	45m—
Contrôle		Physiologische zoutoplossing	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—

In tabel 30 werd evenals in tabel 21, blz. 124, behoorende bij de eerste titer- en specifiteitsbepaling, in de verschillende trappen een vijfvoudig toenemende verdunning van het antigeen toegepast.

Aangezien bleek, dat in een 625-voudige verdunning der „ei"-

oplossingen met de verzadigde sera geen of slechts gebrekkige reacties werden opgewekt, werden de resultaten, verkregen met deze verdunning, niet in tabel 30 opgenomen. Een 125-voudige verdunning werd dus als maximale gebezigd, terwijl als minimale een 25-voudige werd gebruikt.

Bij de beoordeeling der reacties valt op, dat de sera met de eendendooieroplossingen in korteren tijd een neerslag geven dan met de eendenei-witoplossingen, zoowel in de 25-voudige als in de 125-voudige verdunning. De sera 82, 83 en 84 geven na vrij korten tijd een neerslag met de tot 1/25 verdunde eendenei-witoplossing. Verder blijkt, dat noch in de 125-voudige, noch in de 25-voudige verdunning van *kippenei-wit* of *kippendooier* een positieve reactie optreedt. Ook met de voor verdunning gebruikte physiologische keukenzoutoplossing worden geen neerslagen verkregen.

Een physiologisch konijnenserum 29 gaf in geen enkel geval een neerslag.

De specifiteit van onze eendenei-NaOH sera is dus duidelijk zichtbaar. De werkzaamheid der sera strekt zich echter niet over een groot gebied uit. Immers, de kleinste antigeenverdunning, die onderzocht kan worden, is een 25-voudige, de grootste een 125-voudige.

Nadat dus vast stond, dat binnen zekere grenzen met onze sera verhitte eenden- en kippeneibestanddeelen van elkaar onderscheiden konden worden, moest worden nagegaan of onder praktijkomstandigheden dezelfde gunstige resultaten konden worden verkregen.

Voor dit onderzoek kwamen in de eerste plaats in aanmerking consumptieijs, advocaat en zachte cake. In Hoofdstuk VI zal een verslag van deze onderzoekingen worden gegeven.

Par. 6. Bereiding van „kippenei-NaOH" serum.

Op analoge wijze als in het voorafgaande deel van Hoofdstuk V is uiteengezet, is het mogelijk sera te bereiden, die gecoaguleerde kippeneibestanddeelen aantoonbaar maken.

De konijnen worden in dit geval ingespoten met gecoaguleerd kippenei, dat door middel van loog weer in oplossing is gebracht. Deze „kippenei-NaOH" sera vertoonen ook in de eerste titer- en specifiteitsbepaling practisch geen specifiteit. Eerst na verzadiging, zoowel met opgelost eendenei-wit als met opgeloste eendendooier, is het mogelijk gecoaguleerde kippeneibestanddeelen te differentieeren van gecoaguleerde eendeneibestanddeelen. Geheel dezelfde werkwijze wordt daarbij toegepast, als voor de bereiding van „eendenei-NaOH" sera in het voorafgaande gedeelte van Hoofdstuk V is beschreven.

HOOFDSTUK VI.

TOEPASSING DER „EENDENEI-NaOH" SERA IN DE PRAKTIJK.

Par. 1. Serologisch onderzoek van consumptieijs, dat bij de bereiding verhit werd.

Voor dit gedeelte van het onderzoek werd steeds gebruik gemaakt van een in gesteriliseerden toestand in voorraad gehouden pap, die per L. melk 150 gram suiker en 28 gram maizena bevatte. Door hieraan eibestanddeelen in verschillende hoeveelheid toe te voegen en de geheele massa daarna te verhitten, werd „consumptieijs" verkregen, dat wat samenstelling en bereidingswijze betreft, overeenkwam met in den handel voorkomende monsters. De verhitting vond plaats in een waterbad, terwijl de temperatuur der mix gedurende enkele minuten op omstreeks 97° C. werd gehouden.

De verschillende mengsels werden op een wijze gemerkt, die oogenblikkelijk de samenstelling daarvan weergaf.

Zoo beteekent E.W.K.5%, dat de pap 5% eendenei-wit bevatte, terwijl dit ei-wit in de pap werd verhit tot bij het kookpunt.

Aangezien consumptieijs, bereid volgens een der ons bekende recepten, nooit minder dan 5% en nooit meer dan 20% ei bevat, werden deze percentages als minimum en maximum genomen. Wordt echter de geheele eiinhoud gebruikt, dan is het minimum percentage als regel belangrijk grooter dan 5. Derhalve werd nooit minder dan 7½% geheel ei aan de pap toegevoegd.

De volgende concentraties eibestanddeelen werden gebruikt:

a.	5% eendenei-wit,	E.W.K. 5%,
b.	5% eendendooier,	E.D.K. 5%,
c.	5% kippenei-wit,	K.W.K. 5%,
d.	5% kippendooier,	K.D.K. 5%,
e.	20% eendenei-wit,	E.W.K. 20%,
f.	20% eendendooier,	E.D.K. 20%,
g.	20% kippenei-wit,	K.W.K. 20%,
h.	20% kippendooier,	K.D.K. 20%,
j.	7½% geheel eendenei,	E.E.K. 7½%,
k.	7½% geheel kippenei,	K.E.K. 7½%,

l. 20% geheel eendenei, E.E.K. 20%,
m. 20% geheel kippenei, K.E.K. 20%,
n. Contrôlepap zonder eitoevoeging.

a. Hydrolyse van concumptieijs.

Voor het onderzoek van consumptieijs met sera, bereid door injectie van gecoaguleerde eendeneibestanddeelen, die door middel van loog weer opgelost waren, dienden eventueele in de mix voorkomende eibestanddeelen eveneens met loog behandeld te worden. Deze bestanddeelen werden daardoor eveneens omgezet in het alkalialbuminaat.

Zooals uitvoerige voorbereidende proefnemingen ons leerden, moest de eiwithydrolyse tot een bepaald nauw omschreven punt voortgeschreden zijn.

Deze hydrolyse bleek ons afhankelijk te zijn van de pH tijdens de hydrolyse — dus van de hoeveelheid loog, die werd toegevoegd —, van de temperatuur, waarbij gehydrolyseerd werd en van den duur der hydrolyse. Door de temperatuur, waarbij gehydrolyseerd werd en den duur der hydrolyse vast te leggen op respectievelijk 45° C. en twee uren en door loog van een bepaalde sterkte, namelijk van $^1/_5$ N., te gebruiken, kon door trapsgewijze verandering der hoeveelheid loog per 10 gr mix de gunstigste hydrolyse bepaald worden.

Echter gold een bepaalde optimale hoeveelheid loog, dus een bepaalde pH, slechts voor een bepaalden denaturatietoestand van de eibestanddeelen. Wanneer een eibevattende ijsmix tijdens de bereiding werd verhit tot 85° C., dan was een zekere hoeveelheid loog per 10 gram mix noodig om optimale hydrolyse te verkrijgen. Werd echter dezelfde mix verhit tot 97° C., dan was een grootere hoeveelheid loog noodig om dezelfde voor het onderzoek gunstige hydrolyse te bereiken. Eenigszins belangrijke afwijking van deze optimale looghoeveelheid had tengevolge, dat serologische reacties uitbleven.

Bij het onderzoek van onbekende monsters consumptieijs is natuurlijk niet bekend, of de daarin voorkomende eibestanddeelen aan eenige verwarming werden blootgesteld en wanneer wel verwarming werd toegepast, tot welke temperatuur en gedurende welken tijd. Om de moeilijkheden, die hierdoor bij het onderzoek kunnen optreden, te ontgaan, werd elk monster consumptieijs vóór het onderzoek gedurende 5 minuten op ± 97° C. verhit, zoodat een vrijwel constante coagulatietoestand der daarin aanwezige eiwitten werd verkregen. Deze verhitting is namelijk praktisch de hoogste, waarop consumptieijs kan worden verhit.

De voor deze coagulatietoestand geldende optimale looghoeveelheid kon daarop worden bepaald.

Niet alleen, dat de optimale hoeveelheid loog afhankelijk is van den coagulatietoestand der eiwitten, deze is evenzeer afhankelijk van de *hoeveelheid* in een ijsmix voorkomende eiwitten.

Een grootere hoeveelheid eiwit eischt een grootere hoeveelheid loog om de optimale hydrolyse te verkrijgen.

Eiwitbevattende vloeistoffen hebben namelijk de eigenschap loog te binden en daardoor de pH te verlagen en wel meer, naarmate het eiwitgehalte grooter is. Het loogbindend vermogen is verder afhankelijk van de temperatuur en van den duur der looginwerking op het eiwit. Deze afhankelijkheid kan hier echter buiten beschouwing worden gelaten, omdat de temperatuur en de duur der inwerking steeds constant werden gehouden.

Om dus de gunstigste hydrolyse te verkrijgen, diende bij grooter eipercentage van de ijsmix een grootere hoeveelheid loog te worden toegevoegd. Bovendien eischt gecoaguleerde dooier een grootere hoeveelheid loog om de voor dit eiwit geldende gunstigste hydrolyse te bereiken.

Bij een onbekend monster consumptieijs zijn geen gegevens bekend omtrent het eiwitgehalte daarvan, noch omtrent het feit of daarin eiwit, dooier of wel een mengsel van beide voorkomt. Wij zagen ons derhalve genoodzaakt gedeelten van hetzelfde monster consumptieijs op drie verschillende manieren te hydrolyseeren, telkens met verschillende hoeveelheden loog. De aldus ontstane vloeistoffen werden alle onderzocht. Ook wanneer slechts in een van deze drie vloeistoffen met onze sera een praecipitaat werd opgewekt, werd geconcludeerd tot de aanwezigheid van eendeneibestanddeelen.

Consumptieijs bevat verder veelal vet in geëmulgeerden toestand, hetzij dit afkomstig is uit den eiinhoud, hetzij uit melk of room. Bij het behandelen van vetten met loog ontstaat zeep. Ook bij de sterkte der looginwerking, zooals werd toegepast bij ons onderzoek, ontstond een chemisch aantoonbare hoeveelheid zeep. Zeep bezit de eigenschap vetten te emulgeeren en een verwijdering van geemulgeerd vet uit een oplossing, bijvoorbeeld door centrifugeering, te verhinderen door verlaging der oppervlaktespanning.

Sterk geëmulgeerd vet maakt vloeistoffen troebel. Dit verschijnsel deed zich ook voor bij consumptieijs, dat met loog behandeld werd en was soms zoodanig storend, dat het aflezen der reacties werd be-

lemmerd. Zelfs centrifugeeren der vloeistoffen bracht slechts een geringe verbetering teweeg, zoodat werd gezocht naar een ander middel om dit verschijnsel te elimineeren. Dit werd gevonden in de verhooging der oppervlaktespanning door alkohol en aceton.

Na een groot aantal experimenten bleek het mogelijk te zijn, door in plaats van voor de eiwithydrolyse uitsluitend waterig loog te gebruiken, mengsels te nemen van waterig loog, loog opgelost in alkohol en loog opgelost in aceton. Op deze wijze werd gevonden, dat voor alle in consumptieijs voorkomende percentages eibestanddeelen een gunstige hydrolyse en een voldoende helderheid te verkrijgen was, door toepassing van de volgende looghoeveelheden per 10 gram van dezelfde ijsmix:

a. 17cc loog, bestaande uit 5 deelen waterige $^1/_5$ N. NaOH en 1 deel alkoholische $^1/_5$ N. NaOH.

b. 20 cc loog, bestaande uit gelijke deelen waterige en alkoholische $^1/_5$ N. NaOH.

c. 35 cc loog, bestaande uit 3 deelen waterige $^1/_5$ N. NaOH en 1 deel $^1/_5$ N. NaOH opgelost in $\pm$75% aceton.

Wanneer na deze hydrolyse en neutraliseering, samenbrenging van een of meer van de vloeistoffen met praecipiteerend eendenei-NaOH serum een neerslag opwekte, werd geconcludeerd tot de aanwezigheid van gecoaguleerd eendenei.

b. Onderzoek van consumptieijs.

Zooals in tabel 30 werd aangetoond, was het mogelijk met onze „eendenei-NaOH" sera vloeistoffen, die 15% eenden- of kippeneibestanddeelen in verhitten toestand bevatten, van elkaar te onderscheiden. Bij enkele voorbereidende proefnemingen bleek ons, dat het moeilijker wordt om afleesbare positieve reacties te verkrijgen bij kleinere eendeneipercentages, bijvoorbeeld 5%.

Dan blijken niet alle sera voldoende gevoelig te zijn om een uitspraak te doen.

Verder bevatten voedings- en genotmiddelen wel eens meer dan 15% ei. Consumptieijs bevat volgens de ons bekende recepten af en toe tot 20% eibestanddeelen. Hier dreigt, wanneer kippenei werd gebruikt, het optreden van nog een kleine rest van verwantschapsreactie.

