



Het kapselantigeen van *Bacterium pneumoniae*, typen A en C (Frankland en Friedländer)

<https://hdl.handle.net/1874/363140>

52.920.1929.1940

HET KAPSELANTIGEEEN VAN
BACTERIUM PNEUMONIAE

TYPEN A EN C (Frankland en Friedländer).

W. J. ALSCHE

ht

HET KAPSELANTIGEEN VAN
BACTERIUM PNEUMONIAE

Diss. Utrecht 1943

HET KAPSELANTIGEEN VAN BACTERIUM PNEUMONIAE

TYPEN A EN C (Frankland en Friedländer)

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN
DE RIJSUNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GE-
ZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS L. VAN
VUUREN, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT
DER LETTEREN EN WIJSBEGEERTE, VOLGENS
BESLUIT VAN DEN SENAAAT DER UNIVERSI-
TEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FA-
CULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE TE
VERDEDIGEN OP MAANDAG 26, JULI 1943, DES
NAMIDDAGS TE 3 UUR

DOOR

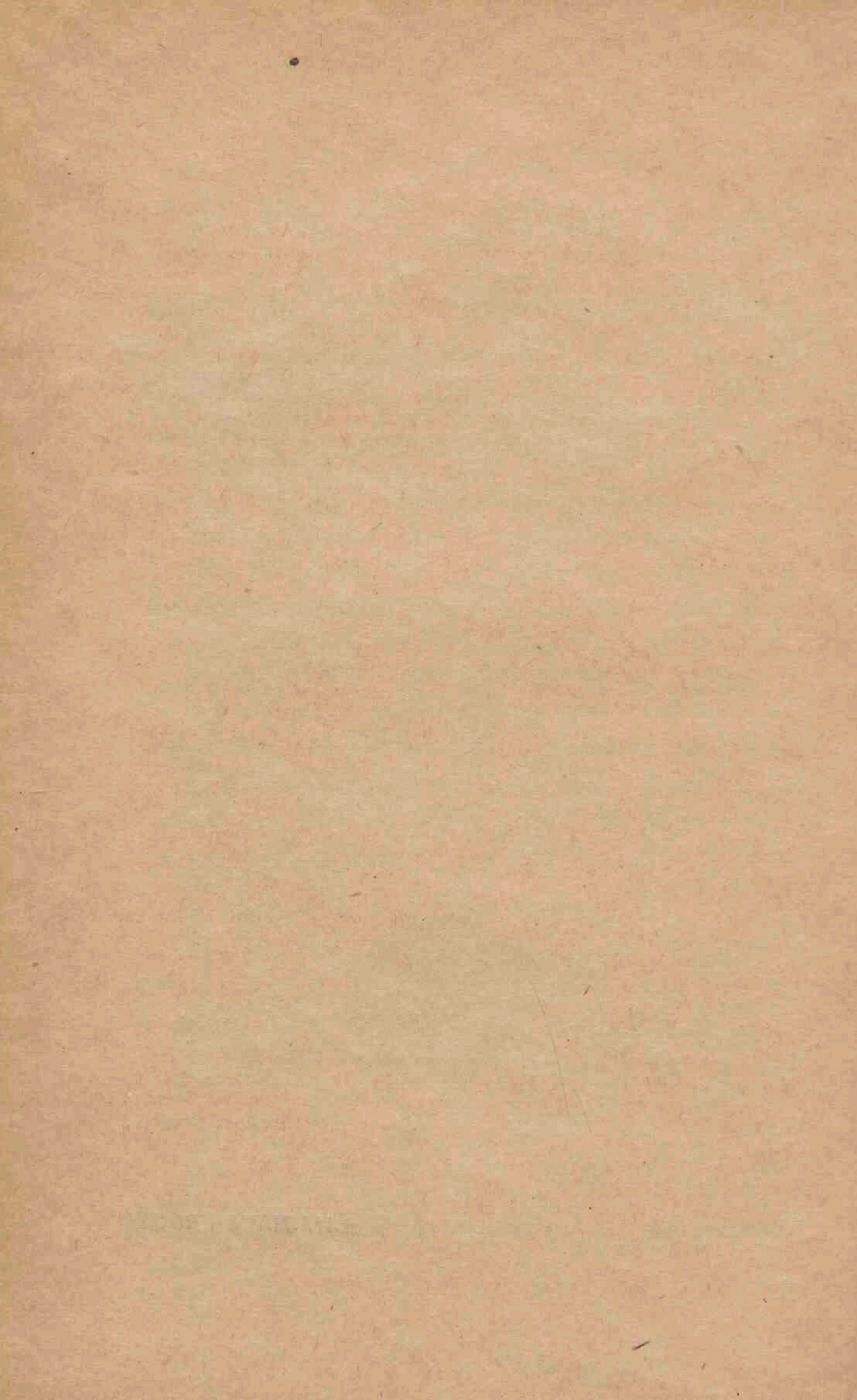
WILLEM JACOB ALSCHE

GEBOREN TE VELP (Gld.)

KEMINK EN ZOON N.V. — OVER DEN DOM — UTRECHT



AAN MIJN VROUW



Het verschijnen van dit proefschrift, biedt mij de gelegenheid een algemeen woord van dank te richten tot U, Hooggeleerden, Oud-Hooggeleerden en Docenten in de Faculteit der Wis- en Natuurkunde van de Utrechtsche Universiteit, die tot mijn wetenschappelijke vorming hebt bijgedragen.

In het bijzonder ben ik echter U, Hooggeleerde de Graff, Hooggeachte Promotor, wel zeer erkentelijk voor Uw leiding bij het thans beëindigde onderzoek en voor de zelfstandigheid, welke Gij mij hebt gelaten. Ik betreur het slechts dat, vooral den laatsten tijd, de omstandigheden een nauwer contact tusschen U en mij niet hebben toegestaan. Aan de jaren, welke ik in Uw laboratorium-gemeenschap ben opgenomen geweest, zal ik steeds met de aangenaamste herinneringen terugdenken. Dat ik nog een korten tijd Uw assistent heb mogen zijn, stel ik op hoogen prijs.

Hooggeleerde Julius, U ben ik buitengewonen dank verschuldigd voor de zorg, welke U aan mijn proefschrift besteedde, toen ik door omstandigheden een beroep op Uw hulp moest doen. Aan den korten tijd van hechte samenwerking zullen voor mij de aangenaamste herinneringen verbonden blijven, terwijl tevens Uw hulpvaardigheid, mij verleend bij het afsluiten der immuniteits-proeven, op hoogen prijs wordt gesteld.

Tegenover U, Hooggeleerde Kruyt, gevoel ik mij zeer verplicht voor Uw toestemming, om eenige van mijn werkzaamheden op Uw laboratorium te mogen verrichten. Het heeft mij verheugd dat ik mede hierdoor de gelegenheid kreeg het contact met U te hernieuwen.

Hooggeleerde Kögl, tot U gaat in niet mindere mate mijn dank uit voor de groote belangstelling, welke Gij bij mij voor de biochemie hebt opgewekt.

Hooggeleerde Reid, Uw raadgevingen op analytisch gebied zijn voor mij van groote waarde geweest.

Hooggeleerde Snijders, voor Uw belangstelling in mijn werk en Uw toezendingen van antisera en stammen, ben ik U bijzonder erkentelijk.

Zeergeleerde Timmermans, U zeg ik hartelijk dank voor Uw bereidwilligheid, om mij in de gelegenheid te stellen eenige proefnemingen in Uw laboratorium te verrichten, terwijl ik de hulp, die ik daarbij ondervonden heb van U, zeergeleerde Vink, op hoogen prijs stel.

U, Zeergeleerde Schlemper ben ik zeer erkentelijk voor de interesse, welke U bij mij gewekt hebt voor de bacteriologie, voor Uw praktische raadgevingen en den prettigen omgang.

Waarde Kelder, mede door Uw groote vaardigheid en behulpzaamheid ben ik in staat geweest de dierproeven te verrichten. Hiervoor dank ik U in het bijzonder, terwijl ik verder mijn erkentelijkheid uitspreek jegens allen, die mij bij het beëindigen van dit proefschrift op het *Pharmaceutisch Laboratorium* behulpzaam waren, en jegens hen, die mij bij de bewerking ervan met hun raad en hulp tot groote steun zijn geweest.

Tenslotte zal ik hen, die het mij mogelijk hebben gemaakt mijn academische opleiding aan te vangen en te volbrengen, daarvoor steeds dankbaar blijven.

I N H O U D.

	blz.
ALGEMEENE INLEIDING	1
THEORETISCH OVERZICHT	
1. Inleiding	3
2. Polysacchariden als dragers van de specificiteit	4
A. De specificiteit der polysacchariden uit pneumobacteriën	5
B. De specificiteit der polysacchariden uit pneumococcen	7
C. De specificiteit der polysacchariden uit streptococcen	11
D. De specificiteit der polysacchariden uit de bloedgroepen	11
E. Beschouwingen over de specifieke werking van polysacchariden	12
3. Lipoid-polysacchariden als dragers van de specificiteit	
A. De specificiteit der lipoid-polysacchariden uit pneumobacteriën	15
B. De specificiteit der lipoid-polysacchariden uit enkele andere bacteriën	17
C. Beschouwingen over de specifieke werking van lipoid-polysacchariden	18
4. Algemeene gegevens over de chemische samenstelling van het kapselantigeen	
A. Overzicht der isolatie-methoden van specifieke stoffen	18
B. Gegevens over de chemische samenstelling der polysacchariden van <i>B. pneumoniae</i>	21
HET PROBLEEM	26
PRACTISCH GEDEELTE HOOFDSTUK I	
1. Isolatie van het lipoid-polysaccharide uit het A-type	27
A. De gebruikte stam	27
B. De gebruikte voedingsbodem	29

C. De isolatie-methode	30
D. De onteiwitting	32
E. De droogmethode	33
F. De bereiding van het vrije L.-P.-zuur	34
2. Elementaire micro-stikstof- en micro-phosphor- bepalingen	35
De micro-stikstof- en micro-phosphor-bepalingen der L.-P.	40
3. Isolatie der polysacchariden en lipoiden	
A. De scheiding van het L.-P. in lipoid en polysac- charide	40
B. De bereiding der vrije polysaccharide-zuren	42
C. Micro-stikstof- en micro-phosphor-bepalingen der lipoid- en polysaccharide-complexen	43
D. Conclusies uit de P- en N-bepalingen	44
4. Eigenschappen van het lipoid-complex uit het L.-P.	45
5. Eigenschappen van het polysaccharide-complex uit het L.-P.	49

PRACTISCH GEDEELTE HOOFDSTUK II

Bereiding van de specifieke stof uit <i>B. pneumoniae</i> type C	60
A. De gebruikte stam	60
B. De gebruikte voedingsbodem	60
C. De opwerkings-methode	61
D. De verhooging van de pathogeniteit	62
E. De scheiding van het L.-P. in lipoid en polysac- charide	62

IMMUNITEITS-PROEVEN

Inleiding	64
1. Proeven „in Vitro”	
A. De antigeniteits-proeven over het L.-P. en P.	66
B. De specificiteits-proeven met het anti-polysac- charide-A-serum	69
2. Bereiding van anti-A-serum bij konijnen	73
A. De bepaling van de precipitatie-titer	75
B. De absorptie-proeven	76

3. Proeven „in Vivo”	
A. De toxiciteit van het P., L.-P. en L.-P.-E.	77
B. De actieve immunisatie door het L.-P. en P.	78
SLOTBESCHOUWINGEN	82
SAMENVATTING	88
RÉSUMÉ	89
ZUSAMMENFASSUNG	90
SUMMARY	91
LITERATUUR	92
LIJST VAN AFKORTINGEN	95

ALGEMEENE INLEIDING.

Het *Bacterium pneumoniae* behoort tot de *Klebsiellae* of kapselbacteriën, een onderfamilie van de *Bacteriaceae*. Daar kapsels ook door veel andere, niet tot deze groep behorende bacteriën gevormd worden, noemt men de kapselbacteriën ook wel de *Friedländer-bacteriën*, naar haar ontdekker.

Men kan de kapselbacteriën aan de hand van de ziekteprocessen, waarbij ze gevonden worden, verdeelen in *Klebsiellae pneumoniae*, *Klebsiellae rhinoscleromatis* en *Klebsiellae ozaenae*.

Julianelle (1926,1) verdeelt, op grond van de serologische eigenschappen, de *Klebsiellae pneumoniae* in de typen A, B en C, terwijl de *Graaff* (1936) naar aanleiding van de biochemische eigenschappen hen verdeelt in de typen *Frankland*, *lactis aërogenes* en *Friedländer*. *Wielenga* (1937) kon aantoonen, dat alle stammen van het type A tot het *Frankland*-type behooren, terwijl de typen B en C overeenkomen met respectievelijk het *aërogenes*- en *Friedländer*-type.

Om door serologische reacties een onderscheid te kunnen maken tusschen soorten of typen zijn immuniteitsproeven genomen. Sera van dieren, die met *pneumoniae*-stammen geïmmuniseerd zijn, werken tevens beschuttend tegen infecties van *rhinosclerom*- en *ozaena*-bacteriën, voor zoover ze althans in type overeenstemmen.