Voor wij onze sera in de praktijk konden gebruiken, dienden deze daarom nogmaals deugdelijk gecontroleerd te worden. Mocht er nog eenige verwantschapsreactie bestaan, dan werd òf het betreffende serum niet gebruikt òf het werd nog iets verder verzadigd door toe-

voeging van eenig verwant antigeen. De hoeveelheid daarvan kon worden bepaald aan de hand van de bij de verzadiging toegevoegde hoeveelheid verwant antigeen. Eerst, nadat volkomen zekerheid bestond omtrent de betrouwbaarheid der sera, werd overgegaan tot de praktische toepassing daarvan.

TABEL 31 A

Tijd van aflezing en uitslag der praecipitine-reactie bij het onderzoek van zelfbereide ijsmixen met 20% *eitoevoegsel*. Verdunning van de antigeenoplossing 1/25. Alle mixen werden vóór het onderzoek gekookt.

	De „pap" bevat	Gehydrolyseerd per 10 gr. met	Nummers der antisera					
			81	82	83	84	85	86
Mix met ei-wit								
I.	*E*.W. 20% *K*.W. 20%	17 cc loog „	45m+ 45m—	**15m+** 45m—	30m+ 45m—	**20m+** 45m—	45m+ 45m—	45m+ 45m—
	E.W. 20% *K*.W. 20%	20 cc loog „	45m— 45m—	45m+ 45m—	45m± 45m—	45m± 45m—	45m± 45m—	45m± 45m—
	E.W. 20% *K*.W. 20%	35 cc loog „	45m— 45m—	45m— 45m—	45m— 45m—	45m— 45m—	45m— 45m—	45m— 45m—
Mix met dooier								
II.	*E*.D. 20% *K*.D. 20%	17 cc loog „	**25m+** 45m—	**25m+** 45m—	35m+ 45m—	45m± 45m—	45m± 45m—	**25m+** 45m—
	E.D. 20% *K*.D. 20%	20 cc loog „	**15m+** 45m—	**15m+** 45m—	25m+ 45m—	45m± 45m—	45m± 45m—	**15m+** 45m—
	E.D. 20% *K*.D. 20%	35 cc loog „	**10m+** 45m—	**10m+** 45m—	**10m+** 45m—	**10m+** 45m—	**10m+** 45m—	**10m+** 45m—
Mix met geheel ei								
III.	*E*.E. 20% *K*.E. 20%	17 cc loog „	**15m+** 45m—	**10m+** 45m—	**10m+** 45m—	**10m+** 45m—	**10m+** 45m—	**10m+** 45m—
	E.E. 20% *K*.E. 20%	20 cc loog „	45m— 45m—	45m— 45m—	**10m+** 45m—	45m± 45m—	45m— 45m—	**25m+** 45m—
	E.E. 20% *K*.E. 20%	35 cc loog „	**10m+** 45m—	**10m+** 45m—	**10m+** 45m—	**15m+** 45m—	**10m+** 45m—	**15m+** 45m—

TABEL 31 B.

Tijd van aflezing en uitslag der praecipitatie-reactie bij het onderzoek van zelfbereide ijsmixen met *minimum* eitoevoeging. Verdunning van de antigeenoplossing 1/25. Alle mixen werden vóór het onderzoek gekookt.

	De „pap" bevat	Gehydroliseerd per 10 gr. met	Nummers der antisera					
			81	82	83	84	85	86
Mix met ei-wit	I. *E*.W. 5 %	17 cc loog	45m±	**20m+**	**25m+**	**25m+**	45m+	45m+
	K.W. 5 %	„	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—
	E.W. 5 %	20 cc loog	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—
	K.W. 5 %	„	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—
	E.W. 5 %	35 cc loog	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—
	K.W. 5 %	„	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—
Mix met dooier	II. *E*.D. 5 %	17 cc loog	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—
	K.D. 5 %	„	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—
	E.D. 5 %	20 cc loog	45m—	45m+	45m—	45m±	45m—	45m+
	K.D. 5 %	„	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—
	E.D. 5 %	35 cc loog	**20m+**	**10m+**	45m±	**25m+**	**10m+**	45m+
	K.D. 5 %	„	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—
Mix met geheel ei	III. *E*.E. 7½%	17 cc loog	45m+	35m+	45m+	45m—	45m—	45m+
	K.E. 7½%	„	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—
	E.E. 7½%	20 cc loog	45m+	**20m+**	**20m+**	45m±	45m±	**20m+**
	K.E. 7½%	„	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—
	E.E. 7½%	35 cc loog	45m—	45m+	45m—	45m—	45m—	45m—
	K.E. 7½%	„	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—
Mix zonder ei	geen ei-bestanddeelen.	17 cc loog	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—
		20 cc loog	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—
		35 cc loog	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—	45m—

Het onderzoek van een aantal zelfbereide monsters consumptieijs, waarvan de resultaten werden neergelegd in tabel 31 A en B, geeft een beeld van een dergelijke contrôle der sera. In deze tabellen werden de gebruikelijke afkortingen gebezigd. Zoo beteekent E.W. 5%, dat het consumptieijs 5% verhit eendeneiwit bevat. In de derde kolom is aangegeven de hoeveelheid loog, waarmede de mix gehydrolyseerd werd. Voor de samenstelling van deze loog zij verwezen naar hetgeen vermeld staat onder *a* van deze paragraaf. Alle monsters werden met drie verschillende hoeveelheden loog behandeld. Een contrôlepap, die geen eibestanddeelen bevatte, werd mede in het onderzoek betrokken.

Bij het beproeven van onze sera hebben wij, zooals uit tabel 31 A 2e kolom blijkt, in de eerste plaats onderzoekingen verricht met ijsmixen, die de ons bekende maximale hoeveelheid ei-wit, dooier of geheel ei (20%) bevatten. Er werden, zooals reeds is medegedeeld, drie verschillende „graden" van hydrolyse toegepast, nml. inwerking van 17, 20 en 35 cc loog per 10 gr „pap".

In deel III dezer tabel krijgt men den indruk, dat een snelle reactie op het toegevoegde geheel ei, zoowel bij hydrolyse met 17 cc als met 35 cc tot stand komt. Uit afdeeling II blijkt echter, dat voor het opsporen van dooier, hydrolyse met 35 cc duidelijk de voorkeur verdient. Afdeeling I toont ten slotte, dat het aantoonen van toegevoegd ei-wit alleen maar bij hydrolyse met 17 cc lukt en dan eigenlijk maar met sera 82 en 84 voldoende snel en duidelijk.

Uit alle proeven blijkt echter wel, dat de reactie streng specifiek is; nergens werd eenige reactie met kippeneibestanddeelen vastgesteld.

Van veel beteekenis is voor de practische waarde van onze arbeid het onderzoek van ijsmixen, waaraan het ons bekende *minimum* aan resp.: ei-wit, dooier of geheel ei werd toegevoegd. Daarover geeft tabel 31 B nadere gegevens.

Ook bij de aanwezigheid van een geringer gehalte aan eibestanddeelen blijft de reactie volstrekt specifiek.

Bij het onderzoek van de ijsmixen, waaraan een minimale hoeveelheid eendeneibestanddeelen is toegevoegd, doet zich, naar uit tabel 31 B is te lezen, het merkwaardige geval voor, dat het aantoonen van toegevoegde dooier het best gaat door hydrolyse van de te onderzoeken stof met 35 cc loog per 10 gr pap (afd. II). Voor geheel ei verdient blijkbaar de hydrolyse met 20 cc loog per 10 gr pap de voorkeur (afd. III), terwijl het aantoonen van een geringe hoeveelheid eendeneiwit slechts mogelijk bleek door hydrolyse met 17 cc loog (afd. I).

Dit onderzoek bewijst andermaal, dat men bij het toetsen van

monsters eetwaren op de aanwezigheid van eendenei-bestanddeelen, zich niet zal mogen beperken tot hydrolyse van het gekookte materiaal door steeds dezelfde hoeveelheid loog. Men zal altijd verschillende proeven van hetzelfde monster moeten inzetten, die met opklimmende hoeveelheden loog gehydrolyseerd worden.

Gaat men aan de hand van tabel 31 A en B de resultaten na, die met de afzonderlijke sera werden bereikt, dan blijkt, dat de sera No. 82 en 86 het veelvuldigst door het gevormde neerslag de aanwezigheid van eendenei aantoonden (nml. in 13 van de 18 proeven). Voor No. 86 is er echter één dubieuze bij (±), terwijl de reactietijden van dit serum soms langer zijn dan bij serum 82. Rekent men de dubieuze uitslagen niet mede, dan komen vervolgens in bruikbaarheid de Nos 83 (10 positieve reacties) en 81 (9 positieve), terwijl de sera No. 84 en 85 de rij sluiten met slechts 6 positieve uitslagen onder 18 proeven, waarbij tòch eendenei-bestanddeelen in het onderzochte materiaal aanwezig waren.

Deze gegevens dwingen ons andermaal tot de conclusie, dat het noodzakelijk is elk serum op bovengeschetste wijze op zijn bruikbaarheid te beproeven, alvorens daarmede uit de praktijk toegezonden monsters te onderzoeken.

c. Invloed van bevriezing der eibestanddeelen en van toevoeging van conserveermiddelen, bindmiddelen en essences op de reactie.

Consumptieijs komt in bevroren toestand in den handel. Eventueele eibestanddeelen, die erin verwerkt zijn, worden dus mede onder den invloed van deze lage temperatuur gebracht. Hoewel zulks niet te verwachten was, werd het noodzakelijk geoordeeld na te gaan of deze bevriezing de reacties ook op ongunstige wijze beinvloedt. Aan de hand van een aantal experimenten, waarbij de mix ook gedurende langeren tijd in bevroren toestand werd bewaard, bleek geen enkele invloed der bevriezing op het welslagen der reacties merkbaar te zijn, noch werden reacties opgewekt, wanneer in zulk bevroren materiaal de verwante eisoort aanwezig was of in 't geheel geen ei aan de mix was toegevoegd.

Verder werd nagegaan of de toevoeging van de volgende conserveermiddelen, bindmiddelen en essences in normale hoeveelheid aan de mix eenigen invloed op de reacties uitoefende: pectine, tragacanth, gelatine, naphkagant, zetmeel, benzoëzuur, salicylzuur, ingedikt ananassap, vanilleëssence, ingedikt aardbeiensap, marasquinessence, citroenessence, moccaäroma, pistacheëssence, notenaroma, amandelessence, abrikozenessence, cherrybrandyessence en koffieextract.

Zulks bleek evenmin het geval te zijn.

Wij meenden met de voorgaande uitvoerige onderzoekingen op voldoende wijze de omstandigheden te hebben bestudeerd, die op het welslagen der reactie bij onderzoek van ingezonden monsters van invloed konden zijn. Daarom kan thans worden overgegaan tot het onderzoek van ingezonden levensmiddelen.

d. Onderzoek van een aantal ingezonden monsters consumptieijs.

In Hoofdstuk IV par. 5 werd het onderzoek beschreven van een aantal monsters consumptieijs, die van elders ontvangen waren. Het onderzoek vond plaats met sera, waarmede eendeneibestanddeelen in natieven toestand konden worden aangetoond. Een deel van deze monsters was echter tijdens de bereiding aan een zoodanige verhitting onderworpen, dat de bestanddeelen waren gedenatureerd, waardoor de differentieering met „natieve" eiantisera niet meer mogelijk was.

Het onderzoek op gecoaguleerde eendeneibestanddeelen geschiedde ongeveer gelijktijdig met het onderzoek op natieve eendeneibestanddeelen, zoodat de resultaten van beide onderzoekingen gelijktijdig aan de betreffende inzenders konden worden medegedeeld. Pas daarna ontvingen wij gegevens, de samenstelling en bereidingswijze betreffende.

De voor het onderzoek op verhitte eibestanddeelen gebruikte sera waren genummerd 57, 58, 77 en 80. De sera 57 en 58 waren beide bereid door injectie van gecoaguleerd eendenei, dat door 150 cc $^1/_{10}$ N. NaOH per eendenei was opgelost. Voor de oplossing der eendeneibestanddeelen, gebruikt bij de bereiding der sera 77 en 80, werd per gram ei 4 cc $^1/_5$ N. NaOH toegepast. Voor deze sera waren dezelfde contrôleonderzoekingen uitgevoerd, die in de vorige par. voor de Nos. 81—86 zijn beschreven.

Vóór het onderzoek werd een deel van elk der betreffende monsters in een waterbad verhit tot ongeveer 97—98° C. en gedurende ongeveer 5 minuten op deze temperatuur gehouden. Aangezien dit de sterkste verhitting is, die kan worden toegepast bij de bereiding van consumptieijs, is na deze behandeling de coagulatietoestand van eventueele eibestanddeelen voor alle monsters gelijk te achten. Deze constantheid van den coagulatietoestand is noodig om met een zekere looghoeveelheid steeds een afdoend effect te verkrijgen.