Volgens *Kolle* en *Hetsch* (1938) is het *Bacterium pneumoniae* een verwekker van *lobaire* en vooral van *lobulaire* pneumonie; hij verwekt meestal zeer ernstige ziekteverschijnselen, die onder omstandigheden ook epidemisch kunnen optreden. Bij ernstige infecties komen de kapselbacteriën in het bloed voor en geven dan aanleiding tot *septichaemie*. Ook zijn ze soms de oorzaak van een *otitis media*, die dan door een zeer slijmerige, bacterierijke secretie gekarakteriseerd wordt, meestal chronisch verloopt en door *meningitis* gecompliceerd kan worden.

Bij dieren spelen de spontane infecties een ondergeschikte rol. In enkele gevallen wordt de bacterie als verwekker van

mastitis bij koeien en van metritis bij paarden beschouwd. Ook bij marmotten en ratten komen van nature infecties voor.

Voor de dierproeven is de witte muis het meest geschikt, daarna de cavia, terwijl konijnen door inspuiting met veel stammen wèl ziek, maar niet gedood worden.

THEORETISCH OVERZICHT.

1. INLEIDING.

Wanneer een stof, tengevolge van het parenteraal toedienen, in het serum van een proefdier antistoffen opwekt, die specifiek met de toegediende stof reageeren, noemen wij deze stof een *volwaardig antigeen*.

Volwaardige antigenen zijn in het algemeen ingewikkeld gebouwde lichamen, waarvan de belangrijkste component het eiwit is. Landsteiner (1936) wijst er op, dat een bacterie nimmer een eenheid in antigene samenstelling is, doch dat wij ons een bacterie als een complex van antigenen moeten voorstellen. Met deze gedachte voor oogen wordt de bekende verzadigingsproef der groeps-agglutinatie van Castellani begrijpelijk. Deze proef is dan niet meer in strijd met de specificiteit, maar is juist een bevestiging ervoor hoe uiterst specifiek de antilichamen zijn.

Behalve volwaardige antigenen kennen wij onderdeelen van antigenen, die met het antilichaam specifiek serologisch reageeren, doch die zelf het vermogen missen om antilichamen bij een proefdier op te wekken. Tot deze stoffen, *haptenen* geheeten, behooren o.a. polysacchariden en lipoiden.

Wanneer een hapteen inderdaad alléén wordt ingespoten, dus in zoo zuiver mogelijken toestand, dan heeft geen vorming van een antilichaam plaats. *Wanneer men echter het hapteen met een eiwit mengt, kan men het aanvullen tot een compleet antigeen*. Gemengd met b.v. varkensserum en ingespoten bij een proefdier worden er antistoffen gevormd tegen elk der onderdeelen van het samengestelde antigeen. Zóó kan dus een hapteen aangevuld worden tot een volwaardig antigeen, en is een antilichaam tegen een hapteen in handen te krijgen, ondanks het feit, dat deze stoffen op zich zelf het vermogen missen om antilichamen op te wekken (het antiserum reageert dus op het eiwit en op het hapteen).

Ook onder andere omstandigheden is het mogelijk, dat antistof-vorming door een hapteen optreedt. Het gelukte Z o z a y a

(1932) soms *antistof-vorming* op te wekken door polysacchariden te absorbeeren aan kool, collodium, aluminiumhydroxyde of caseïne. Een der factoren voor antigene werking is blijkbaar, dat de stof, in colloïdaal-dispersen toestand, deeltjes moet bezitten boven een bepaalde afmeting.

Vanuit immunologisch standpunt bezien kunnen wij ons nu een bacterie voorstellen als een complex van antigenen, terwijl sommige antigenen weer samengesteld zijn uit een complex van haptenen.

Door een *kunstmatige* koppeling van een haptene aan een eiwit is het Landsteiner gelukt volwaardige antigenen te bereiden. Hiertoe gaat hij o.a. uit van suikers, die aan para-nitrobenzylbromide gekoppeld worden onder HBr afsplitsing; reductie en diazoteering geeft daarna de suikerdiazoniumverbinding, welke kan reageeren met globuline, zoodat een kunstmatig saccharide-azo-proteïde wordt verkregen. *Door invoering van substituenten in de suiker-diazoniumverbinding blijkt, dat deze de serologische specificiteit van het antigeen kunnen bepalen.*

2. POLYSACCHARIDEN ALS DRAGERS VAN DE SPECIFICITEIT.

Een groot aantal kapselvormende bacteriën produceert slijmstoffen, welke een polysaccharide-structuur bezitten. Deze slijmstoffen zijn aanwezig in de kapsels en komen in de media terecht door het oplossen dezer kapselstoffen.

Het was reeds lang bekend, dat bacterievrije filtraten van sommige bacteriën een specifieke precipitatie geven met een immuun-serum, dus met een tegen de stam gericht serum. Dit werd uitsluitend geweten aan door autolyse vrijgekomen eiwitstoffen.

Uit een onderzoek van Dochez en Avery (1917) over pneumococcon-filtraten kwam echter vast te staan, dat lang voordat de eerste autolyse-verschijnselen optraden, een polysaccharide in het bacteriefiltraat aanwezig was, dat volgens Heidelberg en Avery (1923) tot een zéér hooge verdunning met immuunserum specifiek precipiteerde.

Deze serologisch specifieke polysacchariden zijn gecompliceerder van bouw dan die, welke men uit vroegere onderzoe-

kingen had leeren kennen. Behalve hexosen en pentosen worden aldobionzuren gevonden, benevens geamineerde of geacetyeerde suikers, en soms inosiet.

Naarmate bekend geworden was welke rol de polysacchariden bij de type-indeeling van sommige bacteriën speelden, hebben Goebel, Avery en Babers (1934) ook disacchariden volgens de methode van Landsteiner aan proteïden gekoppeld. Hierbij bleek o.a. dat de plaats van de *zuurstofbrug* in disacchariden van invloed is op de *specificiteit*. Nog later, toen de specificiteit aan de uronzuur-fractie van het polysaccharide-complex geweten werd, koppelden Goebel en Hotchkiss (1937) de uronzuren, en Goebel (1938, 1939) de aldobionzuren aan proteïden volgens de methode van Landsteiner, om hiermee immuniteitsproeven te nemen.

Met de beoordeeling van de hierna volgende gegevens uit de literatuur over de bijzondere specificiteit der polysacchariden zullen wij zeer voorzichtig moeten zijn. Wij zullen veel tegenstrijdigheden tegenkomen, die — althans gedeeltelijk — verklaard kunnen worden uit het verschil in de methoden voor de isoleering der polysacchariden uit de volwaardige antigeen-complexen.

Om voor de immuniteitsproeven een hoogmoleculair antigeen te ontleden zouden wij namelijk een volledige scheiding tusschen zijn componenten te weeg moeten brengen en het eveneens hoogmoleculaire polysaccharide, zonder ontleding, en in zijn geheel moeten afsplitsen. Daar echter verhitting, alkaliën en zuren alle ontleding veroorzaken, kunnen wij slechts trachten dit ideaal zoo goed mogelijk te benaderen. Walker (1940) zag dit zeer goed in en maakte daarom gebruik van ureum om de eiwitten te denatureeren; ten gevolge hiervan waren de polysacchariden, die hij afsplitste echter niet geheel eiwitvrij.

Naast deze bezwaren zullen wij ook steeds tegenstrijdigheden tegenkomen die voortvloeien uit het feit, dat er onderzoekingen zijn die vóór, en andere die tegen de specificiteit der polysacchariden pleiten.

A. De specificiteit der polysacchariden uit pneumobacteriën.

Bij de pneumobacteriën wordt de specificiteit van het type

door het polysaccharide uit het kapsel bepaald. De drie typen A, B en C verschillen door de vorming van drie geheel verschillende polysacchariden, waarvan de samenstelling en de eigenschappen het eerst bestudeerd zijn door de Amerikanen van het Rockefeller-instituut.

Goebel (1927) isoleerde deze drie polysacchariden, die alle stikstof-vrije koolhydraten zijn en volgens Goebel en Avery (1927) uronzuren bevatten, terwijl ze tot verdunningen van 1 : 2.000.000 een specifieke precipitatiereactie geven met het homologe antiserum. De chemische samenstelling van het aldobionzuur van het specifieke polysaccharide uit het Frankland-type lijkt op dat uit het polysaccharide van het pneumococcentype III. De serologische resultaten geven echter te zien dat het G₃-P. der pneumococcen géén precipitatie met het antiserum van het Franklandtype geeft, en omgekeerd het Frankland-polysaccharide niet reageert op het anti-pneumococcen III-serum. Ter verklaring van de chemische en serologische tegenstrijdigheid neemt men aan, dat in deze twee polysacchariden de binding van glucose aan de aldehyd-groep van het uronzuur aan verschillende C-atomen zit.

De contrôle-reacties van Heidelberger, Goebel en Avery (1925) op het polysaccharide uit het pneumococcentype II (G₂ geheeten) en op dat van het pneumoniae-B-type, deden onverwachts een zekere verwantschap zien. Anti-B-serum precipiteerde even goed met het polysaccharide uit een pneumoniae-B-type, als met het G₂-P. Na uitprecipiteeren van het eerste polysaccharide waren er géén precipitinen meer voor eenig ander polysaccharide overgebleven. Na voorbehandeling met het G₂-P., waren er echter nog wèl precipitinen over voor het polysaccharide uit het pneumoniae-B-type. Dit doet dus veronderstellen, dat het anti-B-serum óf twee antilichamen bezit, óf een met dubbele affiniteit, waarvan één verzadigd kan worden door het G₂-P. uit een pneumococcen-type II-stam.

Behalve, dat het konijnen-immuunserum van het pneumoniae-B-type het pneumococcentype II agglutineert en het kapsel-antigeen ervan precipiteert, beschermt het ook muizen tegen deze pneumococcus. Eveneens is gebleken, dat het konijnen-anti-pneumococcen II-serum de pneumoniae-B-bacteriën agglutineert, het polysaccharide hiervan precipiteert en muizen be-

schermt tegen pneumoniae-B-bacteriën. Volgens Reeson en Goebel (1940) zou paarden-immuunserum van het pneumococcon-type II deze eigenschappen niet bezitten.

Uit de onderzoeken van Goslings en Snijders (1936) bleek, dat van immunologisch standpunt gezien, alle rhinosclerom-stammen tot het pneumoniae-C-type behoorden. Dit is dus een zeer homogene groep van bacteriën. De ozaenae-stammen behoren tot verschillende typen en wel hoofdzakelijk tot het D- en E-type, terwijl door Wielenga (1937) ook eenige stammen bij het C-type konden worden ingedeeld. Tot het pneumoniae-A-type behooren de meeste stammen die infecties bij den mensch veroorzaken; terwijl volgens Julianelle (1930) het grootste aantal stammen van dierlijken oorsprong bij het B-type moeten worden ingedeeld. Daarenboven zijn er nog heterogene stammen, d.w.z. stammen, die agglutineeren of precipiteeren met de anti-sera der drie typen; deze werden voor het eerst gevonden door Lévy-Bruhl en Courtois (1940).

B. *De specificiteit der polysacchariden uit pneumococcon.*

De eerste bekende onderzoeken van Heidelberger, Goebel en Avery (1925) over de pneumococcon-typen I tot IV gaven te zien, dat de respectievelijke polysacchariden G_1 tot G_4 zéér specifiek waren, en alléén met hun anti-sera precipiteerden tot een titer van ongeveer 1:5.000.000. Avery en Morgan (1925) vonden, dat deze stoffen niet het immunologisch karakter der proteïden bezaten; ze wekten geen antilichamen op en waren dus geen antigenen maar haptenen. Een kunstmatig proteïde, waarin het G_3 -P. als specifieke groep gebonden was, gaf na inspuiting bij een konijn een anti-pneumococcon III-serum, waarmee bij muizen passieve immuniteit kon worden verkregen.

Dank zij de publicaties van Zozaya en Clark (1933) over een pneumococcon I-extract, dat een zekere antigeniteit ten opzichte van den mensch zou bezitten, werd opnieuw een onderzoek ingesteld naar het G_1 -complex. Hierbij bleek uit de onderzoeken van Avery en Goebel (1933), dat het eerst geïsoleerde G_1 -complex tijdens de opwerking een verandering

had ondergaan. De acetylgroepen van dit polysaccharide waren n.l. afgesplitst, en alléén met ongeveer 6% azijnzuur in ester-vorm zou het polysaccharide van deze pneumococcus de fundamenteele immuniteitseigenschappen der proteïden bezitten.

De ontdekking, dat dit h a p t e e n plotseling een v o l w a a r d i g a n t i g e e n was geworden, was de aanleiding tot een nieuwe serie serologische proeven. Muizen, geïmmuniseerd met 0,75 γ van het G_1 -complex, konden een duizendvoudige, doodelijke dosis van een virulente pneumococcon-type I-stam doorstaan. Men concludeerde, dat het G_1 -complex alléén antigeen was indien het acetylgroepen droeg.

Hier is dus het eerste bekende voorbeeld van een molecuul, waarvan de antigene werking zou afhangen van een eenvoudige chemische eigenschap.

Deze immuniteit bij de muis kon echter slechts door zeer kleine dosis worden verwekt; bij grootere hoeveelheden had geen vorming van antilichaam plaats. E n d e r s e n C h a o - J e n - W u (1934) vonden, dat het G_1 -polysaccharide voor het konijn geen antigeen was, welke dosis ook gegeven werd. Wellicht vindt hier desacetylering in het lichaam plaats.