Van ieder der verhitte monsters werd daarop drie keer 10 gr in

een schoon en steriel kolfje afgewogen. Aan het eerste kolfje werd 17 cc loog, bestaande uit een mengsel van 5 deelen waterige $^1/_5$ N. NaOH en 1 deel alkoholische $^1/_5$ N. NaOH, toegevoegd. Bij het tweede kolfje werd gevoegd 20 cc loog, bestaande uit een mengsel van gelijke deelen waterige en alkoholische $^1/_5$ N. NaOH en bij het derde 35 cc loog, bestaande uit een mengsel van 3 deelen waterige $^1/_5$ N. NaOH en 1 deel $^1/_5$ N. NaOH opgelost in ongeveer 75% aceton.

Deze drie methoden van hydrolyse werden verder kortheidshalve aangeduid als „hydrolyse 17, 20 en 35".

Direct na deze loogtoevoeging werden de mengsels in een waterbad op een temperatuur van 45° C. gebracht en daarna in een broedstoof van dezelfde temperatuur geplaatst. Na een verblijf van twee uren in de broedstoof werden de oplossingen geneutraliseerd met ½ N. HCl. Als indicator vond phenolphtaleïne toepassing.

Bij uitgebreide voorbereidende onderzoekingen bleek ons een sterke afhankelijkheid te bestaan tusschen de sterkte der reacties en de pH van de geneutraliseerde eioplossing. De sterkste reacties werden verkregen als de pH een waarde van 7.0 had. Een neutralisatie tot pH 7.0 is echter niet zoo eenvoudig.

Verder bleek, vooral wanneer in consumptieijs dooier was verwerkt, dat de troebelheid, die daardoor veroorzaakt werd, een zekere mate van verdunning noodig maakte, om voor het onderzoek voldoend heldere oplossingen te verkrijgen.

Deze minimale verdunning naderde vrij dicht de maximale, waarbij nog reactie met het antiserum kon worden afgelezen. Door centrifugeering der eioplossing toe te passen was het mogelijk in zooverre verbetering te verkrijgen, dat met een geringere verdunning kon worden volstaan om de vereischte helderheid te bereiken. Betere resultaten werden echter verkregen, wanneer de eioplossing eerst vijfvoudig verdund werd en dan gecentrifugeerd. Hierbij bleek, dat het S.G. van de verdunningsvloeistof weinig invloed had op het effect van het centrifugeeren.

Door de eioplossing voor het centrifugeeren te verdunnen met een vijfvoudige hoeveelheid van een vloeistof, bestaande uit gelijke deelen: bufferoplossing volgens CLARK *en* LUBS *met een pH van* 7.0 *en physiologische zoutoplossing, werd gelijktijdig bewerkstelligd, dat ook de pH precies op* 7.0 *werd gebracht.* De eioplossingen werden daarna nog vijfvoudig verdund met gewone physiologische zoutoplossing, zoodat de totale verdunning 1 op 25 was, gerekend vanaf het oogenblik, dat de oplossingen geneutraliseerd waren. In deze concentraties werden de „consumptieijsoplossingen" onderzocht.

De nummering der monsters is dezelfde als in de tabellen 16A, 16B, 16C en 16D, waarin de resultaten van het onderzoek op natieve eendeneibestanddeelen zijn opgenomen (blz. 93—95).

De ervaringen, verkregen met de in eigen laboratorium vervaardigde monsters consumptieijs, die gedeeltelijk in tabel 31 werden vermeld, werden bij dit onderzoek van ons toegezonden monsters bevestigd. Wanneer uitsluitend kippeneibestanddeelen in de mix waren verwerkt en ook wanneer in 't geheel geen eibestanddeelen bij de bereiding waren toegepast, werden geen neerslagen verkregen als de oplossingen met „eendenei-NaOH" sera werden onderzocht. Wij geven daarvan de volgende voorbeelden.

TABEL 32A.

Monster No.	Hoeveelheid toegevoegde kippeneibestanddeelen	Aantal minuten, waarna *geen neerslag* werd opgemerkt bij reactie met de *eendenei*-NaOH sera:			
		57	58	77	80
1	dooier 5%	45	45	45	45
3	geheel ei 7%	45	45	45	45
5	geen ei	45	45	45	45
6	geheel ei 5%	45	45	45	45
7	geheel ei 5%	45	45	45	45
8	geheel ei 5%	45	45	45	45
13	dooier 7%	45	45	45	45
14	dooier 7%	45	45	45	45
19	dooier 5%	45	45	45	45
20	geen ei	45	45	45	45
25	ei-wit 20%	45	45	45	45

Waren daarentegen bij de bereiding *e e n d e n e i bestanddeelen* in het consumptieijs verwerkt en zelfs ook wanneer *mengsels van eenden- en kippenei* waren toegepast, dan werden in alle gevallen op twee na neerslagen opgemerkt. Wij komen op deze laatste nog terug.

Overzien wij nu de resultaten, waarbij de aanwezigheid van eendeneibestanddeelen met onze „eendenei-NaOH" sera wel gelukte. Wij moeten daarbij het materiaal in twee groepen splitsen en wel:

1*e* de monsters, die bij de bereiding niet hooger verhit waren dan 70° C. (Tabel 16 B blz. 99);

2*e* de monsters, die bij de bereiding verwarmd waren tot een temperatuur van 80° C. en hooger (Tabel 16 C blz. 100).

Bij de eerste groep was het reeds met „natief" serum gelukt de aanwezigheid van eendenei-bestanddeelen aan te toonen. Zooals uit tabel 32 B blijkt, werd deze diagnose door het onderzoek met „eendenei-NaOHsera" volledig bevestigd.

TABEL 32 B.

Monster No.	Hoeveelheid eibestanddeelen in het ijs		Hydrolyse	Aantal minuten, waarna *een neerslag* werd opgemerkt bij reactie met de eendenei-NaOH sera:			
	eendenei	kippenei		57	58	77	80
4	geheel ei 20%	geen	17.20	15	15	15	15
21	dooier 5%	„	35	10	20	12	15
11	dooier 3%	„	20	10	10	10	10
	geheel ei 15%	„					
15	dooier 9%	„	35	10	20	12	12

Wij mogen hieruit concludeeren, dat het onderzoek met „NaOH" sera dat met „natief" sera kan vervangen. Bij het onderzoek van eenig monster, waarvan niet bekend is of het aan verwarming werd onderworpen, is het dus niet strikt noodig eerst een onderzoek met „natief" sera te verrichten en dan een met „NaOH" sera. Men zou desgewenscht met het laatste kunnen volstaan.

Toch zouden wij willen adviseeren monsters consumptieijs van onbekende samenstelling steeds eerst met „natief" sera te onderzoeken en wanneer met deze sera geen eendenei kan worden opgespoord, pas over te gaan tot het onderzoek met „NaOH" sera.

Van veel grooter gewicht voor de praktische bruikbaarheid onzer sera was echter het onderzoek der monsters, die — naar ons eerst later bekend werd — reeds een verwarming tot 80° C. en hooger hadden ondergaan. Blijkens tabel 16 C (blz. 94) voerde het serologisch onderzoek met „natief sera" niet tot het doel. Zou dit met de „NaOH-sera" wel gelukken en zou daarmede onze vele arbeid met succes worden bekroond?

Het gelukte inderdaad bij 5 van de 7 in tabel 16 C vermelde monsters. Deze uitslag vindt men in het bovenste deel van tabel 32 C weergegeven.

TABEL 32 C.

Monster No.	Hoeveelheid eibestanddeelen in het ijs		Hydrolyse	Aantal minuten, waarna *een neerslag* werd opgemerkt bij reactie met de eendenei-NaOH sera:			
	eendenei	kippenei		57	58	77	80
9	geheel ei 5%	geheel ei 5%	17.20	25	35	20	20
10	geheel ei 5%	geheel ei 5%	20	35	40	35	35
12	dooier 3% geheel ei 15%	geen	17.20	10	20	10	10
17	dooier 5%	,,	35	10	40	20	20
18	dooier 3%	dooier 3%	17.35	10	45	30	25
2	dooier 9%	geen	Bij alle vormen van hydrolyse werden slechts enkele dubieuze reacties opgemerkt.				
16	dooier 4½%	dooier 4%	Bij alle vormen van hydrolyse werd geen enkele positieve of dubieuze uitslag genoteerd.				

Hoewel niet geheel bevredigend mag deze uitslag toch zeer zeker gunstig genoemd worden. Wij vestigen er de aandacht op, dat het gelukte een gehalte aan 3 en 5% eendenei-dooier (No. 18 en 17) met zekerheid vast te stellen, alsook de bijmengsels van 5% geheel eendenei (No. 9 en 10). Dit zijn concentraties, die, zooals reeds werd opgemerkt, in de praktijk aan de onderste grens der gebruikelijke toevoegingen liggen. Wij mogen dus vaststellen, dat het door toepassing van de „NaOH" sera in een belangrijk grooter aantal gevallen zal gelukken de bijmenging van eendenei-bestanddeelen in consumptieijs te achterhalen, dan wanneer slechts „natief" sera worden gebezigd. De doeltreffendheid der contrôle wordt er door verhoogd, terwijl zooals reeds uit tabel 32 A bleek, miswijzingen in den zin, dat de aanwezigheid van eendenei werd aangenomen, terwijl geen ei of slechts kippenei was verwerkt, niet voorkomen. In dit opzicht is de betrouwbaarheid der methode hoog aan te slaan.

Dat zij echter nog niet volmaakt is, bewijst de uitslag bij het onderzoek der monsters No. 2 en 16.

Monster No. 2 bevatte 9% eendendooier. Het geheel was bij de bereiding gedurende 10 minuten op 98° C. verhit. Bij het onderzoek bleek dit monster sterk troebel te zijn. Wel werden dubieuze reacties opgemerkt, doch wegens de moeilijke afleesbaarheid werd zekerheidshalve de uitslag „eendeneibestanddeelen niet aantoonbaar" verkozen. Het monster 16 bevatte 4½% eenden- en 4% kippendooier. De verwarming werd bij de bereiding opgevoerd tot 90° C. Bij het onderzoek van dit monster werden geen neerslagen opgemerkt, zoodat ten onrechte de uitslag „eendeneibestanddeelen negatief" werd opgegeven.

Bij het onbevredigende resultaat, opgedaan bij het onderzoek van deze monsters, spelen zeer zeker andere factoren dan het eigehalte een rol. Wij behoeven slechts te wijzen op de uitslagen, verkregen bij het onderzoek van de monsters 17 en 18, die minder eendenei bevatten. Welke factoren hier tot dit ongunstige resultaat hebben geleid, kon niet met zekerheid worden vastgesteld. Wij achten het echter niet uitgesloten, dat de pH tijdens de verhitting, die voor het onderzoek plaats vindt, invloed uitoefent op den coagulatietoestand der eiwitten. Zooals reeds eerder werd betoogd, geeft een zekere looghoeveelheid tijdens de hydrolyse een gunstig effect, mits een bepaalde coagulatietoestand der eibestanddeelen aanwezig is. Omdat de monsters ons werden toegezonden en het onderzoek eerst enkele dagen na de bereiding kon plaats vinden, achten wij het niet uitgesloten, dat de zuurgraad daarvan hooger dan normaal was en de toegevoegde hoeveelheid loog ontoereikend. Wij waren helaas niet meer in de gelegenheid omtrent dit punt een afzonderlijk onderzoek in te stellen.

Par. 2. Serologisch onderzoek van advocaat.

Normale handelsadvocaat moet minstens 10% dooier bevatten. Bij onderzoek blijkt, dat dit percentage practisch steeds zeer dicht benaderd wordt. Op een enkele uitzondering na wordt advocaat gemaakt van den geheelen eiinhoud. Het percentage ei-wit bedraagt derhalve omstreeks 18% en het totale eigehalte ±28%. Deze hoeveelheid ei wordt tijdens de bereiding gemengd met alkohol van een zoodanig percentage, dat het alkoholgehalte van de geheele massa 14% (volumeprocenten) bedraagt. Vervolgens wordt de massa verhit in een waterbad, waarbij de advocaat door een beginnende coaguleering der eibestanddeelen dikvloeibaar wordt. Hoewel, blijkens ons voorbereidend onderzoek, normale advocaat geen natieve eibestanddeelen meer bevat, wordt de grens, waarbij denatureering begint, in den regel weinig overschreden, omdat anders meer of minder groote coagulae optreden. Het ligt voor de hand, dat dit ongewenscht is.

a. Hydrolyse van advocaat.

Zooals in par. 1 van dit hoofdstuk werd betoogd, dient de coagulatietoestand der eibestanddeelen steeds dezelfde te zijn om met een bepaalde hoeveelheid loog bij het serologisch onderzoek een constant effect te bereiken.

Het is ons gebleken, dat de coagulatietoestand der eibestanddeelen in verschillende monsters advocaat zeer uiteenloopt. Daarom hebben wij vóór het onderzoek de advocaat verdund met evenveel gekookte melk en dan in een waterbad verhit tot $\pm 94^0$ C. Bij deze temperatuur begint de alkohol te koken.