In tegenstelling met de algemeene opvatting, dat de acetyl-groepen van groot belang zijn bij de pneumococcon antigeniteit, wijzen de resultaten van F e l t o n e n P r e s c o t t (1939) juist op de onbelangrijkheid dezer groepen. Wèl doet loog ten allen tijde de antigeniteit verdwijnen, maar het verschil tusschen het acetyl-percentage van de geacetylerde preparaten die antigeen zijn, en van die welke niet antigeen zijn, is volgens W o n g e n K u r o t s c h k i n (1939) soms slechts 0,43%, hetgeen volgens deze schrijvers te weinig is om de antigeniteit te kunnen verklaren.

Kort geleden publiceerde F e l t o n (1940) een verslag, waaruit geconcludeerd mocht worden tot een immuniseerende werking van de G_1 - en G_2 -complexen der pneumococcon-typen I en II bij den mensch.

Vaccinatie met deze polysacchariden gaf bij 94,5% van de individuen aanleiding tot antistof-vorming in het bloed tegen het G_1 -polysaccharide en bij 98,9% tegen het G_2 -complex. Behalve dat 32% van de menschen van nature immuunstoffen

bezat, was de activiteit der sera, die na vaccinatie met de polysacchariden waren verkregen, zéér verschillend.

Zoowel het G₁- als het G₂-complex (eiwitvrij) zijn dus als volwaardige antigenen bij den mensch te beschouwen: er worden dus precipitinen door en tegen deze stoffen opgewekt!

In 1939 werd door Rachel Brown een uitgebreid onderzoek ingesteld naar de 32 verschillende pneumococcen-typen. Het bleek dat de 32 daaruit geïsoleerde polysacchariden ieder voor zich, een andere chemische samenstelling bezaten en dat ieder polysaccharide specifiek reageerde met het homologe antiserum.

Als theorie voor de infectie en voor het antilichaam bij de immuniteit treedt die van Petterson (1940) op de voorgrond. De virulente pneumococcen zouden twee verschillende stoffen produceeren. De eerste stof bezit een negatieve chemotaxis en stoot de leucocyten weg, de tweede (het polysaccharide) is anti-phagocytair en verzet zich dus tegen het opnemen der bacteriën door de witte bloedlichaampjes. De eerste stof heeft een gevarieerde werking op de soort van het dier: ze werkt op de leucocyten van het konijn, maar niet op die van de muis of cavia.

Men kan met deze twee stoffen afzonderlijk antilichamen bij het dier opwekken. Om een infectie bij de cavia en muis te verhinderen is het dus voldoende om antistoffen op te wekken tegen de verlamrende stof, dus tegen het polysaccharide, terwijl men bij het konijn antistoffen tegen beide moet opwekken.

Behalve de reeds eerder meegedeelde kruisingsreactie tusschen het G₂-P. der pneumococcen en een pneumoniae-B-serum, werden nog meer van zulke reacties bekend. Ivanovics (1940) vond, dat een anti-miltvuur immuunserum van het paard (niet van het konijn), niet alleen de kapselstof uit de anthrax-bacteriën precipiteert, maar ook die uit het pneumococcen-type XIV. Een anti-miltvuur-serum, dat vóórbehandeld is met het polysaccharide uit het pneumococcen XIV-type, behoudt zijn precipiteerende werking voor de kapselstof uit de anthrax-bacteriën.

Chemisch bestaan deze polysacchariden uit geacetyleerde glucosaminen en galactose; dit complex lijkt veel op dat uit de menselijke erythrocyten van groep A. De anti-miltvuursera

van paard of konijn reageeren niet met de stof uit de bloedgroep A, maar precipiteeren haar wèl na voorafgegane voorzichtige hydrolyse (zie ook blz. 12).

Serologische kruisingsreacties treden niet alleen op met polysacchariden van bacteriële oorsprong, maar ook met een polysaccharide, dat uit arabische gom verkregen wordt door gedeeltelijke hydrolyse in de koude. Evenals het G₃-P. der pneumococcen is deze stof uit arabische gom een hexose-uronzuur, gevormd uit glucuronzuur, maar waarvan de hexose van galactose in plaats van glucose is afgeleid. Deze onderzoekingen van Heidelberg en Kendall (1929) konden kort daarna door Heidelberg, Avery en Goebel (1929) bevestigd worden. Zij vonden n.l. een bevestiging voor de structurele analogie, doordat het polysaccharide uit de arabische gom een bijna specifieke precipitatie tot 10⁻⁶ gaf met anti-pneumococcen-serum II of III. Deze kruisingsreactie zou volgens Challinor, Haworth en Hirst (1931) te wijten zijn aan een gelijke aanhechting tusschen het glucuronzuur en de suiker, dus glucose of galactose.

Een vergelijking van deze resultaten met de ervaringen van Goebel en Avery, Goebel of Babers en Avery over de azo-proteïden, afkomstig van eenvoudige sacchariden, geeft ons geen voldoening. Zij vonden een diepgaand verschil, op serologisch gebied, tusschen de structuren van glucose- en galactose-azo-proteïden. Deze gesubstitueerde sacchariden bevatten echter géén uronzuren. Goebel en Goodner (1936) kregen met een azo-proteïde van glucuronzuur een bijna specifieke precipitatie met anti-pneumococcen-serum II of III tot 10⁻⁶.

Het is dus mogelijk dat glucuronzuur de voornaamste drager der pneumococcen-specificiteit is. In elk geval moeten wij opmerken, dat de immunologische activiteit van het samengestelde proteïde-glucuronzuur, bereid door Goebel en Goodner, niet samengaat met die van de pneumococcen II en III. Hoewel het in vitro reageert met de antilichamen der pneumococcen, is het azoproteïde zèlf niet in staat deze antilichamen bij konijnen of muizen op te wekken.

Om tot een voorkeur van het glucuronzuur in het pneumo-

coccon-antigeen te besluiten, zal eerst deze tegenstrijdigheid moeten worden opgehelderd.

C. *De specificiteit der polysacchariden uit streptococcon.*

Verschillende typen streptococcon, al of geen kapsel dragend, geven óók verschillende polysacchariden, die specifiek reageeren met hun antisera. Heidelberg en Kendall (1936) konden uit een haemolytische A-streptococcon een polysaccharide isoleeren dat phosphor bevatte en geen uronzuur. Een ander polysaccharide van de haemolytische A-groep bevatte geen phosphor, maar was opgebouwd uit een gelijk aantal moleculen glucuronzuur en acetylglucosamine. Ondanks deze samenstellingen was het eerste wèl en het tweede niet serologisch actief, noch als antigeen, noch als reagens op het anti-lichaam.

Kendall, Heidelberg en Dawson (1937) vonden nu een groote chemische verwantschap tusschen dit laatste polysaccharide en dat wat algemeen in het dierlijk lichaam voorkomt, b.v. een door Meyer en Palmer (1936) geïsoleerd polysaccharide uit de menschelijke navelstreng of een uit het oogvocht van den os. Dit zou een voorbeeld zijn van een polysaccharide, dat even goed gevormd wordt door het dierlijke organisme als door een bacterie. Derhalve zou de afwezigheid van serologische activiteit van dit polysaccharide uit de haemolytische A-streptococcon verklaard moeten worden, met het mogelijk bestaan van zeer verwante stoffen in het organisme der zoogdieren zelf.

D. *De specificiteit der polysacchariden uit de bloedgroepen.*

Om te verklaren, dat het serum van sommige normale individuen zich soms agglutineerend en zelfs lytisch ten opzichte van de erythrocyten van andere individuen van de zelfde soort gedraagt, neemt men reeds langen tijd aan, dat in de bloedlichaampjes twee bepaalde agglutinabele bestanddeelen (b.v. A en B), en in de sera twee corresponderende agglutininen (α en β) voorkomen. Men begrijpt, dat een agglutinabel bestanddeel en het corresponderende agglutinine, door weder-

zijdsche inwerking, niet kunnen coëxisteeën in het bloed van hetzelfde individu. De verschillende agglutinabele bestanddeelen worden teruggevonden in de urine van individuen, die tot de bijbehorende bloedgroep behooren.

Uitgaande van urine maakten Brahn en Schiff (1929) extracten, die in zeer sterke verdunning reageerden met het bijpassende serum. Zij bevatten een geamineerd polysaccharide, waarin zich volgens Freudenberg en Eichel (1934) de specifieke eigenschappen van de bloedgroep A bevonden. Bij hydrolyse kon galactose en acetylglucosamine, benevens een kleine hoeveelheid uronzuur geïdentificeerd worden. Evenals bij het polysaccharide van het pneumococcon-type I, verdwijnt de serologische activiteit onder invloed van alkali. De samenhang gaat echter nog verder: Witebsky, Neter en Sobotka (1935) vonden, dat het anti-bloedgroep-A-serum in vitro reageert met het G_{11} , dus met het geacetyleerde polysaccharide der pneumococcon van het type I. Freudenberg en Eichel (1935) hebben aangetoond dat het door alkali onwerkzaam gemaakte polysaccharide der bloedgroep A opnieuw geacetyleerd kan worden, en dan weer de volledige serologische activiteit bezit.

Een door Beeson en Goebel (1939) gevonden serologische kruisingsreactie tusschen de agglutinabele stof van de bloedgroep A en het polysaccharide van het pneumococcentype XIV bewijst, dat deze stoffen echter niet identiek zijn. Wel hebben Goebel, Beeson en Hoogland (1939) aangetoond, dat deze stoffen veel chemische overeenkomst bezitten en beide opgebouwd zijn uit acetylglucosaminen en galactose.

Finland en Curnen (1940) zeggen, dat de eigenschap van een groot aantal konijnen-sera, gericht tegen verschillende typen pneumococcon om de menselijke erythrocyten van de AB- en A-groepen te agglutineeren, een verklaring zou kunnen zijn voor de wel eens waargenomen haemoglobinurie en de doodelijke reacties na inspuitingen van deze sera.

E. Beschouwingen over de specifieke werking van polysacchariden.

De algemeene specifieke werking van polysacchariden zelf is

nog vol paradoxen, gezien de kruisingsreacties tusschen veel polysacchariden van hoog moleculair gewicht n.l. de extracten van pneumococcen, Friedländer-bacteriën of arabische gom. Hierbij sluit ook aan de door *Anally* en *Smedly-Maclean* (1937) opgemerkte kruisingsreactie tusschen een extract van biergist en dat van het pneumococceen type II.

Heidelberg, *Menzel* en *Kendall* (1936) merken op, dat de rol van de proteïden zeker niet veronachtzaamd mag worden indien men de eigenschappen der polysacchariden wil onderzoeken. Ze zijn daarvoor veel te actieve elementen in de specifieke bacterieverrijkselen.

Uit het feit, dat in den laatsten tijd sacchariden als normale bestanddeelen van een groot aantal proteïden voorkomen, concludeerde *Bierry* (1934), dat de specificiteit van deze antigenen zelfs in het algemeen door de saccharide-fractie in hun molecuul bepaald werd.

Landsteiner (1936) merkte echter op, dat deze theorie géén algemeene waarde kon hebben, daar in verschillende proteïde-antigenen geen sacchariden voorkomen. Een andere tegenwerping is, dat naburige polysacchariden, misschien zelfs identieke, fragmenten zijn geweest van zeer gedifferentieerde proteïden, uit immunologisch standpunt bezien.

Zoo werd door *Levene*, *Mori* en *Rothen* (1929) een glucosamine-dimannose verkregen uit het ovomucoïde, dat men volgens *Rimington* (1931) tevens vindt in de serum-proteïden van paard en koe. Daar deze stof zoo algemeen verspreid is kan men moeilijk inzien, dat ze een rol zou spelen in de specificiteit ten opzichte van de soort.

Neuberger en *Yuill* (1940) isoleerden een polysaccharide uit het ovomucoïde en een polysaccharide uit het ovalbumine. Het anti-ovalbumine-serum gaf met de volledige stof een precipitatie tot 1 : 100.000, terwijl het polysaccharide uit het ovalbumine slechts een zwakke reactie gaf tot 1 : 200. Op overeenkomstige wijze gaf het ovomucoïde met haar eigen serum een precipitatie tot 1 : 100.000, terwijl het polysaccharide uit het ovomucoïde zelfs geen reactie met dit serum gaf. Hieruit concludeeren deze schrijvers, dat de polysacchariden géén rol zouden spelen in de reacties der proteïden en niet de dragers van de specificiteit zouden zijn.

Aan den anderen kant vonden Sevag en Jeastone (1934), dat een polysaccharide-extract van het ovalbumine een anaphylactische choc bij een cavia veroorzaakte, die met het ovalbumine gesensibiliseerd was; er was echter geen precipitatie-reactie met het anti-ovalbumine-serum van een konijn. Bij groote dosis gaf dit polysaccharide een lichte anaphylactische sensibilisatie voor het eiwit, maar niet voor het polysaccharide zelf.

In ieder geval ziet men, dat er nog te veel onzekerheden bestaan om in het algemeen de rol der polysacchariden bij de specificiteit der proteïde-antigenen als vaststaand te beschouwen.

Naar aanleiding van de eerder beschreven onderzoeken over de polysaccharide-specificiteit der pneumococcen, pneumonïae-bacteriën en streptococcen kunnen wij echter wèl zeggen, dat het polysaccharide van deze bacteriën de specificiteit der proteïde antigenen wèl bepaalt. Hierbij sluiten ook aan de onderzoeken omtrent de polysacchariden der Salmonella-soorten door Morgan en Beckwith (1939), der V. cholera door Bruce-White (1940), der B. coli en Kl. rhinoscleromatis door Wong en Kurotchkin (1939) en die van veel andere bacteriën.

De grootste moeilijkheden bij de beoordeeling van de proeven en de argumenten aangaande de specificiteit der polysacchariden zijn o.i.:

1e. De isoleerings-methode van het polysaccharide en de zuivering.

2e. Het dier, waarop men de immuniteits-proeven doet.

3e. De wijze waarop deze proeven worden uitgevoerd.

Gezien deze drie moeilijkheden bij de onderzoeken der polysacchariden is het geen wonder, dat wij vaak paradoxen tegenkomen.

Ook de kruisingsreacties zullen zeker nog uitbreidingen en veranderingen moeten ondergaan. Dit beeld der co-precipitaties behoeft echter niet in strijd te zijn met de specificiteit der polysacchariden, maar kan daar zelfs een bewijs voor zijn.

Over het algemeen is tot nu toe wel komen vast te staan, dat de polysacchariden uit de eerder behandelde bacteriën specifiek

zijn en niet tot de antigenen, maar tot de haptenen moeten worden gerekend. Een uitzondering vormen het G₁- en G₂-P. der pneumococcen, die vooral bij den mensch als een volwaardig antigeen moeten worden beschouwd.

3. LIPOID-POLYSACCHARIDEN ALS DRAGERS VAN DE SPECIFICITEIT.

A. *De specificiteit der lipoïd-polysacchariden uit pneumobacteriën.*

Aan Bottema (1940) gelukte het om een lipoïd-polysaccharide uit een Kl. pneumoniae type C te isoleeren. Deze stof, verkregen volgens een iets gewijzigde methode van Heidelberger, was in staat om bij konijnen en caviae precipitinen op te wekken; zij is dus een *volwaardig antigeen*. Bij muizen die met het lipoïd-polysaccharide geïmmuniseerd waren kon echter geen bescherming tegen de virulente stam worden opgemerkt. Deze stof was wèl toxisch voor konijnen en muizen, maar niet voor caviae. Zoowel het lipoïd als het polysaccharide misten ieder voor zich deze eigenschap.

Door een absorptie-proef bleek, dat na voorbehandeling van een immuunserum met het lipoïd-polysaccharide er geen precipitinen meer voor het vrije polysaccharide over waren, terwijl omgekeerd, na voorbehandeling met het vrije polysaccharide, het serum nog tot 1:200.000 met het lipoïd-polysaccharide kon reageeren. Er volgt dus uit, dat lipoïd-polysaccharide en vrij polysaccharide in serologisch opzicht niet gelijkwaardig zijn.

Het lipoïd-polysaccharide van het C-type is specifiek en geeft evenals het vrije polysaccharide een specifieke precipitatie-reactie met immuunserum tot 1:2.000.000.

Interessante onderzoekingen werden door Lévy-Bruhl en Jeanne Courtois (1940) gedaan over een polyvalente stam der B. pneumoniae, een stam dus, waarvan het lipoïd-polysaccharide met de drie anti-sera A, B en C precipiteert. Daar de precipitatie-titer van het polyvalente lipoïd-polysaccharide met de drie anti-sera 1:1000 was, en de hoeveelheid neerslag bij de ringreactie gelijk was, concludeeren ze tot een werkelijke polyvalente precipitatiereactie. Een absorptieproef van het lipoïd-polysaccharide met de drie anti-sera na elkaar

geeft een gefractioneerde verzadiging der drie antigenen, welke aanwezig zijn in dit polyvalente lipoïd-polysaccharide complex. Ook in vivo geeft herhaalde inspuitingen van een konijn met dit complex een polyvalent serum, dat met de drie gefiltreerde kulturen van de typen A, B en C reageert. Er wordt dus een anti-lichaam ten opzichte van elk der drie antigenen opgewekt.

De Fransche onderzoekers vonden voor een lipoïd-polysaccharide van het A-type een specifieke precipitatiereactie met het anti-A-serum tot 1:10.000. Behalve deze type-specificiteit vonden zij ook een soort-specificiteit, indien de complement-bindingsreactie toegepast werd. Er trad n.l. een positieve reactie op van ieder der drie lipoïd-polysaccharide antigenen, niet alleen met het corresponderende serum, maar met alle drie de immuunsera A, B en C; echter niet met het normale serum. Daar proteïden in het lipoïd-polysaccharide complex uitgesloten waren, konden deze niet de oorzaak van het verschijnsel zijn. Bij de reactie van Bordet-Gengou was dus het lipoïd het eenige element met een polyvalente rol, dat in dit geval de soort-specificiteit zou kunnen bepalen.

Met tegenovergesteld resultaat had Julianelle (1926,2) onderzoekingen gedaan met kunstmatig kapselloos gemaakte stammen. Het bacteriële eiwit was in dat geval het soort-specifieke antigeen: ingespoten bij proefdieren wekte het antistoffen op tegen de bacteriën van het A-, B- en C-type. De soort-specificiteit van de pneumobacteriën moet men nu dus wijten aan een polyvalent *eiwit* of aan een polyvalent *lipoïd*. Daar het eiwit niet chemisch op lipoïden onderzocht werd en het lipoïd-polysaccharide wél eiwitvrij was, lijkt ons de opvatting der genoemde Fransche onderzoekers zeer goed mogelijk. Vóór deze gedachte pleit tevens de tegenwoordige zienswijze, dat in het algemeen bij de complement-bindingsreactie de lipoïden een voorname rol spelen.

Aan Wong (1938) gelukte het, om uit een *Klebsiella rhinoscleromatis* een specifieke stof te isoleeren welke antigeen is. Sera van met deze stof geïmuniseerde konijnen gaven echter geen precipitatie, doch wél een complement-bindingsreactie met de specifieke stof tot 1:50.000. Eveneens gelukte het hem uit een R-stam (dus een kapsellooze) van *Kl. rhinoscleromatis*

twee verschillende specifieke polysaccharide stoffen te isoleeren, welke beide de complement-bindingsreactie gaven, echter met een zeer verschillende titer.

Dit is opnieuw in tegenstelling met de opvattingen van Julianelle (1926,2) die blijkens een onderzoek over de Friedländer-bacteriën tot de conclusie kwam, dat in „Rough” stammen of kapsellooze stammen *geén* polysacchariden aanwezig waren en dat alleen het bacterie-eiwit de soort-antigeniteit zou bepalen.

Kurotchkin en Wong (1938) vonden behalve een positieve complement-bindingsreactie ook, dat het met een door zuurhydrolyse verkregen polysaccharide mogelijk was caviae te sensibiliseeren. Deze eigenschap, welke men algemeen *uitsluitend* aan proteïden toeschrijft, zou dus ook wel aan een polysaccharide toegekend kunnen worden. Hoewel hun preparaten eiwitvrij zijn, varieeren de N-percentages echter tusschen de 1,5 en 3,6%, zoodat wij genoodzaakt waren hun polysacchariden bij de lipoid-polysacchariden in te deelen.

B. *De specificiteit der lipoid-polysacchariden uit enkele andere bacteriën.*

Boivin en medewerkers (1933, 1934, 1937) waren in staat uit verschillende soorten Gram-negatieve bacteriën specifieke lipoid-polysacchariden te bereiden. Uit Salmonella-soorten isoleerden zij b.y. een L-P., dat bij konijnen actieve immunisatie verwekte en toxisch was voor een muis. In het serum van de geïmmuniseerde konijnen waren toen precipitinen en agglutininen aanwezig. Na afscheiding van het lipoid uit het complex vonden zij voor een geneutraliseerde, alkalische oplossing van dit lipoid nog een zeer groote toxiciteit bij een muis. Uit R-vormen konden zij lipoid-polysacchariden, noch polysacchariden bereiden, maar uit S-vormen naar believen het een of het andere.

Morgan en Beckwith (1939) bevestigden de antigeniteit van het lipoid-polysaccharide uit S-stammen van een aantal Salmonella-soorten. Zij trachtten door vergelijking van de agglutinatie- en precipitatie-reacties aan te toonen, dat deze lipoid-polysacchariden het eigenlijke specifieke antigeen zijn.

Ook uit *B. dysenteriae* Shiga kon door Morgan en Partridge (1939) volgens de methode van Boivin een lipoid-

polysaccharide worden geïsoleerd, dat antigeen was bij het konijn.

C. *Beschouwingen over de specifieke werking van lipoid-polysacchariden.*

Terwijl wij bij de vraag of polysacchariden een specifieke werking vertoonen, op zeer veel tegenstrijdigheden en onvolkomenheden stuiten, vinden wij bijna algemeen aangegeven, dat lipoid-polysacchariden specifieke, volwaardige antigenen zijn. Hoewel ook hierbij het dier waarop de immuniteitsproeven worden genomen van veel invloed is, kunnen wij toch vrij algemeen zeggen, dat er precipitinen en agglutininen worden opgewekt, terwijl soms ook immunisatie kan worden verkregen.

Volgens Hornus en Grabar (1940) komt het serologisch verschil tusschen L.-P. en P. preparaten tot uiting bij de bepaling van de hoeveelheid N in het precipitaat, dat door het L.-P. antigeen van *B. typhi* of door het corresponderende P. hapteen uit het immuunserum wordt neergeslagen. Hieruit blijkt, dat een groot gedeelte van het antilichaam niet door het hapteen geprecipiteerd wordt en er nog veel antilichaam over is voor het antigeen. *De zuur-hydrolyse van het lipoid-polysaccharide, waardoor het polysaccharide te verkrijgen is, leidt dus tot de vernietiging of verwijdering, onder vorming van onoplosbare producten, van een deel van dit complex.* Het blijkt ook, dat het polysaccharide, dat de zuur-hydrolyse het kortste ondergaan heeft, het meeste antilichaam precipiteert.

Deze verandering werd reeds veel eerder gevonden door Heidelbergger, Kendall en Scherp (1935), die de invloed van zuur op de viscositeit van polysaccharide-oplossingen opmerkten. Door een verkleining van het complex neemt de hoeveelheid antilichaam, welke door eenzelfde hoeveelheid polysaccharide neergeslagen wordt, af.

4. ALGEMEENE GEGEVENS OVER DE CHEMISCHE SAMENSTELLING VAN HET KAPSELANTIGEEN.

A. *Overzicht der isolatie-methoden van specifieke stoffen.*

De type-specifieke polysacchariden zijn op twee verschillende manieren te isoleren:

1. De eerste methode gaat uit van nog intacte bacteriën, waarin het grootste gedeelte van de koolhydraten aan eiwit gebonden voorkomt. Het is dan noodig om het koolhydraat van het proteïne los te maken en daarna dit eiwit te verwijderen, hetgeen men meestal langs chemische en physische weg tracht te bereiken.

Toenissen (1920) was de eerste, die gedroogde bacteriën aan een splitsing onderwierp, door deze bij 100° C met 15% KOH te behandelen. Tomczik (1927) maakte bij 100° C eveneens gebruik van KOH, Morgan (1936) hydrolyseerde met verdund azijnzuur bij 100° C. Wieghard en Julianelle (1935) splitsten in de koude met verdunde zuren, terwijl Goebel en Avery (1927) van trypsine gebruik maakten om het eiwit af te breken.

Het na splitsing vrij gekomen eiwit is meestal gemakkelijk te verwijderen, daar het vrijwel volledig kan worden geprecipiteerd, zonder dat de polysacchariden neerslaan. De laatste resten eiwit kunnen dan door gefractioneerde precipitatie met alcohol, aceton of neutrale zouten worden verwijderd.

Heidelberger, Kendall en Scherp (1936) verwijderden andere vreemde stoffen zooals phosphaten, door een behandeling met ijsazijn van een oplossing van het koolhydraat waaraan 20% natriumacetaat was toegevoegd. Glycogeen kon door inwerking van speeksel ontleed, of door een gefractioneerde precipitatie met koperacetaat verwijderd worden.

2. De tweede methode gaat uit van vloeibare cultures, waarin volgens Dochez en Avery (1917) de polysacchariden voor een groot gedeelte vrij voorkomen en hier moeten worden beschouwd als een stofwisselingsproduct van de levende cellen. *Hier zijn dus géén ingrijpende middelen noodig, om de specifieke stof in vrijen toestand te brengen.*

Als algemeene isolatie methoden zijn op het oogenblik het meeste in gebruik de methode van Boivin bij de Fransche onderzoekers en de methode van Heidelberger bij de Amerikanen, in welke laatste methode Bottema enkele verbeteringen heeft aangebracht.

Bij de methode van Boivin, voor het eerst gebruikt door Boivin en Mesrobeanu (1933) op enkele Salmonella-

soorten, worden de bacteriën op vaste voedingsbodem met toevoeging van glucose gekweekt, en na 24 uur broeden met een physiologische zoutoplossing afgeslibt. Door een snelle centrifuge (6000 toeren) worden de bacteriën neergeslagen, en in gedestilleerd water gesuspendeerd, waaraan vervolgens een gelijk volume $\frac{1}{2}$ n trichloorazijnzuur wordt toegevoegd, om na twee uur weer afgecentrifugeerd te worden. De trichloorazijnzuur oplossing geeft, na dialyse tegen een groot volume water, een practisch neutrale emulsie van het antigeen complex, welke ongekleurd en opalescent is.