Op deze wijze zullen bij alle monsters de eiwitten in denzelfden coagulatietoestand zijn gebracht. Daarna werd 10 gr van deze massa in een steriel kolfje afgewogen en gemengd met 35 cc loog, bestaande uit een mengsel van 3 deelen waterige $^1/_5$ N. NaOH en 1 deel $^1/_5$ N. NaOH opgelost in 75% aceton. In een waterbad werd het mengsel op een temperatuur van 45^0 C. gebracht en gedurende twee uren in een broedstoof, die op dezelfde temperatuur was ingesteld, bewaard. Na deze hydrolyse werd de vloeistof geneutraliseerd met $\frac{1}{2}$ N. HCl. De gebruikte indicator was phenolphtaleïne.

Na de neutraliseering werd een deel der oplossing 1 op 5 verdund met gebufferde physiologische keukenzoutoplossing met pH 7.0 en gedurende 10 minuten gecentrifugeerd. Verdere vijfvoudige verdunning vond plaats met physiologische keukenzoutoplossing. Bij het nemen van de vloeistof uit de centrifugebuis dient gezorgd te worden, dat uitsluitend heldere vloeistof wordt afgepipetteerd.

b. Onderzoek van een aantal ingezonden monsters advocaat.

Op boven omschreven wijze werd een 6 tal monsters advocaat behandeld. Deze advocaat kwam wat uiterlijk en consistentie betrof met normale handelsadvocaat overeen, behalve monster 11. Bij een vroeger onderzoek was reeds gebleken, dat dit monster bestond uit een mengsel van rauw eendenei en alkohol. Nadat de noodige verhitting was toegepast, had deze advocaat ook een normaal aanzien. Het chemisch onderzoek bevestigde, dat — zooals reeds vermoed werd — deze 6 monsters alle omstreeks 30% geheel ei bevatten.

Het onderzoek vond plaats met de eendenei-NaOH sera 57, 58, 77 en 80. Als contrôle dienden 3 monsters zelfbereide advocaat van ongeveer dezelfde samenstelling.

Eén van deze monsters was bereid uitsluitend met den geheelen inhoud van eendeneieren, een tweede monster met kippeneieren en een derde monster bestond uit gelijke deelen van beide vorige. Verder

werden reacties ingezet met de voor verdunning gebruikte physiologische zoutoplossing. Alle reacties werden eveneens ingezet met een physiologisch konijnenserum 29.

De in de tabellen 33 A en 33 B beschreven resultaten waren verkregen met dezelfde advocaatmonsters, die in de tabellen 18 A en 18 B zijn onderzocht met „natief" serum. Beide onderzoekingen vonden ongeveer gelijktijdig plaats, zoodat de resultaten ook tegelijk aan de afzenders konden worden medegedeeld. Pas daarna ontvingen wij de gegevens, de samenstelling en bereidingswijze betreffende.

Wij geven in tabel 33 A een overzicht van het onderzoek van normale monsters. (De Nos. 6—11).

Deze vallen wederom in 2 groepen uiteen, te weten No. 6, 10 en 11, waarbij het reeds gelukte bij onderzoek met natief serum de aanwezigheid van eendeneibestanddeelen aan te wijzen (Tabel 18 A blz. 99) en de Nos. 7, 8 en 9, waarbij zulks blijkens tabel 18 B blz. 100 niet gelukte, hoewel zij er volgens de later binnenkomende gegevens wel in zijn verwerkt. Merken wij op, dat bij het monster No. 9 gedurende het onderzoek met natief serum een enkele dubieuze reactie werd genoteerd. Bij gebruik van antisera tegen gecoaguleerd eiwit worden duidelijke neerslagen waargenomen. In No. 7, waarin geen eendenei werd verwerkt, ontstaat geen neerslag. De reactie is dus specifiek!

TABEL 33 A.

Monster No.	Hoeveelheid toegevoegd ei		Temperatuur en duur der verwarming	Aantal minuten, waarna *een neerslag* werd opgemerkt bij reactie met de eendenei-NaOH sera:			
	eendenei	kippenei		57	58	77	80
6	geheel ei 30%	geen	tot dik wordens	8	8	8	8
10	geheel ei 15%	geheel ei 15%	„	10	10	10	10
11	geheel ei 30%	geen	geen	8	8	8	8
9	geheel ei 9%	geheel ei 21%	tot dik wordens	15	10	10	10
7	geen	geheel ei 30%	„	Geen neerslag na 45 min.			
8	geheel ei 3%	geheel ei 27%	„	Geen neerslag na 45 min.			

Slechts is haar gevoeligheid niet toereikend om een gehalte aan 3% eendenei bestanddeelen (No. 8) aan te toonen.

Uit dit onderzoek volgt dus, dat het zonder twijfel mogelijk is in normale advocaat niet alleen eendenei maar ook een eendeneibijmenging van ongeveer 30% aan kippenei aan te toonen. Wanneer bij de bereiding uitsluitend kippenei gebruikt werd, werden geen neerslagen opgemerkt. Werd eendenei gemengd met 10%, kippenei, dan was het niet mogelijk deze bijmenging te achterhalen.

Daarnaast waren ons een 5 tal andere monsters advocaat toegezonden, die niet aan de aan deze waar te stellen eischen voldeed. Deze advocaat was dunvloeibaar en geschift. Hier was alle aanleiding om door chemisch onderzoek, verricht op het laboratorium van den Keuringsdienst van waren te Groningen, de samenstelling te weten te komen. Dit onderzoek wees uit, dat deze monsters uitsluitend met dooier waren bereid en wel met een te klein percentage om dikvloeibare advocaat te verkrijgen. Het dooiergehalte bedroeg namelijk ongeveer 14%.

Vóór het onderzoek van deze monsters kon plaats vinden, was het noodig aan zelfbereide advocaatmonsters het noodige inzicht in de mogelijkheden en moeilijkheden van dergelijke abnormale samenstellingen te verkrijgen. Zoo werden monsters bereid met ongeveer 14% eendendooier, kippendooier en mengsels van gelijke deelen van beide. Na de bereiding was het voldoende voor het verkrijgen van een constanten coagulatietoestand de monsters te verwarmen tot koken der alkohol. Bij 10 gr advocaat werd gevoegd 35 cc loog, bestaande uit 3 deelen waterige $^1/_5$ N. NaOH en 1 deel $^1/_5$ N. NaOH in 75% aceton. Op de gebruikelijke wijze werd deze massa verwarmd tot 45° C. en gedurende 2 uur bewaard in de broedstoof van 45° C. Voor neutraliseering, verdunning, centrifugeering en verdere verdunning zij verwezen naar de behandeling der „normale" advocaatmonsters.

Bij het onderzoek van deze monsters werden dezelfde contrôlemaatregelen toegepast. Wij geven in tabel 33 B een overzicht van dit deel van het onderzoek.

Uit tabel 33 B is in de eerste plaats af te lezen, dat geen neerslag bij de reactie met eendenei-NaOH sera wordt waargenomen, wanneer de advocaat niet met eendendooier, doch slechts met kippendooier is vervaardigd. (No. 4).

De reactie is dus voldoende specifiek. Wordt advocaat uitsluitend met eendenei bereid, dan wordt een praecipitaat opgemerkt (No. 2).

TABEL 33 B.

Onderzoek van ingezonden monsters advocaat met een te gering eigehalte onder toepassing van „eendenei-NaOH" sera.

Monster No.	Hoeveelheid toegevoegd ei		Temperatuur en duur der verwarming	Aantal minuten, waarna *een neerslag* werd opgemerkt bij reactie met de eendenei-NaOH sera:			
	eendenei	kippenei		57	58	77	80
1	dooier 5%	dooier 9%	tot schifting	30	20	30	20
2	dooier 16%	geen	„	7	10	7	12
3	dooier 8%	dooier 5%	„	30	20	15	25
5	dooier 10%	dooier 4%	„	20	30	15	30
4	geen	dooier 11%	„	Geen neerslag na 45 min.			

Hetzelfde gunstige resultaat wordt ook bereikt, wanneer een mengsel van eendendooier en kippendooier wordt gebezigd (No. 1, 3 en 5). Zelfs, wanneer slechts iets minder dan 30% van de gebruikte dooiermassa uit eendendooier bestaat (No. 1), kan men de aanwezigheid hiervan aantoonen. Vergelijkt men deze gegevens, met die vermeld voor de monsters No. 1, 2, 3 en 5 in tabel 18 B blz. 100, waar verslag gedaan werd van het onderzoek met „*natief*" serum, dan blijkt, welk een belangrijke vooruitgang is bereikt.

Wij zijn op grond van de in deze par. medegedeelde resultaten van oordeel, dat het onderzoek met behulp van ..NaOH-sera", hoewel niet volmaakt, toch een voldoende mate van praktische bruikbaarheid bezit voor het opsporen van eendeneibestanddeelen in advocaat.

Par. 3. Serologisch onderzoek van zachte cake.

Cakebeslag wordt veelal samengesteld uit gelijke deelen boter, suiker, ei en tarwebloem. Tijdens het bakken coaguleeren de eiwitten, zoodat een min of meer vast geheel ontstaat. Blijkens door ons verrichte voorbereidende onderzoekingen verliezen de eiproteinen hierbij vrij veel van hun soortspecifieke eigenschappen. Dit heeft tengevolge, dat aantooning van eendeneibestanddeelen met vrij groote moeilijkheden gepaard gaat.

Om de verhoudingen in iets gunstiger zin te wijzigen, is het nuttig de aanwezige boter en suiker vóór het onderzoek te verwijderen. Dit werd als volgt bereikt. Een deel der cake werd bij 37° C. gedroogd en fijn gemaakt. In een centrifugebuis met een inhoud van ongeveer 50 cc werd 1 gr kruim afgewogen en gemengd met ongeveer 50 cc gedestilleerd water. Deze massa werd in een waterbad verhit tot ongeveer 98° C. Direct daarna werden de buizen met inhoud gecentrifugeerd. De bovendrijvende vetlaag en de waterige vloeistof konden daarna verwijderd worden, zoodat een vochtig sediment, dat zeer weinig suiker en vet bevatte, overbleef.

a. Hydrolyse van zachte cake.

Door de centrifugebuis voor de proef leeg en na de uitwassching met het sediment te wegen, was het mogelijk de hoeveelheid gewasschen cake te bepalen. Zooals reeds in par. 1 van dit hoofdstuk werd betoogd, is het noodzakelijk, dat de sterkte der hydrolyse van de gecoaguleerde eibestanddeelen optimaal is. In verband met het feit, dat het eiwitgehalte en het vochtgehalte van „gewasschen" cakekruim aan eenige schommeling onderhevig zijn, bleek het noodig een tweevoudige hydrolyse toe te passen.

Dienovereenkomstig werd per gr vochtig sediment 6 en 8 cc loog, bestaande uit 2 deelen waterige en 1 deel alkoholische $^1/_5$ N. NaOH, toegevoegd. De massa werd daarna in een waterbad op een temperatuur van 45° C. gebracht en in een broedstoof gedurende twee uren bij deze temperatuur bewaard. Neutralisatie volgde hierop met $\frac{1}{2}$ N. HCl. Als indicator werd phenophtaleïne gebruikt. Vóór het centrifugeeren der oplossing werd deze 1 op 5 verdund met gebufferde physiologische zoutoplossing met een pH van 7.0. Daarna werd de oplossing nogmaals 1 op 5 verdund met physiologische zoutoplossing; zij was hierna gereed voor het onderzoek.

b. Onderzoek van een aantal zelfbereide en ingezonden monsters cake.

Voor dit onderzoek werden een aantal cakes onder ons toezicht gebakken. Een deel werd bereid uitsluitend met eendenei, een deel met kippenei en een deel met een mengsel, bestaande uit gelijke deelen kippenei en eendenei. Aan de hand van deze monsters werd de noodige routine en ervaring verkregen om dit zeer moeilijke onderzoek met succes te kunnen verrichten.

Een 10 tal monsters cake, die ons waren toegezonden, werden reeds eerder onderzocht met sera, waarmee natieve eendeneibestanddeelen aangetoond konden worden. Deze onderzoekingen werden in Hoofd-

stuk IV par. 7 besproken. Dezelfde monsters werden ongeveer gelijktijdig tevens onderzocht met eendenei-NaOH sera. Het resultaat van beide onderzoekingen werd aan de betreffende inzenders medegedeeld, alvorens ons gegevens over de samenstelling werden verstrekt.

De cake monsters werden gehydrolyseerd op een wijze, zooals onder a. werd beschreven. Wanneer 6 cc loog per gr gewasschen cake werd gebruikt, werd deze behandeling met .,hydrolyse 6" aangeduid. Werd daarentegen 8 cc gebruikt, dan werd deze met „hydrolyse 8" aangegeven.

Voor het onderzoek werden de eendenei-NaOH sera 57, 58, 77 en 80 gebruikt. Alle reacties werden tevens uitgevoerd met een physiologisch konijnenserum 29.