De methode van Heidelberger, die ook wij voor ons onderzoek hebben gebruikt, is voor het eerst toegepast door Heidelberg, Kendall en Scherp (1936) voor de isolatie van de pneumococcon-polysacchariden. Deze methode kost véél meer tijd dan die van Boivin, maar bezit het voordeel, dat een azijnzuur-natriumacetaatbuffer gebruikt wordt voor het oplossen van het polysaccharide, zoodat de kans op ontleding veel geringer is. Hierbij wordt een glucose-bouillon cultuur van drie dagen, na behandeling met 1% phenol, in vacuo bij 35° C tot 1/10 van het oorspronkelijke volume ingedampt. Het polysaccharide kan, na precipitatie door alcohol en een nacht staan, afgecentrifugeerd worden. Er ontstaan dan drie lagen: de bovenste laag of de alcoholische oplossing bevat geen specifieke stof meer, terwijl de onderste laag waarin nog wél specifieke stof is tevens veel verontreinigingen bevat. *Alléén* de middelste laag, die zeer visceus en serologisch sterk actief is, wordt verder verwerkt. Na suspendeeren in een zure acetaat-buffer ($p_H = 5$) kan men het onoplosbare deel door af te centrifugeeren verwijderen en het polysaccharide opnieuw door alcohol uit de oplossing neerslaan. De laatste eiwitresten kunnen verwijderd worden door de methode van Sevag (1934) toe te passen. Hiertoe schudt men de oplossing met 1/5 volume chloroform en 1/25 volume butylalkohol. Na centrifugeeren bevindt zich een groot gedeelte van het eiwit in de halfvaste emulsie tusschen de chloroformlaag en de waterige oplossing. Een opnieuw toepassen van de Sevag-methode op de polysaccharide-oplossingen geeft na eenige malen een eiwitvrije specifieke stof. Ook uit de emulsielaag kan nog zuiver polysaccharide gewonnen worden, door met water uit te wasschen en op dezelfde manier te zui-

veren. Fosphaat kan worden verwijderd door een precipitatie met ijsazijn uit een 20 % natriumacetaatoplossing. Hoewel de preparaten, die Heidelberg en medewerkers nu verkrijgen, minder zuiver zijn dan vroeger, gezien de N-percentages, geniet deze methode o.i. boven die van Boivin de voorkeur, omdat géén sterke zuren gebruikt worden.

Door Bottema (1940) zijn voor de bereiding van de specifieke stof uit *B. pneumoniae* type C de volgende verbeteringen aangebracht: De glucose-bouillon kan vervangen worden door een veel goedkoopere voedingsbodem, samengesteld uit 0,5% d-glutaminezuur, 0,5% ammoniumlactaat en 0,5% sec. kaliumphosphaat. De broedtijd kan verlengd worden tot 10 dagen bij 37° C en nog eenige weken bij kamertemperatuur, waardoor de opbrengst aan specifieke stof belangrijk verhoogd wordt. De daarna met 0,5% phenol gedooide bacteriën dampst hij in tot 1/10 van het oorspronkelijke volume, waarna de p_H met ijsazijn op 4 gebracht wordt. Als acetaatbuffer dient een 5% natriumacetaatoplossing, die met azijnzuur op $p_H = 4$ gebracht kan worden. Verder maakt Bottema *niet* gebruik van ijsazijn ter verwijdering van de laatste resten eiwit en het phosphorzuur, zoodat hij als specifieke stof in eerste instantie een lipoid-polysaccharide verkrijgt, in plaats van een polysaccharide zooals Heidelberg en medewerkers.

B. Gegevens over de chemische samenstelling der polysacchariden van *B. pneumoniae*, typen A, B en C.

Type A.

Goebel en Avery (1927) onderzochten de specifieke stof van het A-type. Het is een amorph polysaccharide met zure eigenschappen en zonder Fehling-reductie. De jodiumreactie is negatief en het wordt volledig geprecipiteerd door neutraal- en basisch loodacetaat. Na hydrolyse is het reduceerend vermogen 65% (t.o.v. glucose). Volgens Heidelberg en Goebel (1927) lijkt deze specifieke stof chemisch op de polysaccharide-fractie van het pneumococcon-type III met een eveneens linksche draaiing (-33°) en een even laag zuur-aequivalent (340). Bovendien levert de hydrolyse chemisch-analoge stoffen op.

Bij verzeeping van de specifieke stof van het A-type met 1n H_2SO_4 gedurende 5 uur, gaf 34 g polysaccharide: 13 g aldobionzure-calcium en 19 g suikers. Deze 13 g aldobionzure-calcium leverde na zuivering nog slechts 9,2 g droge stof. Daarnaast ontstond bij de zuivering een olieachtige laag, welke door de onderzoekers niet verder geanalyseerd werd. Uit de verhouding der zuivere stoffen concludeeren zij tot de verhouding 1/3 aldobionzuurfractie op 2/3 suikerfractie.

De aldobionzuurfractie vrijgemaakt gaf een $[\alpha]_D$ van -54° , een zuuraequivalent van 354 en een reduceerend vermogen van 50% te zien. Zij concludeerden hieruit, dat deze fractie was opgebouwd uit 2 suikers: een hexose en een hexuronzuur, waarin één carbonyl- en één aldehydgroep vrij aanwezig zijn. De hexose werd geïdentificeerd als *glucose*, het hexuronzuur als *glucuronzuur*. Oxydatie van het aldobionzuur gaf saccharobionzuur, dat als calciumzout geïsoleerd werd.

Het aldobionzuur is dus opgebouwd als een glucoside van glucuronzuur en glucose. De plaats van de brug (aan C6 of aan een ander koolstofatoom) is nog onbekend.

De suikerfractie was optisch inactief en had een reduceerend vermogen van 75% t.o.v. glucose. De Molish-reactie was zwak en de orcinolproef op pentosen was negatief. Eén gram van de suikerfractie werd na behandeling met phenylhydrazine geïdentificeerd als glucosazon, met een opbrengst van 25%, terwijl oxydatie met salpeterzuur het suikerzure kaliumzout van glucose gaf. Uit 10 gram werd de glucose verwijderd door fermentatie met gist; de gist-dextrinen werden daarna neergeslagen met loodacetaat, en door de oplossing vervolgens met basisch loodacetaat te behandelen, kon het loodzout van een suikerzuur verkregen worden. De opbrengst was 3,5 g aan organisch zuur, het reduceerend vermogen 40% en de $[\alpha]_D = -58,8^\circ$. Uit de $[\alpha]_D$ zou men verwachten, dat dit zuur identiek met het eerder gevonden aldobionzuur zou zijn; hier is de naphtoresorcinoltest echter negatief. Door een aparte proef met gist op de suikerfractie te doen, kon worden uitgemaakt, dat de helft van de totale suikers weggefermenteerd kon worden.

Samenvattend werden er door hydrolyse 3 suikers verkregen: 1° een aldobionzuur (glucuronzuur-glucose); 2° glucose; 3° een ander disaccharide-zuur als lacton voorkomend, in de

verhouding 1 : 1 : 1. Het complex zou dan volgens deze onderzoekers opgebouwd zijn uit twee mol aldobionzuur (waarvan één in lactonvorm) en één mol glucose. Het $(C_{30}H_{44}O_{26})_x$ -complex zou een zuuraequivalent moeten hebben van 410, een C-percentage van 43,9 en een H-percentage van 5,4; hetgeen veel op de door hen gevonden waarden lijkt.

Onze bezwaren, naar aanleiding waarvan wij een aanvullend chemisch onderzoek noodzakelijk achten, waren de volgende:

1. Bij de zuivering van het aldobionzure-calcium is 4 gram verloren gegaan of 30%; dit was een olieachtige laag, die niet verder onderzocht werd. Het zal ook beter zijn om de bariumzouten van de aldobionzuren te maken, daar anders de zouten niet vrij van sulfaat zijn en de kristallisatie bemoeilijkt kan worden (zie *Bottema* 1940 p. 43).
2. Hoewel de suikerfractie voor 50% zou bestaan uit glucose met een draaiing van $-52,3^\circ$ en voor de andere helft uit een suikerzuur met een draaiing van $-58,8^\circ$, was de totale suikerfractie toch inactief.
3. Naast glucose in de suikerfractie is het voorkomen van andere suikers niet onmogelijk, gezien de geringe opbrengst aan glucosazon.
4. Het niet fermenteerbare deel van de suikerfractie werd onvoldoende onderzocht om hun zoo vergaande conclusies te rechtvaardigen.
5. De conclusies omtrent het complex zijn aan twijfel onderhevig, daar een fractie van ongeveer 10% van de specifieke stof door deze onderzoekers niet nader werd geanalyseerd. Deze olieachtige laag kan òf een ontledingsproduct vóór of na hydrolyse, van de specifieke stof zijn, waardoor de verhouding 1/3 op 2/3 oorspronkelijk anders was geweest; òf deze laag is als zoodanig een onderdeel van de specifieke stof, bij hydrolyse vrijgekomen, en dan is de formule $(C_{30}H_{44}O_{26})_x$ niet juist.

Type B.

Heidelberger, Goebel en Avery (1925) isoleerden het specifieke polysaccharide van het B-type, dat in tegenstelling tot de andere zure polysacchariden moeilijk in water, doch ge-

makkelijk in NaOH oplost. Met neutraal- en basisch loodacetaat ontstaat eveneens een neerslag, terwijl na hydrolyse glucose naast een niet nader onderzocht aldobionzuur wordt gevonden.

Type C.

Het specifieke polysaccharide van dit type werd eveneens onderzocht door Goebel en Avery (1927). Het is een gemakkelijk in water oplosbare stof met zure eigenschappen t.o.v. Congo-papier en een negatieve jodiumreactie. Met neutraal- en basisch-loodacetaat ontstaat eveneens een neerslag, terwijl na hydrolyse ook glucose naast aldobionzuur aanwezig is. Een overzicht van de eigenschappen der drie typen geeft tabel 1, waarin tevens de eigenschappen staan vermeld welke Bottema voor het polysaccharide en lipoid-polysaccharide uit een stam van het C-type vond.

Tabel 1.

Specifieke stof	$[\alpha]_D$	zuur-acq.	%C	%H	%N	red. verm.	hydrolyse producten	precipitatie-titer
type A	-100°	430	43,9	6,0	0,0	65%	{ aldobionz. glucose disacchar.z.	1 : 2000.000
type B	+100°	680	44,6	6,1	0,0	70%	{ aldobionz. glucose	1 : 2000.000
type C	+100°	620*	45,0*	5,8*	0,0*	75%*	{ aldobionz. glucose	1 : 2000.000
P. type C	+118°	996	41,6	6,3	0,0	70%		1 : 2000.000
L.—P. type C	+(108-120°)	590	44,7	5,9	0,3	63%	{ d-mannose d-galaktose aldobionz.	1 : 2000.000

Overzicht der chemische eigenschappen van de polysacchariden uit *B. pneumoniae* typen A, B en C met toevoeging van de gegevens van Bottema over het P. en L.-P. uit het C-type.

De chemische eigenschappen van de specifieke stoffen uit het C-type door Bottema en door Heidelberg er onderzocht, zijn dus geheel verschillend; *toch isoleerden beiden een polysaccharide, dat specifiek met het homologe antiserum tot 1 : 2.000.000 reageerde.*

*) Deze gegevens zijn geciteerd uit Lévy-Bruhl en Courtois (1940).

Toen volgens Bottema en de Fransche onderzoekers Lévy-Bruhl en Courtois gebleken was, dat het lipoïd-polysaccharide complex als een volwaardig antigeen moest worden beschouwd, terwijl het polysaccharide als een hapteen moest worden opgevat, *werd het van het grootste belang om te weten welke rol het lipoïd in het L.-P. zou spelen.*

Boivin en Mesrobianu (1933) waren de eersten, die uit een L.-P. antigeen, door verhitting in azijnzuur, een stof verkregen van een lipoïd-achtige samenstelling. Deze stof loste goed op in loog en na neutralisatie was de oplossing zéér toxisch voor een muis. Over de chemische eigenschappen konden wij het volgende vinden:

Het in aether oplosbare deel ($\pm 85\%$) was onoplosbaar in alcohol of aceton en gaf een positieve stikstof- en phosphorreactie; het andere deel ($\pm 15\%$) was onoplosbaar in alle oplosmiddelen, bevatte eveneens phosphor en stikstof, en gaf de phenolreactie van Millon.

Bottema vond voor het lipoïd uit het C-type van B. pneumoniae een zwak positieve reactie op glycerine en een aanwijzing voor vetzuren. Na zuivering van de lipoïd-fractie, door om beurten op te lossen in loog en neer te slaan met zuur, bleek deze oplosbaar in alcohol, chloroform, aether en petroleumaether, maar niet in aceton.

Deze chemische gegevens kunnen o.i. hoogstens doen vermoeden, dat een phospho-lipoïd deel uitmaakt van het specifieke kapselantigeen.

HET PROBLEEM.

De opgave die wij ons nu stellen, uitgaande van de mogelijkheden, die in het voorafgaand theoretisch overzicht naar voren zijn gekomen, kunnen wij thans in vier punten samenvatten:

1. Door de Amerikaansche onderzoekers *Goebelen* en *Avery* is het polysaccharide van het A-type zéér uitgebreid onderzocht; tóch moeten wij, in verband met onze bezwaren tegen dit onderzoek èn met de uitkomsten, die *Bottema* bij het C-type verkreeg, de chemische eigenschappen bij het A-type zèlf nader onderzoeken.
 2. Nadat door het onderzoek van *Bottema* was komen vast te staan, dat de lipoïd-polysaccharide-fractie uit de kapselstof van *B. pneumoniae* type C als een volwaardig antigeen moest worden beschouwd, lijkt het ons gewenscht de antigeniteit van fracties uit het kapselcomplex van *B. pneumoniae* typen A en C te vergelijken.
 3. De Fransche onderzoekers *Lévy-Bruhl* en *Courtois* vonden eveneens, dat lipoïd-polysacchariden antigenen en niet uitsluitend hapteneen zijn, zoodat wij ons moeten afvragen, hoe de samenstelling van de lipoïden is, die in staat zouden zijn om van een hapteneen-koolhydraat een volwaardig antigeen te maken.
 4. Ondanks het opwekken van precipitinen bij konijnen en caviae door het lipoïd-polysaccharide van het C-type, kon *Bottema* géén beschermende werking bij muizen waarnemen. Daar het groote belang van actieve immunisatie met eiwitvrije stoffen voor de hand ligt, willen wij deze proeven herhalen en aanvullen voor het A-type.
-

PRACTISCH GEDEELTE.

HOOFDSTUK I.

Het praktische gedeelte hebben wij gesplitst in twee hoofdstukken waarvan het eerste uitsluitend over het A-type en het tweede over het C-type handelt.

In het eerste hoofdstuk wordt allereerst besproken de isolatie van het lipoid-polysaccharide uit de kapselstof, waarbij wij achtereenvolgens nagaan de gebruikte stam, de gebruikte voedingsbodem, de isolatie-methode van de specifieke stof uit het kapselantigeen, de ont-eiwitting en droogmethode hiervan, om tenslotte de bereiding van het vrije lipoid-polysaccharide-zuur te bespreken. Daarop volgen de elementaire micro-stikstof- en micro-phosphor-bepalingen, met haar toepassing op de geïsoleerde lipoid-polysacchariden. Vervolgens is de isolatie der vrije polysacchariden en lipoïden uit het lipoid-polysaccharide complex besproken, om na de bereiding der vrije polysaccharide-zuren over te gaan tot de bespreking van de micro-stikstof- en micro-phosphor-bepalingen van deze lipoiden en polysacchariden. Daarop volgen eenige conclusies uit deze bepalingen, die verband houden met de beste scheidingsmethode van het lipoid-polysaccharide in haar componenten, om tenslotte het eerste hoofdstuk te besluiten met de chemische eigenschappen van het lipoïde en polysaccharide.

In het tweede hoofdstuk volgt dan de bereiding van de specifieke stof uit het C-type, waarbij wij achtereenvolgens behandelen: de gebruikte stam, de voedingsbodem, de isoleerings-methode van het lipoid-polysaccharide uit het C-type, de verhooging van de pathogeniteit, met tot slot de scheiding van het lipoid-polysaccharide in zijn componenten.

1. ISOLATIE VAN HET LIPOID-POLYSACCHARIDE UIT HET A-TYPE.

A. *De gebruikte stam.*

Als vertegenwoordiger van het A-type of Frankland-type hadden wij de keus uit een viertal sammen, die ons ter beschikking waren gesteld door Prof. Dr. E. P. S n i j d e r s, directeur van het Laboratorium voor Tropische Hygiëne te Amsterdam. Zij droegen de aanduidingen F1, F2, F15 en F23. Als vertegenwoordiger van het C-type gebruikten wij evenals B o t t e m a de F10-stam.

Morphologisch zijn alle stammen asporogene, onbeweeglijke, Gram-negatieve, aërobe (facultatief anaërobe), polymorphe staafjes, die aan de uiteinden afgerond zijn. Een duidelijk kapsel is bij alle te zien in Burri-preparaten, nagekleurd met Loefflers methyleenblauw.

Wij vonden de volgende kweek-eigenschappen:

Op alkalische bouillon was een diffuse groei met sediment te zien en op bouillonagar ontwikkelden zich gladde slijmerige, verheven kolonies. De stammen deden gelatine niet vervloeien, evenmin vormden zij in peptonwater indol.

Glucose en saccharose werden door alle vergist, terwijl voor enkele andere suikers hieronder een vergistingsschema en eenige andere, het type kenmerkende, reacties volgen:

Tabel 2.

Stam	F10 type C	F1 type A	F2 type A	F15 type A	F23 type A	Zuivere Frankland	F23 uit muis
V. P. reactie	—	+	+	+	+	+	+
Methylrood groei Koser	+	+	±	+	±	—	±
glycerine-verg.	z + g	z	z + g	—	—	—	—
adoniet	z + g	z + g	z + g	z + g	z + g	—	z + g
dulciet	z + g	—	—	—	—	—	—
lactose	z + g	—	—	—	—	—	—

Vergistingsschema (z + g beteekent zuur + gas) en eenige kenmerkende reacties van enkele stammen van *B. pneumoniae*.

De kleine afwijking van het zuivere Frankland-type in de adoniet-vergisting konden wij verwaarloozen, daar serologisch uitgemaakt was, dat deze stammen tot het A-type behoorden.

De Voges-Proskauer-reactie werd beoordeeld na vijf dagen broeden bij 30° C. De glycerine-vergisting moesten wij reeds na één dag bepalen, daar na langeren tijd glycerine door alle stammen wordt omgezet.

Voor ons onderzoek kozen wij de F23-stam, daar deze zeer goed groeit op synthetische voedingsbodems en tevens een behoorlijke pathogeniteit bezit. Deze stam werd pas na passage door een muis in gebruik genomen. Hiertoe werd een witte muis subcutaan bij de staartwortel ingespoten met 0,1 cm³ van een

bacterie-suspensie, bereid door een 24 uur oude schuine agar-cultuur, bebroed bij 37° C, af te slibben met 10 cm³ fysiologische keukenzout oplossing. Na twee dagen was de muis gestorven en vertoonde bij sectie een sterk vergrootte, donkere milt. Uit het hartebloed werd nu de nieuwe F23-stam gekweekt, waarmee wij onze proeven deden.

B. De gebruikte voedingsbodem.

Volgens de reeds besproken mededeelingen uit de literatuur kwamen als voedingsbodem voor ons alléén vloeibare in aanmerking. Hierin zou immers een groot gedeelte van het polysaccharide in vrijen toestand terecht komen.

Evenals *Bottema* achtten wij het een eerste voorwaarde, dat in de op te werken cultures zoo weinig mogelijk vreemde stoffen naast het specifieke koolhydraat aanwezig zouden zijn, waardoor het zuiveren aanmerkelijk vereenvoudigd zou worden. Wij maakten dus geen gebruik van pepton, alkalische bouillon of voedingsbodems waaraan glucose was toegevoegd. In de literatuur wordt bijna uitsluitend gebruik gemaakt van glucose-bevattende cultuurmedia, wat o.i. niet juist is, indien het gaat om het isoleeren van specifieke polysacchariden.

De volgende voedingsbodems werden eerst nader onderzocht:

1. 0,5% d-glutaminezuur; 0,5% K₂HPO₄; 0,5% ammoniumlactaat en 1 mg *Saccharomyces cerevisiae siccum* per liter.
p_H = 7,4.

Dit is de voedingsbodem voor de F10-stam volgens *Bottema*.

2. 0,4% asparagine; 0,6% ammoniumlactaat; 0,2% K₂HPO₄; 0,5% NaCl.

Dit is de zeer bekende synthetische voedingsbodem van *Uchinsky* vereenvoudigd door *Fränkel*; o.a. beschreven door *Vedder* (1935).

3. 0,8% Bactopepton; 0,5% NaCl en 1 mg gist per liter leidingwater.

Deze voedingsbodem diende om een vergelijking te kunnen maken met de synthetische media.

Op de eerste voedingsbodem was, na drie dagen broeden bij 37° C, in het geheel geen groei waar te nemen. Dit is wel op-

merkelijk, daar de F10-stam van het C-type er uitstekend op groeit.

Op de tweede voedingsbodem was een behoorlijke groei te zien; deze kon die in de derde echter niet evenaren. Daarom trachtten wij een verbetering te verkrijgen door toevoeging van nog andere aminozuren, waartoe de volgende oplossingen vergeleken werden:

4. als 2 met 0,5% alanine.
5. als 2 met 0,5% glycocoll.
6. als 2 met 0,001% cystine.

De groei in de media 4 en 5 was zeker niet beter dan die van 2; die in 6 was echter aanzienlijk sterker, en vooral na 5 dagen broeden bij 37°C was de groei bijna even goed als in de voedingsbodem 3.

De door ons gebruikte voedingsbodem had nu de volgende samenstelling:

- 4 gr asparagine. 1 aq.
- 2 gr K_2HPO_4
- 5 gr NaCl
- 2 gr Na_2CO_3 . 10 aq.
- 8 cm³ ammoniumlactaat (80%)
- 1 mg *Saccharomyces cerevisiae* siccum
- 10 mg cystine

Na fijnmalen van de asparagine werden alle vaste stoffen onder verwarming opgelost in 1 liter leidingwater. Daarna voegden wij het ammoniumlactaat toe en werden de kolfjes gesteld op een p_H van 7,2, waarna 30 minuten op 110° C gesteriliseerd werd. Gist voegden wij aan de voedingsbodem toe, omdat bij het C-type gebleken was, dat de opbrengst aan specifieke stof hierdoor vergroot wordt.

C. De isolatie-methode.

36 liter van onze voedingsbodem werden beënt met de F23-stam en gedurende 8 dagen bij 37° C bebroed, om daarna een week weggezet te worden bij kamertemperatuur *). De oplossingen zijn dan zéér visceus geworden. Na dooden der bacterien

*) Door gebrek aan broedruimte konden wij helaas geen grotere hoeveelheden voedingsbodem tegelijkertijd bebroeden.

door 0,5% phenol, dampten wij voorzichtig bij 40° C onder verminderde druk in. Toevoeging van wat laurinealkohol kon de schuimvorming slechts gedeeltelijk tegengaan, zoodat het beschikbare destillatievat maar voor 2/3 gevuld kon worden.

Nadat het volume ongeveer 3 liter geworden was, werd de p_H met ijsazijn op 4,6 gebracht, waarbij geen zichtbare verandering optrad. Vervolgens voegden wij langzaam, onder voortdurend roeren door middel van een elektrische roerder, alcohol toe tot een concentratie van 30%. Daarbij moet alle specifieke stof zich dan in het gevormd neerslag bevinden; na één nacht staan kon de bovenstaande vloeistof voorzichtig afgeschonken worden, daar het neerslag sterk aan elkaar kleefde.

Heidelberger en ook Bottema centrifugeerden de door alcohol neergeslagen stof af, waarbij onder de alcoholische oplossing twee lagen ontstonden waarvan zij alleen de bovenste opwerkten.

In ons geval was na het centrifugeeren slechts één compacte slijm massa te zien, zoodat wij het geheele neerslag verder moesten verwerken.

De specifieke stof werd toen opgelost in 2½ liter buffermengsel van een $p_H = 4,6$, gemaakt door één 5% natriumacetataat oplossing met azijnzuur aan te zuren. Centrifugeeren van de troebele oplossing op 3000 toeren gaf slechts weinig eiwitneerslag. Uit de gecentrifugeerde oplossing kon de specifieke stof nu neergeslagen worden bij een alcoholconcentratie van 45%. Opnieuw oplossen in 1800 cm³ buffermengsel en afcentrifugeeren gaf met alcohol een precipitaat, dat reeds volkomen in 1 liter buffermengsel oploste. De hoeveelheid neergeslagen eiwit is dan ook zeer gering in verhouding tot hetgeen Bottema voor het C-type vond.

Dat de eerste alcoholische oplossing geen specifieke stof meer bevatte konden wij bevestigen, doordat na indampen in vacuo het residu geen reactie meer gaf met homoloog antiserum. Bij het verder zuiveren had de specifieke stof een steeds hooger percentage alcohol nodig om neergeslagen te worden. Daarom controleerden wij hierop een latere alcoholische oplossing van 72%; hierin was wel degelijk specifieke stof aanwezig, hetgeen bleek uit een positieve reactie van het residu met het homologe antiserum.

Men verlate zich dus niet al te veel op de meening, dat de specifieke stof steeds volledig door alkohol zou worden neergeslagen.

D. De onteiwitting.

Ter verdere onteiwitting pasten ook wij de methode van *Sev ag* toe. De tot 1 liter teruggebrachte acetaat-bufferoplossing werd hiertoe gedurende drie uren geschud met 200 cm³ chloroform en 40 cm³ amylo-alkohol. De bovenste troebele oplossing met het neerslag werd zoo goed mogelijk afgepipetteerd en daarna gecentrifugeerd. Hierbij verschenen onder in de centrifuge-buizen enkele druppels chloroform en daarboven een compacte massa, die hoofdzakelijk uit eiwit bestond. De daar weer bovenstaande troebele oplossing der specifieke stof kon, na afpipetteeren, nu opnieuw volgens deze methode onteiwit worden.

Het bleek, dat de vereenigde eiwitneerslagen te weinig specifieke stof bevatten om een nieuwe zuivering, door opname in het buffermengsel, loonend te maken.

Na ongeveer zeven keer de onteiwittingsmethode van *Sev ag* toegepast te hebben, ontstond er na lang schudden nog wèl een neerslag, maar de eiwitreacties hierop gedaan waren negatief. Om verder verlies te vermijden werd toen, door toevoeging van alkohol tot een concentratie van 50%, de specifieke stof uit de opalescente oplossing neergeslagen. Als opbrengst kregen wij gemiddeld 12 gram drooge stof per 50 liter kultuurvloei-stof; dit is bijna drie keer zooveel als maximaal voor het C-type kon worden verkregen.

Door op te lossen in gedestilleerd water en neer te slaan bij een alkohol-concentratie van 72% kregen wij de zuivere specifieke stof in handen en wel als natriumzout.