Voor contrôle doeleinden dienden de zelfbereide cakes van bekende samenstelling. Alle sera werden tevens getest tegenover de voor verdunning gebruikte physiologische zoutoplossing.

De resultaten verkregen bij de voorbereidende onderzoekingen werden bevestigd. Wanneer cake uitsluitend met eendeneibestanddeelen was bereid, werden positieve reacties verkregen. Wij geven de volgende voorbeelden daarvan:

TABEL 34 A.

Monster No.	Hoeveelheid toegevoegd eendenei	Hydrolyse	Aantal minuten, waarna *een neerslag* werd opgemerkt bij reactie met eendenei-NaOH serum.			
			57	58	77	80
2	± 25%	6	20	35	20	20
2	„	8	35	35	20	20
8	„	6	20	20	20	20
8	„	8	25	45	25	25
10	„	6	15	20	15	15
10	„	8	20	45	20	20

Wij herinneren er aan, dat bij het onderzoek met „natief sera" het in geen enkel geval mogelijk bleek, de aanwezigheid van eendeneibestanddeelen aan te toonen (zie blz. 103). Er is dus ook hier belangrijke vooruitgang te boeken.

Moeilijker bleek het te zijn, wanneer mengsels van eenden- en kippenei bij de bereiding der cake waren gebruikt. De reacties waren dan over het algemeen zwak, terwijl de werkzaamheid van een enkel serum te wenschen over liet.

Wij geven in tabel 34 B een overzicht van het onderzoek van een aantal cake's, die bereid waren met een mengsel bestaande uit gelijke deelen eenden- en kippenei.

TABEL 34 B.

Monster No.	Hoeveelheid toegevoegd ei		Hydrolyse	Aantal minuten, waarna *een neerslag* werd opgemerkt bij reactie met eendenei-NaOH serum.			
	eendenei	kippenei		57	58	77	80
4	12½%	12½%	6	35	30	25	25
4	,,	,,	8	30	30	15	15
5	,,	,,	6	40	45	15	15
5	,,	,,	8	35	45	15	15
6	,,	,,	6	45	45	25	15
6	,,	,,	8	35	45 neg.	15	15
7	,,	,,	6	15	45 dub.	15	15
7	,,	,,	8	45 dub.	45 dub.	30	30

Op grond van de uitkomsten van het onderzoek, zooals dit in bovenstaande tabel is weergegeven, werd geconcludeerd tot de aanwezigheid van eendeneibestanddeelen in monster 4. Ook in de monsters 5, 6 en 7 werden eendeneibestanddeelen aanwezig geacht. Een aanteekening werd er echter bij geplaatst, dat de reacties eenigszins dubieus waren. Ook hier dus betere resultaten, dan bij onderzoek met ,,natief sera" (zie blz. 103).

Een drietal andere monsters cake waren uitsluitend met kippenei bereid. Bij het onderzoek van deze monsters werden geen neerslagen opgemerkt, noch wanneer hydrolyse 6, noch wanneer hydrolyse 8 was toegepast. Wij meenen te mogen afzien van het afzonderlijk mededeelen van deze onderzoekingen. De reactie bleek dus in voldoende mate specifiek te zijn.

Vatten wij dit onderzoek samen dan blijkt:

Van de 10 ingezonden monsters cake waren 7 geheel of ten deele bereid met eendenei, hetgeen voor alle door onderzoek met NaOH sera kon worden aangetoond.

Wanneer de cake uitsluitend met eendenei was gebakken, kon met zekerheid tot de aanwezigheid daarvan worden besloten. Waren gelijke deelen kippen- en eendenei bij de bereiding gebruikt, dan kon in de meeste gevallen met vrij groote zekerheid de aanwezigheid van eendeneibestanddeelen worden achterhaald. Bij monster No. 4 kon met zekerheid tot de aanwezigheid daarvan worden besloten.

Par. 4. Samenvatting van de derde afdeeling.

De in de derde afdeeling van dit proefschrift beschreven sera werden bereid door injectie van den gecoaguleerden geheelen inhoud van kippen- en eendeneieren, nadat deze door middel van loog wederom in oplossing was gebracht. Deze hydrolyse vond plaats bij een temperatuur van 45° C. gedurende twee uren.

Een deel der sera werd verkregen door injectie van eibestanddeelen, die door toevoeging van $2^1/_7$ cc $^1/_{10}$ N. NaOH per gr ei waren opgelost. De specifiteit van deze sera was beslist onvoldoende, om daarmede eenden- en kippenei in gecoaguleerden toestand te differentieeren. Door toepassing van verzadiging met een vloeistof, waarin de verwante eisoort — na eveneens gecoaguleerd te zijn — met behulp van $2^1/_7$ cc $^1/_{10}$ N. NaOH per gr ei werd opgelost, werd het mogelijk deze sera een zoodanige specifiteit te geven, dat eenden- en kippeneibestanddeelen in „gecoaguleerden toestand" daarmee gedifferentieerd konden worden.

Een ander deel der sera werd verkregen door konijnen te immuniseeren met gecoaguleerd ei, dat door middel van 4 cc $^1/_5$ N. NaOH per gr ei was opgelost. Ook deze sera waren onvoldoende specifiek, zoodat verzadiging noodzakelijk was. De voor deze verzadiging gebruikte vloeistof werd verkregen, door de verwante eisoort eerst te coaguleeren door verwarming en dan op te lossen met 2 cc $^1/_5$ N. NaOH per gr ei. Na deze behandeling werden eveneens sera verkregen, die differentiatie mogelijk maakten.

Met behulp van deze sera werd een aantal monsters consumptieijs, advocaat en zachte cake van onbekende samenstelling onderzocht. Vatten wij het resultaat van deze onderzoekingen samen, dan komen wij tot de volgende conclusie:

Het was met deze sera mogelijk eenden- en kippeneibestanddeelen in voedings- en genotmiddelen, die een zoodanige verwarming hadden ondergaan, dat de eibestanddeelen gedenatureerd waren, met groote zekerheid van elkaar te onderscheiden.

In één monster consumptieijs No. 2, bevattende 9% eendendooier, werden eendeneibestanddeelen niet aangetoond, zonder dat de oorzaak van deze miswijzing kon worden opgespoord.

Moeilijker was het in eet- en drinkwaren de eibestanddeelen te differentieeren, wanneer mengsels van eenden- en kippenei bij de bereiding waren gebruikt. Toch kon in bijna alle gevallen een uitspraak worden gedaan. Slechts in één monster consumptieijs No. 16, bevattende 4½% eendendooier en 4% kippendooier, mislukte de aanwijzing om redenen, die niet konden worden nagespeurd. Bij een

monster advocaat, waaraan nevens 27% kippendooier 3% eendendooier was toegevoegd (No. 8), mislukte de aanwijzing eveneens; klaarblijkelijk door het te gering gehalte aan de gezochte eisoort.

De mate van verhitting der eibestanddeelen bij de bereiding der eetwaren oefende geen invloed uit op het welslagen van de differentiatie

Van de 22 onderzochte monsters consumptieijs bevatten 11 eendenei. In 9 kon met zekerheid eendenei worden aangetoond. Verder werden 11 monsters advocaat onderzocht, waarvan 9 eendenei bevatten. In 8 van deze gevallen bleek het onderzoek een betrouwbaar resultaat op te leveren. Van een 10tal monsters cake waren 7 geheel of gedeeltelijk bereid met eendenei. Hoewel bij een drietal de reacties minder uitgesproken waren, kon in alle 7 gevallen eendenei worden aangetoond.

Rlachts Rutsberg

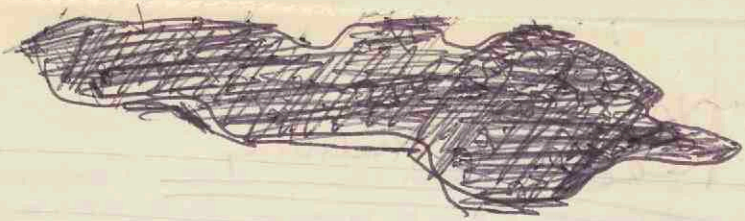
Kipeiw. proeven 35-2

klem proeven : lichtrose
" oploss : lichtrose
Reuk : goed
pH. : 9,2
opklop. : 1050 vrij slap
Drip : 80 cc (1 mm)

Kipeiw. proeven 35-3

Klem proeven : wit
Klem oploss : witopaal
pH. " : 9,1
Reuk " : goed
Opklop. : 1800 cc vrij slap
Drip : 85 cc (1 mm)

19/9-58



HOOFDSTUK VII.

VERGELIJKEND OVERZICHT VAN HET ONDERZOEK VAN INGEZONDEN MONSTERS CONSUMPTIEIJS, ADVOCAAT EN ZACHTE CAKE MET SERA, DIE NATIEVE OF GECOAGULEERDE EENDENEIBESTANDDEELEN AANTOONBAAR MAKEN.

In de tweede afdeeling van dit werk werden de resultaten medegedeeld van het onderzoek van consumptieijs, advocaat en zachte cake met zoogenaamde „natief sera". Met deze sera bleek het mogelijk te zijn eendeneitoevoeging aan te toonen, mits de eendeneibestanddeelen niet boven een zekere grens waren verhit. Aangezien de bovengenoemde voedings- en genotmiddelen als regel bij de bereiding verwarmd worden, waarbij veelvuldig de temperatuur, waarop denaturatie der eibestanddeelen begint, wordt overschreden, is het volkomen verklaarbaar, dat slechts in een beperkt aantal gevallen eendenei kon worden aangetoond. Op een totaal aantal onderzochte monsters van 43 bevatten 27 eendenei. Slechts in 6 gevallen kon de aanwezigheid daarvan met „natief" sera worden aangetoond. Er werd dus slechts in $\pm 22\%$ der onderzoekingen een juiste uitkomst verkregen.

Deze zelfde monsters werden eveneens onderzocht met zoogenaamde „eendenei-NaOH" sera. Met behulp van deze sera bleek het mogelijk te zijn in 24 van de 27 gevallen eendeneibestanddeelen aan te toonen. Hier werd dus in bijna 90% der onderzoekingen een juiste uitslag geboekt!

In 3 gevallen bleek het niet mogelijk te zijn eendeneibestanddeelen na te sporen. Een van deze, namelijk advocaatmonster No. 8, was bereid met 3% eendenei en 27% kippenei. Het was ons reeds bij voorbereidende onderzoekingen gebleken, dat de aantoonbaarheidsgrens van gecoaguleerd eendenei in een dergelijk laag percentage overschreden is. Anders was het gesteld met beide andere monsters. Dit waren de consumptieijsmonsters 2 en 16, die respectievelijk 9% en $4\frac{1}{2}\%$ eendendooier bevatten. Hier was de aantoonbaarheidsgrens niet overschreden door een te klein percentage ei. In andere monsters met gelijke eiconcentratie werden de eendeneibestanddeelen wel aangetoond. Men zie hiervoor den uitslag van het onderzoek van de monsters 17 en 18. Een afdoende verklaring voor deze miswijzingen kon niet worden gevonden.

TABEL 35.

Monster No.	Hoeveelheid toegevoegde eibestanddeelen		Eendenei-bestand-deelen aantoonbaar met natieve eendenei-antisera	Eendenei-bestand-deelen aantoonbaar met eenden-ei-NaOH sera	Temperatuur en duur der verwarming
	eendenei	kippenei			
		Consumptieijs.			
1	geen	dooier 5%	—	—	10 min. 98° C.
2	*dooier* 9%	*geen*	—	—	10 min. 98° C.
3	geen	geheel ei 7%	—	—	20 min. 65° C.
4	geheel ei 20%	geen	+	+	20 min. 65° C.
5	geen	geen	—	—	geen
6	geen	geheel ei 5%	—	—	10 min. 85° C.
7	geen	geheel ei 5%	—	—	5 min. 80° C.
8	geen	geheel ei 5%	—	—	10 min. 80° C.
9	geheel ei 5%	geheel ei 5%	—	+	10 min. 95° C.
10	geheel ei 5%	geheel ei 5%	—	+	10 min. 95° C.
11	dooier 3% geheel ei 15%	geen	+	+	tot 70° C.
12	dooier 3% geheel ei 15%	geen	—	+	tot 85° C.
13	geen	dooier 7%	—	—	tot 85° C.
14	geen	dooier 7%	—	—	tot 70° C.
15	dooier 9%	geen	+	+	tot 70° C.
16	*dooier* 4½%	*dooier* 4%	—	—	tot 90° C.
17	dooier 5%	geen	—	+	doorgekookt
18	dooier 3%	dooier 3%	—	+	doorgekookt
19	geen	dooier 5%	—	—	doorgekookt
20	geen	geen	—	—	geen
21	dooier 5%	geen	+	+	tot 70° C.
25	geen	ei-wit 20%	—	—	geen
		Advocaat.			
1	dooier 5%	dooier 9%	—	+	tot schifting
2	dooier 16%	geen	—	+	tot schifting
3	dooier 8%	dooier 5%	—	+	tot schifting
4	geen	dooier 11%	—	—	tot schifting
5	dooier 10%	dooier 4%	—	+	tot schifting
6	geheel ei 30%	geen	±	+	tot dikwordens
7	geen	geheel ei 30%	—	—	tot dikwordens
8	*geheel ei* 3%	*geheel ei* 27%	—	—	tot dikwordens
9	geheel ei 9%	geheel ei 21%	—	+	tot dikwordens
10	geheel ei 15%	geheel ei 15%	+	+	tot dikwordens
11	geheel ei 30%	geen	+	+	geen

TABEL 35 (vervolg).