In tegenstelling met de oorspronkelijke methode van *Sev ag* maakten wij bij het centrifugeeren *niet* gebruik van een onderlaag van chloroform. Er waren na het centrifugeeren zooals gezegd slechts enkele druppels chloroform onder in de buizen te zien. Dit heeft het voordeel, dat bij het vervoeren der buizen de eiwitlaag niet door elkaar geschud wordt en daardoor gemakkelijk gescheiden kan worden van de oplossing der specifieke stof. Indien men voor bezuiniging de chloroform opnieuw

zou willen gebruiken, kan dat alléén na rectificatie. Door een herhaald schudden met dezelfde chloroform gaat n.l. het specifieke zout in de oplossing, door HCl-ontwikkeling, over in het specifieke zuur en hierdoor wordt de opbrengst veel minder.

E. *De droogmethode.*

Het drogen der specifieke stof gaf ons eerst eenige moeilijkheden, daar het alcoholische neerslag na drogen in een vacuum-exicator boven CaCl_2 een vuile keiharde massa opleverde. Door fijnmalen en zeven kregen wij met veel moeite een geelachtig amorph poeder.

Met de volgende methode, die ook voor het drogen van gedatureerde eiwitten door ons met succes werd toegepast, hadden wij een verrassend resultaat:

De zoojuist met alcohol neergeslagen stof wordt nog vochtig in een Soxhlet-apparaat drie tot vijf dagen met aceton geëxtraheerd. De aceton wordt in de loop der tijd twee keer ververscht. Daarna kan snel in een vacuum-exsiccator worden gedroogd. Met deze langzame dehydratatiemethode verkregen wij een prachtig sneeuwwit volumineus poeder, in plaats van een keiharde stof, die door de zware mechanische bewerking van het malen en zeven ijzer-verontreinigingen bevat en er geelachtig uitziet.

Zeer groote voordeelen zijn o.a.: de tijdbesparing, een zuiverder stof, een fijnere verdeeling en daardoor weer een gemakkelijker oplossen.

Natuurlijk moesten wij ook nagaan of de specifieke stof door deze bewerking serologisch niet veranderd was. Hiertoe werd de precipitatie-titer van de gewoon gedroogde en die van de met aceton gedroogde specifieke stof bepaald. Beiden hadden t.o.v. het gebruikte serum een gelijke precipitatie-titer van 1:10.000.000, zoodat een invloed van aceton op de specificiteit niet merkbaar is.

De chemische eigenschappen van het specifieke zout zijn de volgende:

Alle eiwitreacties negatief (Millon, ninhydrine-, biureet- en sulfosalicylzuur-reactie) en de Molish-proef op polysacchariden sterk positief. Het stikstof-gehalte was ongeveer

0,3 %, de phosphor-reactie van Kjeldahl positief en de zwavel-reactie van Lassaigne negatief.

De optische draaiing was door opalescentie van de oplossingen niet te bepalen. Het aschgehalte was ongeveer 10%; terwijl de p_H van een 1% oplossing op 6,8 kon worden bepaald.

Een poging tot verdere zuivering, om het stikstof percentage te verminderen, werd niet gedaan, daar bij het onderzoek van *Bottema* bij het C-type was gebleken, dat het specifieke zout bestaat uit een lipoid-polysaccharide-complex, dus stikstof moet bevatten.

F. De bereiding van het vrije L.-P.-zuur.

Bij 50 cm³ van een 2 % oplossing van het L.-P.-zout voegden wij 5 cm³ 2n HCl toe. Hierna werd direct onder omschudden alcohol toegevoegd, totdat alle stof neergeslagen was. Na afcentrifugeeren en oplossen in zoo weinig mogelijk gedestilleerd water, werd opnieuw aangezuurd met zoutzuur en met alcohol behandeld. Na drie keer met zuur behandeld te hebben en het neerslag met de bekende aceton-droogmethode te hebben gedroogd, verkregen wij het vrije L.-P.-zuur.

Uit de vereenigde alcoholische oplossingen bleek na indampen, neutralisatie met NaOH, en opnieuw met alcohol behandelen, vrijwel geen neerslag meer te ontstaan; de verliezen bij deze bereidingsmethode waren dan ook zeer gering.

De moeilijkheden, die *Bottema* ondervond bij het, door middel van HCl vrijmaken van het zuur uit het L.-P.-zout van type C, konden door ons niet opgemerkt worden. Bij ons L.-P.-zout verkregen wij juist, bij gebruik van verdund trichloorazijnzuur in plaats van verdund zoutzuur, een geringere opbrengst aan vrij lipoid-polysaccharide-zuur.

Men moet er echter wèl goed op letten het zoutzuur *zoo kort mogelijk te laten inwerken, daar zuur van zeer grooten invloed is op de viscositeit der oplossingen.* Uit een langeren tijd met zuur behandelde L.-P.-oplossing zijn de polysacchariden niet meer neer te slaan, tenzij bij een zeer hoog alcohol-percentage, en dan met groote verliezen.

De chemische eigenschappen van het vrije L-P-zuur zijn in het kort de volgende:

C % = 41,1; H % = 6,6; N % = 0,1; P % = 0,2.

Het zuuraequivalent kon bepaald worden op 410; terwijl een 1 %-oplossing in gedestilleerd water een p_H van 4,0 had. Het aschgehalte was 0,1 % en daalde ook na meerdere zoutzuur-behandelingen niet meer. De optische draaiing kon bepaald worden en gaf een $[\alpha]_D = -100^\circ$ ($c = 0,5$).

2. ELEMENTAIRE MICRO-STIKSTOF- EN MICRO-PHOSPHOR-BEPALINGEN.

Zooals wij reeds in het theoretische gedeelte blz. 25 uiteenzetten, zouden wij een nader onderzoek instellen naar de samenstelling van de lipoid-fractie uit het lipoid-polysaccharide-complex.

Daar zowel Boivin en Mesrobian als Bottema bij deze lipoiden phosphor en stikstof vonden, gaan onze eerste gedachten uit naar de plantaardige phosphatiden, die vooral door Bleyer en Diemair (1931) en later door Diemair en Weiss (1939) onderzocht zijn. Deze schrijvers zijn met hun onderzoekingen over de phosphatiden uit wortelen, melk, tarwe, gerst, haver, boekweit en lupine reeds ver gevorderd. Voor hun analyses gingen zij uit van groote hoeveelheden materiaal, zoodat zij tenslotte met geperfectioneerde apparaten kleine hoeveelheden vetzuren quantitatief konden bepalen.

Daar wij de beschikking zouden krijgen over hoogstens enkele honderden mg zuiver lipoid, kon er geen sprake van zijn een volledige analyse uit te voeren en zouden wij ons tot enkele hoofdzaken moeten bepalen.

Het meest komen hiervoor de P:N-verhoudingen in aanmerking, die in phosphatiden 1:1 en 1:2 kunnen zijn. Tot de P:N-verhouding 1:1 behooren de lecithinen en kephalinen en tot de 1:2-verhouding de sphingomyelinen.

Om de P:N-verhouding van het lipoid uit het A-type vast te stellen moesten wij ons eerst bezig houden met micro-stikstof- en micro-phosphor-bepalingen.

Als *micro-stikstof-analyse* werd de methode van ter Meu-

len en Heslinga (1930) gebruikt met het door ter Meulen (1934) voorgestelde nikkel-thorium als katalysator.

Zelfs indien het stikstof-percentages maar 0,1 % zou zijn, kon worden volstaan met het afwegen van 10 mg stof.

De hydreeering had plaats tusschen 250 en 280° C binnen een uur tijds, en de ontstane ammoniak werd getitreerd op 0,01 n HCl, met methylrood als indicator.

De *micro-phosphor-bepalingen* leverden veel moeilijkheden op, omdat in slechts enkele mg-stof de phosphor met een nauwkeurigheid van enkele gamma's zou moeten worden bepaald.

Volgens de literatuur is de nauwkeurigheid van de phosphor-bepalingen, waarbij de te onderzoeken stof ontsloten moet worden, niet erg groot. Het was ons doel om een micro-phosphor-bepaling te vinden, die zoo mogelijk dezelfde nauwkeurigheid zou bezitten als de micro-stikstof-bepalingen.

Uit een voorproefje bleek, dat de phosphor organisch gebonden was, zoodat de bepaling gesplitst kon worden in een *ontsluitingsmethode* en een *anorganische phosphorzuur-bepaling*.

Een geringe hoeveelheid anorganisch phosphaat kan op verschillende manieren zeer nauwkeurig bepaald worden; b.v. volgens Postic, Rabaté en Courtois (1942) met strychninemolybdaat en daaropvolgende nephelometrische vergelijking van de troebeling, of volgens Denigès met het ammoniummolybdaat-reagens en reductie b.v. met hydrochinon van het phosphor-molybdeenzuur tot een blauwe kleur, die veroorzaakt wordt door het $H_3PO_4 \cdot (MoO_2 \cdot 4MoO_3)$ complex.

De methode met het strychnine-molybdaat leek ons hier niet zoo geschikt, omdat bij de voorafgaande ontsluiting stoffen kunnen ontstaan, die invloed konden uitoefenen op het colloïdale neerslag; daarom besloten wij tot de blauwkleuring met ammonium-molybdaat.

1. Als eerste ontsluitingsmethode voor het phospholipoid kozen wij de elegante methode van Roepke (1937). De stof wordt hierbij opgelost en ingedampt met 2 cm³ van een 50 % magnesium-nitrat 6aq.-oplossing. Bij temperatuursverhooging smelt hierbij het nitrat in zijn kristalwater, en bij deze vrij hoge temperatuur heeft een gemakkelijke oxydatie van de elementen plaats. Ten overvloede kan nog, indien niet alle koolstof opgelost is, met een druppel HNO₃ opnieuw verhit worden.

Daarna moet men echter nog bij hooge temperatuur de nitreuze dampen verdrijven, en hierbij bleek ons dat iets van het materiaal van de kolfjes oploste. Uit pyrex kolfjes en zelfs uit kwarts kroesjes loste een wisselende hoeveelheid materiaal op, zoodat de blanco proeven géén constante blauwwaarde te zien gaven. Ook platina kroesjes werden voor een gedeelte opgelost en deugden niet voor ons doel.

2. Een tweede ontsluitingsmethode van *Steinhoff* (1938): koken met sterk HNO_3 en KMnO_4 en daarna ontkleuren met H_2O_2 , leverde eveneens te hooge en wisselende blauwwaarden voor de blanco-proeven op.

3. Als derde methode probeerden wij de beproefde ontsluiting van *Kjeldahl*, die niet direct werd gekozen, omdat het zwavelzuur zoowel oxydeerend als reduceerend kan werken. Het is namelijk een bekend feit, dat de micro-Kjeldahl stikstofbepaling voor hoogmoleculaire stoffen te lage waarden oplevert, vandaar onze voorkeur voor de N-bepalingen volgens *ter Meulen* en *Heslinga*. Zoo zou het ook mogelijk kunnen zijn, dat de micro-Kjeldahl phosphor-ontsluiting voor hoogmoleculaire stoffen te lage phosphorwaarden gaf.

De *destructie der stof* geschiedde nu door ongeveer 10 mg-stof, in een pyrex rondbodem van 50 cm^3 inhoud, met langen hals, te verhitten met 1 cm^3 sterk zwavelzuur en een seleenmengsel zonder kopersulfaat. De lichtgele oplossing kon met enkele druppels H_2O_2 (3%) geheel ontkleurd worden. In de heldere oplossing moest nu het anorganische phosphaat bepaald worden.

De *phosphaat-bepaling* met phosphor-molybdeen-zuur geeft een blauwkleuring, die wij met behulp van een „Stufenphotometer” exact zouden kunnen vastleggen. Daar wij hierover niet de beschikking hadden, gebruikten wij een tintometer van *Lovibond*, waarvan *van As* (1939) overigens terecht zegt, dat dit apparaat niet te beschouwen is als een wetenschappelijk instrument, doch dat het zeer goed bruikbaar is voor indirect bepalen en vergelijken van kleuren.

Het bleek later zeer juist te zijn geweest, dat wij de blauwwaarde van onze standaardoplossingen, die gewoonlijk voor vergelijking moesten dienen, hadden vastgelegd, daar deze na

ongeveer drie dagen, door invloeden van licht en zwavelzuur op het phosphor-molybdeencomplex, veranderen.

Aan de hand van de anorganische phosphaat-bepaling van Bell en Doisy (1920) of Denigès (1921), werd nu als volgt gewerkt:

Aan het volgens Kjeldahl ontsloten en met ammoniak in de koude op Congopapier geneutraliseerde phosphaat voegden wij 0,4 cm³ reagens Denigès toe. De lichtgeel gekleurde oplossing werd tot aan het kookpunt verhit, waarna 0,2 cm³ hydrochinon-reagens onder omschudden werd toegevoegd. Na enkele seconden doorkoken lieten wij de vloeistof rustig afkoelen, spoelden die in een 25 cm³-maatkolfje en konden dan direct de blauwwaarde bepalen. Deze waarde blijft ongeveer drie dagen constant. Naast een phosphorbepaling werd eenige malen een blanco proef op precies dezelfde manier gedaan. De blanco's met Kjeldahl-ontsluiting waren steeds constant en gaven slechts een blauwwaarde van 0,5 Lovibond-Eenheid.

Het reagens van Denigès werd als volgt samengesteld: wij losten 25 gram ammoniummolybdaat op in 100 cm³ water, voegden daarna 25 cm³ sterk zwavelzuur toe en vulden met water aan tot 500 cm³.