Monster No.	Hoeveelheid toegevoegde eibestanddeelen		Eendenei-bestand-deelen aantoonbaar met natieve eendenei-antisera	Eendenei-bestand-deelen aantoonbaar met eenden-ei-NaOH sera	Temperatuur en duur der verwarming
	eendenei	kippenei			
			Cake.		
1	geen	25%	—	—	gaar gebakken
2	25%	geen	—	+	gaar gebakken
3	geen	25%	—	—	gaar gebakken
4	12½%	12½%	—	+	gaar gebakken
5	12½%	12½%	—	+?	gaar gebakken
6	12½%	12½%	—	+?	gaar gebakken
7	12½%	12½%	—	+?	gaar gebakken
8	25%	geen	—	+	gaar gebakken
9	geen	25%	—	—	gaar gebakken
10	25%	geen	—	+	gaar gebakken

Wij willen er echter met nadruk op wijzen, dat in geen enkel geval positieve recaties werden opgemerkt, wanneer geen eendenei aanwezig was. De positieve uitslagen zijn derhalve als voldoende betrouwbaar aan te merken. Wij geven ten slotte in tabel 35 een overzicht van het onderzoek van alle ingezonden monsters.

Uit het onderzoek der monsters consumptieijs zijn verder nog eenige conclusies te trekken omtrent den graad der verwarming, die bij de bereiding werd toegepast. Zooals in par. 5 van Hoofdstuk IV werd opgemerkt, worden eendeneibestanddeelen in consumptieijs gedenatureerd bij een temperatuur van 75—80° C. Bij deze temperatuur verdwijnt dus de aantoonbaarheid der eibestanddeelen met „natief serum". Monsters, die eendenei bevatten, maar die bij de bereiding tot een hoogere temperatuur dan 75 à 80° C. werden verhit, geven dus geen neerslag met „natief sera". Met behulp der „eendenei-NaOH" sera werden echter in vele gevallen wel neerslagen opgemerkt. Op deze wijze was het mogelijk te verklaren, dat de monsters 9, 10, 12, 17 en 18 verhit waren tot een temperatuur hooger dan 75—80° C. Om overeenkomstige redenen mocht geconcludeerd worden, dat de eendeneibestanddeelen in de monsters 4, 11, 15 en 21 deze temperatuur bij de bereiding niet hadden bereikt.

Wij meenen verder nog naar voren te moeten brengen, dat de bereiding van en het werken met „natief sera" relatief eenvoudig zijn, mits de in dit werk gegeven wenken worden opgevolgd. Moeilijker is de bereiding der „eendenei-NaOH sera". De bereiding van deze sera en het werken daarmede eischen een vrij groote routine en ervaring, die pas, nadat men langeren tijd in deze richting werkzaam is geweest, verkregen worden.

Veelvuldige contrôles zijn daarbij onontbeerlijk.

HOOFDSTUK VIII.

SLOTBESCHOUWING.

Overzien wij aan de hand van de in de Inleiding gestelde vragen de resultaten van deze onderzoekingen, dan kunnen wij het volgende vaststellen:

Teneinde den consument te beschermen tegen de gevaren eener Salmonella-infectie door het gebruik van onvoldoend verhitte eendeneibestanddeelen, werden wettelijke bepalingen in het leven geroepen, die de toepassing van eendeneieren bij de bereiding van eet- en drinkwaren aan een sterke beperking onderwerpen.

Voor de handhaving van deze wettelijke bepalingen is het noodzakelijk, dat deze bestanddeelen in de waren aangetoond kunnen worden. In de literatuur werd vergeefs gezocht naar een methode van onderzoek om dit doel te bereiken.

Om verschillende redenen werd de praecipitatiereactie verkozen om te trachten hiermede differentieering van eibestanddeelen tot stand te brengen.

Door injectie bij konijnen van den geheelen inhoud van eenden- en kippeneieren werden sera bereid, die niet voldoende specifiek waren. Door verzadiging van deze sera, waarbij de benoodigde hoeveelheid verwant antigeen vooraf nauwkeurig werd bepaald, waren wij in staat eenden- en kippeneibestanddeelen zelfs in groote verdunning van elkaar te onderscheiden. Niet alleen, dat met deze sera eenden- en kippenei in onvermengden toestand van elkaar gedifferentieerd konden worden, ook in mengsels van beide konden de bestanddeelen herkend worden.

Een toevoeging van 1% van de eene ei-wit soort aan de andere kon worden aangetoond. Evenzoo kon een dooiertoevoeging van 10% van de eene aan de andere worden achterhaald. Dezelfde gunstige resultaten konden worden verkregen, wanneer de eiprodukten in gedroogden toestand ter onderzoek kwamen. Hierbij bleek, dat de praecipitogeen-eigenschappen van ei-wit bij het drogen tot zelfs bij hooge temperatuur onverminderd behouden bleven. Hetzelfde bleek niet het geval te zijn voor dooier. De praecipitogeen-eigenschappen daarvan verminderden meer, naarmate de droging langer

had geduurd en de daarbij toegepaste temperatuur hooger was geweest.

Bij het onderzoek van een groot aantal in den handel voorkomende partijen gedroogde en vloeibare, door middel van boorzuur geconserveerde, eiprodukten bleek een groot deel van deze partijen van ondeugdelijke samenstelling te zijn of onjuist te zijn aangeduid. Veelvuldig werd vermenging van kippenei met eendenei vastgesteld, zonder dat zulks viel op te maken uit de aanduiding, waaronder de waar in den handel werd gebracht.

De werkzaamheid der sera werd verder beproefd aan ingezonden monsters consumptieijs, advocaat en zachte cake. Eendeneibestanddeelen konden daarin tot in kleine hoeveelheid worden aangetoond, mits de bij de bereiding toegepaste verwarming een zekere grens niet had overschreden. Voor consumptieijs konden wij deze grens vaststellen op 75—80° C. Bij de bereiding van advocaat moet er mede gerekend worden, dat door de aanwezige alkohol deze grens lager ligt. Bij de bereiding van normale zachte cake wordt deze grens steeds ver overschreden.

De verwarming der eet- en drinkwaren stelde dus een grens aan de mogelijkheden van het onderzoek met deze z.g. „natief" sera, zoodat slechts in een beperkt aantal gevallen eendeneitoevoeging kon worden vastgesteld. Wij meenden ons met deze resultaten niet tevreden te mogen stellen, omdat in de betreffende wettelijke bepalingen terecht geen ontheffing wordt verleend, wanneer deze betrekkelijk lage temperatuur bij de bereiding der eetwaren wordt overschreden. Bovendien ontbrak, volgens de ons uit de literatuur ten dienste staande gegevens, de zekerheid, dat bij overschrijding van deze temperatuur in de verschillende levensmiddelen geen virulente Salmonella-bacteriën meer zouden voorkomen.

Derhalve werd een methode uitgewerkt om eendeneibestanddeelen onafhankelijk van de verwarming, die deze hadden ondergaan, te kunnen aantoonen. Hierbij werden praecipiteerende sera bereid door injectie bij konijnen van gecoaguleerden en daarna door loog opgelosten eiinhoud. Deze sera bleken zeer onvoldoende specifiteit te bezitten, zoodat tot verzadiging moest worden overgegaan. De verwante eisoort werd hiervoor eveneens eerst gecoaguleerd en daarna door loog opgelost. De hoeveelheid voor verzadiging benoodigde verwante eioplossing werd vooraf nauwkeurig bepaald. Met deze sera bleek het mogelijk te zijn in voedings- en genotmiddelen eendenei aan te toonen, ook al was de waar bij de bereiding tot 100° C. verwarmd. In een

enkel geval gelukte de aantooning niet, zonder dat de reden daarvan met zekerheid kon worden opgespoord.

Dezelfde resultaten konden worden geboekt, wanneer voor de immuniseering der proefdieren kippenei werd gebezigd. Deze sera dienden, teneinde voldoende specifiteit te verkrijgen, eveneens verzadigd te worden.

Hoewel wij overtuigd zijn, dat de in dit proefschrift beschreven methoden van onderzoek voor verbetering vatbaar zijn, vooral de bereiding van en het onderzoek met „eendenei-NaOH sera", meenen wij grootendeels geslaagd te zijn in de ons in de Inleiding gestelde opgave.

Schluszbetrachtung.

Übersehen wir an der Hand der in der Einleitung gestellten Fragen die Resultate dieser Untersuchungen, so können wir folgendes feststellen.

Um den Konsumenten gegen die Gefahren einer Salmonellainfektion durch den Genusz ungenügend erhitzter Enteneibestandteile zu schützen, wurden gesetzliche Bestimmungen ins Leben gerufen, die die Anwendung von Enteneiern bei der Bereitung von Esz- und Trinkwaren einer starken Beschränkung unterwerfen.

Für die Aufrechterhaltung dieser gesetzlichen Bestimmungen ist es notwendig, dasz diese Bestandteile in den Waren nachgewiesen werden können. In der Literatur wurde vergebens nach einer Untersuchungsmethode gesucht um dieses Ziel zu erreichen.

Aus verschiedenen Gründen wurde die Präzipitatreaktion gewählt um zu versuchen hiermit Differenzierung von Eibestandteilen zustande zu bringen.

Durch Injektion auf Kaninchen des ganzen Inhalts von Enten- und Hühnereiern wurden Sera hergestellt, die nicht genügend spezifisch waren. Durch Sättigung dieser Sera, bei welcher Bearbeitung die benötigte Menge verwandtes Antigen vorher genau bestimmt wurde, waren wir imstande Enten- und Hühnereibestandteile sogar in groszer Verdünnung voneinander zu unterscheiden. Nicht nur dasz mit diesen Sera Enten- und Hühnerei in unvermischten Zustand voneinander differenziert werden konnten, auch in Mischungen von beiden konnten die Bestandteile erkannt werden.

Eine einprozentige Beifügung von einer Eiweiszart bei der andern konnte nachgewiesen werden. Ebenso konnte eine zehnprozentige Dotterbeifügung von einer bei der andern eingeholt werden. Dieselben günstigen Resultate konnten erzielt werden, wenn die Eiprodukte in getrocknetem Zustand zur Untersuchung gelangten. Hierbei stellte sich heraus, dasz die Präzipitogeneigenschaften des Eiklars beim Trocknen selbst bei hohen Temperaturen unvermindert beibehalten blieben. Es zeigte sich, dasz dies für den Dotter nicht der Fall war. Die Präzipitogeneigenschaften des Dotters verminderten um so mehr, als das Trocknen länger gedauert hatte und die dabei angewandte Temperatur höher gewesen war.

Bei der Untersuchung einer groszen Anzahl im Handel vorkommende

Partien getrockneter und flüssiger, mittels der Borsäure konservierter, Eiprodukte zeigte es sich, dasz ein groszer Teil dieser Partien von einer untauglichen Zusammensetzung war oder dasz man sie unrichtig bezeichnet hatte. Vielfach wurde Vermischung von Hühnerei mit Entenei festgestellt, ohne dasz man darauf schlieszen konnte aus der Bezeichnung, unter der die Ware in den Handel gebracht wurde.

Die Wirksamkeit der Sera wurde ferner auf eingesandte Muster Speiseeis, Eierkognak und weichen Kek geprüft. Enteneibestandteile konnten darin bis in kleine Menge nachgewiesen werden, vorausgesetzt dasz die bei der Bereitung angewandte Erwärmung eine gewisse Grenze nicht überschritten hatte. Für Speiseeis konnten wir diese Grenze auf 75—80° C. feststellen. Bei der Bereitung von Eierkognak musz man damit rechnen, dasz durch den sich darin befindlichen Alkohol, diese Grenze niedriger liegt. Bei der Bereitung von normalem weichem Kek wird diese Grenze stets weit überschritten.

Die Erwärmung der Esz- und Trinkwaren setzte also den Möglichkeiten der Untersuchung mit diesen sogenannten „natief" Seren eine Grenze, sodasz nur in einer beschränkten Anzahl Fällen Enteneibeifügung festgestellt werden konnte. Wir meinten uns mit diesen Resultaten nicht begnügen zu dürfen, weil in den in Frage stehenden gesetzlichen Bestimmungen mit Recht keine Erlassung erteilt wird, wenn diese verhältnismäszig niedrige Temperatur bei der Bereitung der Eszwaren überschritten wird. Überdies fehlte nach den uns aus der Literatur zur Verfügung stehenden Angaben die Sicherheit, dasz bei Überschreitung dieser Temperatur in den verschiedenen Lebensmitteln keine virulenten Salmonellabakterien mehr vorkamen.

Deshalb wurde eine Methode ausgearbeitet um Enteneibestandteile, unabhängig von der Erwärmung, die diese erlitten hatten, nachweisen zu können. Hierbei wurden durch Injektionen auf Kaninchen von koaguliertem und nachher durch Lauge aufgelöstem Eiinhalt präzipitierende Sera bereitet. Es stellte sich heraus, dasz diese Sera eine sehr ungenügende Spezifität besaszen, sodasz zur Methode der „Sättigung" geschritten werden muszte. Die verwandte Eiart wurden hierzu gleichfalls zuerst koaguliert und darauf durch Lauge aufgelöst. Die für Sättigung benötigte Menge verwandter Eiart wurde vorher genau bestimmt. Mittels dieser Sera war es möglich in Nahrungs- und Genuszmitteln Entenei nachzuweisen, wenn auch die Ware bei der Bereitung bis 100° C. erwärmt worden wäre. In einem einzigen Falle gelang der Nachweis nicht, ohne dasz die Ursache davon mit Bestimmtheit ausfindig gemacht werden konnte.

Dieselben Resultate konnten verzeichnet werden, wenn für die Immunisierung der Versuchstiere Hühnerei angewandt wurde. Um eine genügende Spezifität zu bekommen muszten diese Sera gleichfalls gesättigt werden.

Obwohl wir überzeugt sind, dasz die in dieser Dissertation beschriebenen Untersuchungsmethoden verbesserlich sind, zunächst die Bereitung von und die Untersuchung mit „Entenei NaOH Sera", glauben wir, dasz uns die Aufgabe, die wir uns in der Einleitung gestellt haben, groszenteils gelungen ist.

LITERATUURLIJST.

[1]) T. S. ZWANENBURG, Over „Salmonella-infectie" in eendeneieren. Diss. Utrecht, 1937.

[2]) G. POPP, Die Verwendung ultravioletten Lichtes bei der Untersuchung von Nahrungsmitteln. Z. Unters. Nahr. Genuszm., **52**, 165, 1926.

[3]) H. W. DUDLEY, H. E. WOODMAN, The Specificity of Caseinogens. Bioch. Journ., **9**, 97, 1915.

[4]) H. D. DAKIN, H. H. DALE, Chemical structure and antigenic specificity. Bioch. Journ., **13**, 248, 1919.

[5]) M. NEISZER, H. SACHS, Ein Verfahren zum forensischen Nachweis der Herkunft des Blutes. Berl. Klin. Wochenschr., **42**, 1388, 1905.

[5]) A. v. WASSERMANN, Über d. prakt. Bedeutung d. Komplementbindung. Z. Infektionskr. Haust., Bd. 1, 1906. cit. n. J. Bongert, Bakt. Diagn. der Tierseuchen. 7e Aufl., p. 177.

[7]) R. KRAUS, Ueber specifische Reaktionen in keimfreien Filtraten aus Cholera, Typhus und Pestbouillonkulturen, erzeugt durch homologes Serum. Wien. Klin. Wochenschr., **10**, 736, 1897.

[8]) UHLENHUTH, Weidanz, Anl. z. Ausf. biol. Eiweiszdiff., 1909.

[9]) H.G.WELLS, Studies on the Chemistry of Anaphylaxis. J. Inf. Dis., **9**, 147, 1911.

[10]) A. BESREDKA, J. BROUFENBRENNER, Anaphylaxie und Antianaphylaxie gegenüber Hühnereiweisz. Ann. Inst. Pasteur, **25**, 392, 1911.

[11]) H. SACHS, J. BAUER, Über die Differenzierung des Eiweiszes in Gemischen verschiedener Eiweiszarten. Arb. Kgl. Inst. exp. Ther. Frankfort, **3**, 85,1907.

[12]) W. RICKMANN, Beitrag zur biologischen Eiweiszdifferenzierung. Z. Fleisch. u. Milchhyg., **17**, 197, 1907.

[13]) O. WEIDANZ, K. BORCHMANN, Vergleichende Untersuchungen über die praktische Verwertbarkeit der Präcipitinreaktion und der Komplementbindungsmethode zum Nachweis von Pferdefleisch. Arb. Kaiserl. Gesundheitsamt, **28**, 477, 1908.

[14]) P. UHLENHUTH. O. WEIDANZ, Handb. Techn. Meth. Immunitätsforsch., II, XXXII, 1909.

[15]) J. BAUER, Über die Spezifität der biologischen Eiweiszdifferenzierung. Arb. Kgl. Inst. exp. Ther. Frankfort, **3**, 71, 1907.

[15]) G. SEIFFERT, Über die Verwendbarkeit der Komplementbindungsreaktion zum Nachweis von Pferdefleisch in Würsten. Z. Hyg., **71**, 547, 1912.

[17]) UHLENHUTH, WEIDANZ, WEDEMANN, Technik und Methodik des biologischen Verfahrens zum Nachweis von Pferdefleisch. Arb. Kaiserl. Gesundheitsamt, **28**, 449, 1908.

[18]) E. RUPPIN, Zum Nachweise von Pferdefleisch. Z. Unters. Nahr. Genuszm., **5**, 356, 1902.

[19]) J. BONGERT, Bakteriologische Diagnostik der Tierseuchen, 7e Aufl., 131, 1927.

[20]) J. H. LEWIS, H. G. WELLS, Immunologic Action of Muccoids. J. Inf. Dis., **40**, 316, 1927.

[21]) Tchistowitch, Immunisation contre le Sérum d'Anguilles. Ann. Inst. Pasteur, **13**, 406, 1899.
[22]) J. Bordet, Agglutination et Dissolution des Globules rouges. Ann. Inst. Pasteur, **13**, 225, 273, 1899.
[23]) Kolle, Wassermann, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, III-1, 366, 1930.
[24]) W. Myers, Immunität gegen Proteide. Centralbl. Bakt., I, **28**, 237, 1900.
[25]) W. Myers, On Immunity against Proteids. The Lancet, **2**, 98, 1900.
[26]) Uhlenhuth, Neuer Beitrag zum spezifischen Nachweis von Eiereiweisz auf biologischen Wege. D. Med. Wochenschr., **26**, 734, 1900.
[27]) Uhlenhuth, Weitere Mittheilungen über meine Methode zum Nachweise von Menschenblut. D. Med. Wochenschr., **27**, 260, 1901.
[28]) Gengou, Sur les sensibilatrices des sérums actifs contre les substances albuminoides. Ann. Inst. Pasteur, **16**, 734, 1902.
[29]) F. Umber, Zur Chemie und Biologie der Eiweiszkörper. Berl. klin. Wochenschr., **39**, 657, 1902.
[30]) G. H. F. Nuttall, Blood Immunity and Blood Relationship, Cambridge, 1904.
[31]) A. Schütze, Ueber einige praktische Anwendungen der Präcipitine in der Nahrungsmittelchemie. Z. Hyg. Infectionskrankh., **47**, 144, 1904.
[32]) D. Ottolenghi, Eine neue Methode zum Nachweis der Gegenwart von Eigelb in Nährteigen. Archivo per le Science Mediche, **27**, 1903. Sonderabdruck. cit. n. Z. Unters Nahr. Genuszm., **8**, 438, 1904.
[33]) D. Ottolenghi, Estratto dagli Atti della Accademia dei Fisio critici, Giena, 12 Juli, 1902, Serie 4, vol. 14. cit. n. Schütze, 31.
[34]) A. Schulz, Die Technik quantitativer Eiweiszbestimmungen mit Hilfe der Präzipitinreaktion. Z. Unters. Nahr. Genuszm., **12**, 257, 1906.
[35]) D. A. Welsh, H. G. Chapmann, On the differentiation of proteins of closely related species by the Precipitin Reaction. Journ. Hyg., **10**, 177, 1910.
[36]) B. Galli-Valerio, Quelques recherches avec les antisérums pour l'albumine du sang et de l'oeuf de poule. Z. Immunitätsforsch. exp. Ther., **9**, 313, 1911.
[37]) B. Galli-Valerio, M. Bornand, Sur quelques applications des lacto — et ovosera. Z. Immunitätsforsch. exp. Ther., **14**, 32, 1912.
[38]) Emmerich, Untersuchungen mit Eigelbantiseren, zugleich ein Beitrag zu den Beziehungen der verschiedenen Eigelbarten zu einander. Z. Immunitätsforsch. exp. Ther., **17**, 299, 1913.
[39]) Ch. Arragon, M. Bornand, Die Kontrolle der Eierteigwaren mit Hilfe eines Eiereiweisz fällendes Serums. Chem. Ztg., **37**, 1345, 1913.
cit. n. Z. Unters. Nahr. Genuszm., 27, 548, 1914.
[40]) H. Seng, Untersuchungen mit Hünnereigelb-Antiserum. Z. Immunitätsforsch. exp. Ther., **20**, 355, 1914.
[41]) F. Gothe, Untersuchung und Beurteilung der Eierteigwaren mittels specifischer Sera. Z. Unters. Nahr. Genuszm., **30**, 389, 1915.
[42]) N. Waterman, Über die Unterscheidung von Hühner- und Enteneiweisz. Chem. Weekbl., **11**, 120, 1914.
cit. n. Z. Unters. Nahr. Genuszm., **37**, 85, 1919.
[43]) J. Thoni, Studien über die Ermittelung des Eigehaltes in Nahrungsmitteln auf präzipitometrischen Wege. Mitteilungen Gebiete Lebensmittelunters. Hyg. Schweizer. Gesundheitsambt, **10**, 1, 1919.

44. J. H. Lewis, H. G. Wells, Immunologic Action of Mucoids. J. Inf. Dis., **40**, 316, 1927.
45) S. B. Hooker, W. C. Boyd, The existence of Antigenic Determinants of diverse Specificity in a single Protein. J. Immunol., **26**, 469, 1934.
46) Fr. Graetz, Ueber die biologische Sonderstellung der Geschlechtszellen beim Huhn. Z. Immunitätsforsch. exp. Ther., **21**, 150, 1914.
47) C. Strzyzowsky, Über die Fähigkeit des Tierkörpers polyvalente präzipitierende Sera zu erzeugen. Z. physiol. Chem., **66**, 1, 1910.
48) E. Rosenthal, M. Takeoka, Ueber die quantitativen Verhältnisse der Antikörperproduktion bei Immunisierung mit zwei Antigenen. Z. Immunitätsforsch. exp. Ther., **20**, 559, 1914.
49) L. Hektoen, A. K. Boor, Simultaneous multiple Immunization. J. Inf. Dis., **48**, 588, 1931.
50) L. Hektoen, E. Delves, Progressive, selective absorption of Precipitins in multivalent Serum. J. Inf. Dis., **50**, 237, 1932.
51) Uhlenhuth, Weidanz, Praktische Anleitung zur Ausführung des biologischen Eiweiszdifferenzierungsverfahrens u.s.w., Jena, 1909.
52) G. Hauser, Ueber die Leistungsfähigkeit des Uhlenhuth'schen serodiagnostischen Verfahrens bei Anwendung des Kapillarmethode. Zentralbl. Bakt., I. Ref., **39**, 194, 1907.
53) J. Fiehe, Uber den Nachweis von Pferdefleisch in Fleisch- und Wurstwaren mittels der Präcipitat-Reaktion. Z. Unters. Nahr. Genuszm., **13**, 744, 1907.
54) W. Fornet, M. Müller, Zur Herstellung und Verwendung präzipitierender Sera. Z. Biol. Techn. Methodik, **1**, 201, 1908/1909.
55) W. Fornet, M. Müller, Praktische und theoretische Präzipitinuntersuchungen. Z. Hyg., **66**, 215, 1910.
56) J. Bauer, Die Methodik der biologischen Milchuntersuchung, Stuttgart, 1913.
57) A. Ascoli, Die Thermopräzipitinreaktion, Wien Leipzig 1922.
58) F. Forster, A comparative Study of Precipitinogen and Precipitin Curves. J. Inf. Dis., **32**, 105, 1923.
59) G. Meiszner, Beitrag zur Frage der Herstellung hochwertiger, spezifischer präzipitierender Sera für forensische Zwecke. Centralbl. Bakt. I, Or., **100**, 258, 1926.
60) A. Brüning, B. Kraft, Zur Technik des biologischen Eiweiszdifferenziehrungsverfahrens. Z. Unters. Nahr. Genuszm., **54**, 347, 1927.
61) L. Hektoen, Biologic Tests for medicolegal Purposes. New-England J. Med., **199**, 120, 1928.
62) H. R. Wolfe, The Specificity of Precipitins for serum. J. Immunol., **31**, 103, 1936.
63) A. Castellani, Die Agglutination bei gemischter Infection und die Diagnose der letzteren. Z. Hyg., **40**, 1, 1902.
64) Ascoli, Zur Kenntnis der Präzipitinwirkung und der Eiweiszkörper des Blutserums. Munch. Med. Wochenschr., **49**, 1409, 1902.
64) Kister, Weichardt, Weiterer Beitrag zur Frage des biologischen Blutnachweises. Z. Medizinalbeamte, **15**, 729, 1902.
cit. n. Z. Fleisch u. Milchhyg., 217, 1903.
66) W. Weichardt, Der Nachweis individueller Blutdifferenzen. Hyg. Rundschau, **13**, 756, 1903.
67) Michaelis, Weitere Untersuchungen über Eiweisz-präzipitine. D. Med. Wochenschr., **30**II, 1240, 1904.

[68]) F. Obermayer, E. P. Pick, Beiträge zur Kenntnis der Präzipitinbildung. Wien. klin. Wochenschr., **17**, 265, 1904.

[69]) Bertarelli, Sopra i sieri specifici precipitanti le globuline e l'albumina del siero. Rivista d'Ingiene, 1904, n. 20.
cit. n. Centralbl. Bakt. I, Ref., **35**, 358, 1904.

[70]) E. Friedberger, A. Collier, Ueber heterogenetische Antigene und Antikörper. Z. Immunitätsforsch. exp. Ther., **28**, 237, 1919.

[71]) Friedberger, Jarre, Ueber aspezifische präzipitierende Sera, Z. Immunitätsforsch. exp. Ther., **30**, 351, 1920.

[72]) P. Manteufel, H. Beger, Untersuchungen über unspezifische Reaktionen bei präzipitierenden Antiseren, Z. Immunitätsforsch. exp. Ther., **33**, 348, 1922.

[73]) Hektoen, Schulhof, J. Inf. Dis., **33**, 224, 1923.

[74]) E. Friedberger, G. Meiszner, Typus und Wesen der isogenetischen-, verwantschafts- und heterogenetischen Präzipitation mit monogenen Antiseris. Z. Immunitätsforsch. exp. Ther., **36**, 233, 1923.

[75]) Ilchun Yu, Untersuchungen über heterologe Präzipitation. Centralbl. Bakt. I. Or., **90**, 381, 1923.

[76]) L. Hektoen, W. H. Welker, Further Observations on Precipitin Reaction of Bence-Jones Protein. J. Inf. Dis., **34**, 440, 1924.

[77]) J. Fürth, Über die Methodik der biologischen Eiweiszdifferenzierung. Archiv Hyg., **92**, 158, 1924.

[78]) H. Beger, Versuche zur Beseitigung der heterologen Trübungen bei präzipitierenden Eiweiszantiseren. Centralbl. Bakt. I. Or., **91**, 519, 1924.

[79]) G. Blumenthal, Zur Frage der Gewinnung hochwertiger und spezifischer präcipitierender Antisera für den forensischen Blutnachweis. D. Zeitschr. ges. gerichtl. Med., **10**, 17, 1927.

[80]) W. Gaehtgens, Über die Differenzierung verschiedener Käsearten auf biologischem Wege. Archiv Hyg., **100**, 82, 1928.

[81]) H. R. Wolfe, Identification of Blood Serum by Precipitin Reaction. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **27**, 146, 1929.

[82]) K. Nishegoredzeff, Ueber die Beseitigung der sogenannten Neben- und Verwandtschaftspräzipitine im Blute immunierter Tiere. Z. Immunitätsforsch. exp. Ther., **66**, 276, 1930.

[83]) A. K. Boor, L. Hektoen, Preparation and antigenic Properties of Carbonmonoxide Hemoglobin. J. Inf. Dis., **46**, 1, 1930.

[84]) L. Hektoen, A. K. Boor, The Specificness of Hemoglobin Precipitins. J. Inf. Dis., **49**, 29, 1931.

[85]) M. Jordanoff, Die Differenzierung der verschiedenen Butterarten auf biologischem Wege. Z. Fleisch. u. Milchhyg., **42**, 300, 1932.

[86]) H. R. Wolfe, Factors which may modify Precipitin Tests in their Application to Zoölogy and Medicin. Psysiological Zoölogy, **6**, 55, 1933.

[84]) D. Hallmann, Versuche zur Herstellung spezifisch präzipitierender Sera. Centralbl. Bakt. I. Or., **130**, 234, 1933.

[88]) N. P. Sherwood, Immunology, St. Louis, 1935.

[89]) H. R. Dean, R. A. Webb, The influence of optimal proportions of antigen and antibody in the serum precipitation reaction. J. Pathol. Bact., **29**, 473, 1926.

[90]) Michaelis, Weitere untersuchungen über Eiweiszpräzipitine. D. Med. Wochenschr., **30**II, 1240, 1904.

[91]) H. R. Dean, The Precipitation Reaction. A. System of Bacteriology, V - 6 - Immunity, 1931, p. 424, Med. Research. Counsil, London, His Majesty 's Stationery Office.
cit. n. Sherwood, 88.

[92]) Uhlenhuth, Haendel, Untersuchungen über die praktische Verwertbarkeit der Anaphylaxie zur Erkennung und Unterscheidung verschiedener Eiweiszarten. Z. Immunitätsforsch. exp. Ther., **4**, 761, 1910.
cit. n. Z. Unters. Nahr. Genuszm., **22**, 525, 1911.

[93]) Bachrach, Die Verwertung der spezifischen überempfindlichkeits-Reaktion zur biologischen Eiweiszdifferenzierung. Vierteljahrsschr. gerichtl. Med. Sanitätswesen, **40**, 235, 1910.
cit. n. Z. Unters. Nahr. Genuszm., **23**, 154, 1912.

[94]) G. Buisman, Praktisch handboek voor den brood- en banketbakker, Amsterdam, 1936.

[95]) H. F. Blessinga, Vakboek voor de banketbakkerij. Amsterdam, 1936.

[96]) A. Schütze, Ueber ein biologisches Verfahren zur Differenzierung der Eiweiszstoffe verschiedener Milcharten. Z. Hyg. Infectionskrankh., **36**, 5, 1901.

[97]) W. A. Schmidt, Über ein Präcipitin, welches es ermöglicht auch gekochtes (unlösliches) Eiweisz zu differenzieren. Z. Immunitätsforsch. exp. Ther., **13**, 166, 1912.

[98]) W. A. Schmidt, Studien über Präzipitinreaction und erhitzte Eiweiszstoffe. Bioch. Zeitschr., **14**, 294, 1908.

[99]) H. G. Wells, Studies on the Chemistry of Anaphylaxis. J. Inf. Dis., **6**, 506, 1909.

[100]) A. Versell, Über das serologische Verhalten von Milch und Milcheiweiszkörpern in frischem und gekochtem Zustande. Z. Immunitätsforsch., **24**, 267, 1916.
cit. n. Z. Unters. Nahr. Genuszm., **38**, 43, 1919.

[101]) H. Zinsser, On antigenic Properties of Horse Serum and Egg Albumen after Heat Coagulation. Journ. Immunol., **9**, 227, 1924.

[102]) Kyoyetsuro Fujiwara, Kochkoaguliertes Serum als Präcipitogen. D. Z. Ges. Gerichtl. Med., **1**, 562, 1922.

[103]) R. Tsukasaki, On the Alkohol Precipitate of Serum as Antigen. The Tohoku J. Exp. Med., **3**, 653, 1922.

[104]) F. Obermayer, E. P. Pick, Beiträge zur Kenntnis der Präzipitinbildung. Wien. klin. Wochenschr., **17**, 265, 1904.

[105]) F. Loeffler, Ueber ein neues Verfahren zur Gewinnung von Antikörpern. D. Med. Wochenschr., **30**, 1913, 1904.

[106]) F. Obermayer, E. P. Pick, Ueber die chemischen Grundlagen der Arteigenschaften der Eiweiszkörper, Bildung von Immuunpräzipitinen durch chemisch veränderte Eiweiszkorper. Wien. klin. Wochenschr., **19**, 327, 1906.

[107]) W. Fornet, M. Müller, Praktische und theoretische Präzipitinuntersuchungen. Z. Hyg., **66**, 215, 1910.

[108]) K. Landsteiner, E. Prasek, Ueber die Aufhebung der Artspezifizität von Serumeiweisz. Z. Immunitätsforsch. exp. Ther., **20**, 211, 1914.

[109]) J. Fürth, Antigenic Character of Heated Protein. Journ. Immunol., **10**, 777, 1925.

[110]) R. Torikata, B. Tamaki, Die Impedinerscheinung bei immunisatorischer Erzeugung der Präzipitine. Z. Immunitätsforsch. ex. Ther., **65**, 142, 1930.

[111]) H. Chick, C. J. Martin, On the „Heat Coagulation" of Proteins. J. Physiol., **43**, 1, 1911/1912.

[112]) A. Schütze, Weitere Beiträge zum Nachweis verschiedener Eiweiszarten auf biologischem Wege. Z. Hyg. Infectionskrankh., **38**, 487, 1901.

[113]) M. Piorkowski, Die specifischen Sera und ihre Verwertung bei der Fleischuntersuchung. Ber. d. Deutsch. Pharmaz. Gesellsch., **8**, 30, 1902.

[114]) W. A. Schmidt, Einige Versuche über die Geschwindigkeit der Inaktivierung (Denaturierung) der präcipitablen Substanz durch Alkalien. Bioch. Z., **24**. 45, 1910.

[115]) K. Chapchev, Sur les Propriétés de certaines Precipitines agissent sur les Albumines denaturées. C. R. Soc. Biol., **2**, 657, 1913.

[116]) D. Schenk, H. Burmeister, Serologischer Nachweis von Kartoffel und Kartoffelzubereitungen. Z. Unters. Nahr. Genuszm., **30**, 325, 1915.

[117]) D. Schenk, Die Anwendbarkeit des serologischen Verfahrens bei der Prüfung pharmazeutischer Eiweiszpräparate. Apoth. Z. Deutsch. Apoth. Ver., **31**, 426, 431, 435, 1916.

[118]) K. Landsteiner, C. Barron, Ueber die Einwirkung von Säure und Lauge auf Serumeiweiszantigen. Z. Immunitätsforsch. exp, Ther., **26**, 142, 1917.

[119]) C. ten Broeck, Die nicht-antigenen Eigenschaften von razemierten Eieralbumin. Journ. Biol. Chem., **17**, 369, 1914.

[120]) R. Rosenberg, Versuche zur Artdifferenzierung von gekochtem Eiweisz mittels der Präzipitinreaktion. Centralbl. Bakt., I, Or, **98**, 259, 1926.

[121]) S. Wu, C. ten Broeck, C. P. Li, Studies on Denaturation of Proteins. Chinese J. Physiol., **1**, 277, 1927.

[122]) C. Oppenheimer, R. Kuhn, Lehrbuch der Enzyme. Leipzig, 1927.

[123]) I. M. Kolthoff, Säure-, Basen-Indicatoren, S. 247, Berlin, 1932.

[124]) J. Tillmans, P. Hirsch, Algemeines über Proteine. A. Bomer, A. Juckenack, J. Tillmans. Handbuch der Lebensmittelchemie Bd. I. Berlin 1933.

[125]) G. G. de Bord, J. Agric. Res., **31**, 155, 1925.
cit. n. J. Grossfeld, Handbuch der Eierkunde, Berlin, 1938.

[126]) J. R. Katz, Onderzoekingen naar het oudbakken worden van brood, I, 30, 1917.

[127]) R. O. Neumann, Die Volksernährung, I, Das Brot, S. 57. Berlin, 1922.

[128]) C. F. van Oyen, Salmonella-infectie in eendeneieren. Tijdschrift v. Diergeneesk. **67**, 280, 1940.

175.

STELLINGEN.

I.

De afwijzing van het principe der specifieke verzadiging wordt door UHLENHUTH en WEIDANZ onvoldoende gemotiveerd (KOLLE, WASSERMANN: III, 1, p. 371).

II.

Onze kennis omtrent „lange melk" is onvoldoende om op de boerderij, waar dit melkgebrek voorkomt, maatregelen aan te geven, welke leiden tot een opheffing op korten termijn van dit gebrek.

III.

Toevoeging van groenvoeder aan de rantsoenen van varkens is noodzakelijk in verband met de vitamine-C verzorging van het lichaam.

IV.

De mogelijkheid, dat de streptococcenmastitis een secundaire infectie aansluitend aan een virusinfectie is, eventueel ontstaat als gevolg van een symbiose tusschen een virus en streptococcen, mag bij het onderzoek naar de wijze, waarop deze mastitis bij het rund tot stand komt, niet verwaarloosd worden.

V.

Een aparte afdeeling op veemarkten, waar uitsluitend tbc-vrij vee wordt toegelaten, zal voor de bestrijding der tuberculose onder het consumptiemelkvee van groote beteekenis zijn.

VI.

De castratie van den hond als huisdier kan niet worden aanbevolen; die van den kat als huisdier daarentegen wel. Dit geldt voor mannelijke zoowel als voor vrouwelijke dieren.

VII.

Het verschijnsel, dat bij het rund rechtszijdige endocarditis vaker voorkomt dan linkszijdige, kan niet verklaard worden door aan te nemen, dat een deel van deze endocarditiden langs embolischen weg ontstaat.

198