Het hydrochinon-reagens bereidden wij door 0,5 gr hydrochinon en 15 gr natriumbisulfiet in 100 cm³ water op te lossen.

In plaats van de reagentia, volgens het oorspronkelijke voorschrift, in de koude op het phosphaat te laten reageeren, deden wij dit volgens P e s e z (1942) in de warmte. De reagentia en hoeveelheden die P e s e z in zijn proeven gebruikt, zijn voor ons doel niet geschikt, daar ze gebaseerd zijn op hoeveelheden phosphor tot 10 γ .

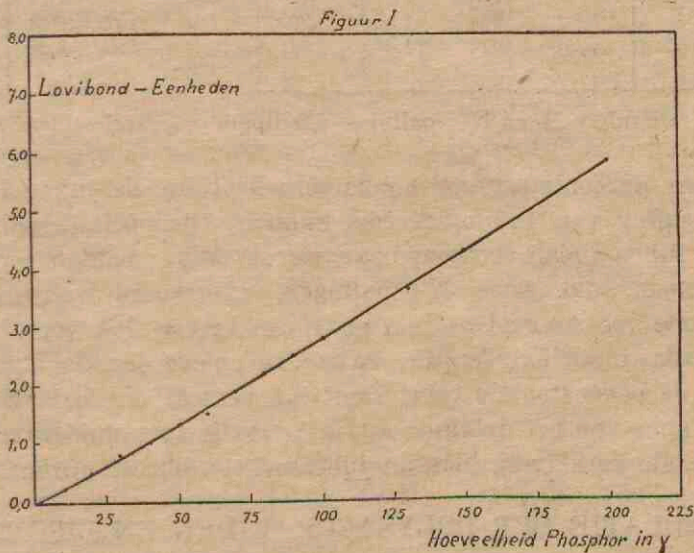
Er moet op gelet worden, dat het D e n i g è s-reagens niet te oud is en steeds in het donker bewaard wordt. Een blanco proef van een Denigès-reagens, dat twee weken in het licht gestaan had, gaf een blauwwaarde van 5,3 Lo.E.; daarentegen bleef een blanco proef van een zes maanden oud reagens, dat in het donker bewaard was, constant op een blauwwaarde van slechts 0,2 Lo.E.

Tabel 3.

γ phosphor	Lovibond-Eenheden			γ phosphor	Lovibond-Eenheden		
	Neutraal	Geel	Blauw		Neutraal	Geel	Blauw
00	0,1	0,0	0,2	70	0,1	0,2	2,1
10	0,1	0,0	0,4	80	0,1	0,2	2,4
20	0,1	0,0	0,7	90	0,1	0,2	2,7
30	0,1	0,1	1,0	100	0,2	0,2	3,0
40	0,1	0,1	1,2	130	0,3	0,3	3,9
50	0,1	0,1	1,5	150	0,4	0,4	4,5
60	0,1	0,1	1,7	200	0,5	0,5	6,1

Metingen van standaard-phosphor-oplossingen met de Lovibond-tintometer.

De metingen van 10 tot 200 γ deden wij alle met 0,4 cm³ Denigès- en 0,2 cm³ hydrochinon-reagens. De nauwkeurigheid bij het aflezen gaat tot op 0,1 Lo.E., zoodat met onze bepaling ongeveer 3 à 4 γ phosphor zuiver gemeten kan worden.



Verband tusschen de blauwwaarde bepaald met de Lovibond-tintometer en de hoeveelheid phosphor.

De micro-stikstof- en micro-phosphor-bepalingen der L.-P.

De P:N-verhoudingen konden nu bepaald worden van het lipoid-polysaccharide-natriumzout en van het vrije lipoid-polysaccharide-zuur, terwijl daarnaast als contrôle een zuiver lecithinepreparaat van Friedr. Witte, Rostock werd ingezet.

Het N-percentage werd nu bepaald door middel van de formule $N\% = \frac{\text{cm}^3 0,01 \text{ n HCl} \times 13,97}{\text{mg ingewogen stof}}$, terwijl wij uit de waargenomen blauwwaarde verminderd met de correctie voor de blanco proef, met behulp van de graphiek direct het aantal γ phosphor in een oplossing konden vaststellen.

Tabel 4.

Stof	Ingewogen in mg	cm ³ 0,01 n HCl	N%	Ingewogen in mg	Blauww. —blanco	γ P	P%	P:N
L.-P.-zout	13,40	0,305	0,32	27,05	1,9	70	0,26	1:2,7
	9,80	0,231	0,33	33,90	2,4	88	0,26	1:2,8
L.-P.-zuur	12,30	0,096	0,11	28,70	1,9	70	0,24	1:1,0
	12,65	0,102	0,11	18,90	1,2	46	0,24	1:1,0
Lecithine	5,52	0,610	1,55	3,30	3,0	107	3,24	1:1,0
	5,05	0,557	1,54	4,54	4,2	146	3,22	1:1,0

De micro-P- en N-bepalingen der lipoid-polysacchariden.

Daar de contrôleproef bij zuivere lecithine de juiste P:N-verhouding van 1:1 opleverde, kunnen wij concludeeren, dat onze P-bepalingen betrouwbaar waren. Wij mochten immers aannemen, dat onze N-bepalingen, uitgevoerd volgens de methode van ter Meulen en Heslinga, óók voor hoogmoleculaire stoffen de juiste waarden opleverden.

In de bovenstaande tabel komt het verschil in de P:N-verhoudingen van het natriumzout en het vrije zuur duidelijk naar voren. De verklaring hiervan zullen wij op blz. 45 geven.

3. ISOLATIE DER POLYSACCHARIDEN EN LIPOIDEN.

A. *De scheiding van het L.-P. in lipoid en polysaccharide.*

1. Bij de scheidingsmethode die wij het eerst toepasten en die

algemeen gebruikelijk is, maakten wij gebruik van verdund azijnzuur in de warmte. Hiertoe werd 300 mg L.-P. F23-zout opgelost in 30 cm³ gedestilleerd water waarna azijnzuur werd toegevoegd tot een concentratie van 1 normaal. Na een half uur verhitten op het waterbad, scheidde zich een zwaar vlokkelig neerslag af, dat door centrifugeeren verwijderd kon worden. Uit de oplossing kon met alcohol weer het polysaccharide-zout worden verkregen. Het neerslag, dat ongeveer 10 % van het ingewogen L.-P.-zout uitmaakte, was nu het ruwe lipoid. Dit loste op in 0,1 n NaOH en kon met azijnzuur weer worden neergeslagen.

Wij verkregen zeer onbevredigende resultaten met deze methode. Het lipoid loste slecht in alcohol op en daar zoowel loog als verhitting met azijnzuur ontledingen veroorzaken, sloegen wij een geheel andere weg in, en trachtten een scheiding in de koude te verkrijgen met een buffermengsel van een bepaalde p_H:

2. 200 mg L.-P.-zout werd opgelost in 20 cm³ van een buffermengsel met een p_H van 2,2. Deze buffer werd gemaakt door 2,5 gram oxaalzuur op te lossen in 100 cm³ water en daarna loog toe te voegen tot de juiste p_H, met tropaeoline 00 als indicator. In deze buffer werd het zout opgelost en na vijf dagen kon het neerslag dat ontstaan was afgefiltreerd worden. Dit neergeslagen lipoid loste grootendeels op in CH₃OH, het onoplosbare gedeelte werd verwaarloosd. Indampen onder verminderde druk in stikstof-atmosfeer gaf een vaste stof, die echter slechts voor een klein gedeelte in aether oploste. Na afdampen van de aether kon de stof weer in methylalkohol worden opgenomen. Door deze alcohol af te dampen en de stof in vacuo boven P₂O₅ te drogen, hielden we een lichtgele vette substantie over.

De bufferoplossing was nog troebel, doordat niet al het lipoid was neergeslagen, maar na een half uur verhitten op het waterbad was de oplossing geheel helder geworden. Het neerslag waschten wij met lauw water en daarna met methylalkohol waarin het onoplosbaar was, om het vervolgens eveneens boven P₂O₅ te drogen. Deze twee gedroogde stoffen zullen later bij onze analyses behandeld worden.

De bufferoplossing waaruit het neerslag verwijderd was, bevatte nu naast het zuivere polysaccharide-zout het oxaalzuur. Dit mengsel was niet of moeilijk te scheiden, omdat beide stoffen goed oplossen in water en moeilijk oplossen in alcohol, terwijl de calciumzouten van beide onoplosbaar zijn.

Door gebruik te maken van deze oxaalzuurbuffer is het ons gelukt het lipoid in twee fracties af te scheiden, waarvan de eene oplosbaar en de andere onoplosbaar is in methylalkohol. Het nadeel van deze methode n.l. het verlies van het polysaccharide en de noodzakelijkheid tóch te moeten verhitten om het lipoid volledig neer te slaan, bracht ons er toe nog een derde scheiding te beproeven.

3. Hiertoe maakten wij gebruik van het precipiteerend vermogen van ijszijn. Wij losten 5 gram L.-P.-natriumzout op in 250 cm³ gedestilleerd water en lieten deze oplossing, na toevoeging van 500 cm³ ijszijn, gedurende vijf dagen staan. De oplossing was toen volkomen helder geworden en het neerslag bezonken. Na afeentrifugeeren kon de bovenstaande polysaccharideoplossing voorzichtig worden afgepipetteerd. Door het neerslag op te nemen in 20 cm³ water van hoogstens 40° C en dit daarna opnieuw een dag met het dubbele volume ijszijn weg te zetten, verkregen wij het ruwe lipoid. De aceton-droogmethode kon ook op dit ruwe lipoid worden toegepast en gaf ons een lichtgeel amorph poeder, met een opbrengst van 9,6 % aan droge stof.

De vereenigde ijszijn-oplossingen gaven met alcohol een neerslag van het zuivere polysaccharide, dat nog gedeeltelijk als natriumzout aanwezig was. Door opnieuw op te lossen in gedestilleerd water, neer te slaan met alcohol en de aceton-droogmethode toe te passen, verkregen wij een mooie witte stof met een opbrengst van 80 %. Uit de alcoholische oplossingen kon door indampen in vacuo, neutraliseeren en daarna opnieuw met alcohol behandelen nog 9,5 % aan ruw polysaccharide-zout verkregen worden. De verliezen bij de ijszijn-scheiding waren dus zéér gering, gezien de bijna quantitative opbrengst der verschillende componenten.

B. *De bereiding der vrije polysaccharide-zuren.*

Evenals voor de bereiding van het vrije L.-P.-zuur maakten

wij voor de isolatie der P.-zuren gebruik van verdund HCl.

Een 2% oplossing van een P.-zout in gedestilleerd water werd daartoe eenige malen met zoutzuur en alcohol behandeld. Na drogen van het polysaccharide-zuur met de aceton-droogmethode verkregen wij een witte kristallijne stof. In tegenstelling met de ervaring bij het bereiden van het vrije L.-P.-zuur, konden we hier uit de vereenigde alcoholische oplossingen nog wèl ruw polysaccharide-zout neerslaan; er was dan ook vrij veel verlies bij de bereiding van de vrije polysaccharide-zuren.

C. *Micro-stikstof- en micro-phosphor-bepalingen der lipoid- en polysaccharide-complexen.*

Door onze drie scheidingsmethoden van het lipoid-polysaccharidecomplex zijn ons in handen gekomen: vier lipoid preparaten en drie vrije polysaccharide-zuur preparaten.

Wij kregen achtereenvolgens:

- 1ste een lipoid preparaat uit azijnzuur bij 90° C neergeslagen.
- 2de een lipoid preparaat uit het buffermengsel bij 18° C neergeslagen.
- 3de een lipoid preparaat uit het buffermengsel bij 90° C neergeslagen.
- 4de een lipoid preparaat uit ijsazijn bij 18° C neergeslagen.
- 5de een polysaccharide-zuur preparaat, als zout afkomstig uit de azijnzuuroplossing van 90° C.
- 6de een polysaccharide-zuur preparaat, als zout afkomstig uit het buffermengsel van 90° C.
- 7de een polysaccharide-zuur preparaat, als zout afkomstig uit de ijsazijnoplossing van 18° C.

Van al deze stoffen hebben wij het stikstof- en phosphorgehalte bepaald, om uit te maken welke van de drie bereidingsmethoden het meest zuivere preparaat oplevert.

- 1ste P: N-bepaling van het met In azijnzuur neergeslagen lipoid bij 90° C uit een 1% L.-P.-natriumzoutoplossing.

$$N\% = 4,08 \text{ en } P\% = 3,81; \text{ dus } P:N = 1:2,4.$$

- 2de P: N-bepaling van het in methylalkohol oplosbare lipoid, neergeslagen in de koude uit een buffermengsel.

$$N\% = 0,62 \text{ en } P\% = 1,24; \text{ dus } P:N = 1:1,1.$$

3de P: N-bepaling van het lipoïd, dat alleen door warmte neerslaat uit het buffermengsel.

$$N \% = 3,47 \text{ en } P \% = 1,48; \text{ dus } P: N = 1: 5,2$$

4de P: N-bepaling van het lipoïd, dat met ijsazijn neerslaat in de koude.

$$N \% = 1,32 \text{ en } P \% = 2,58; \text{ dus } P: N = 1: 1,2.$$

5de P- en N-bepaling van het vrije P.-zuur, verkregen door het lipoïd te verwijderen met 1n azijnzuur bij 90° C.

$$N \% = 0,03 \text{ en } P \% = 0,25.$$

6de P-bepaling van het vrije P.-zuur, verkregen na verwijdering van beide lipoïd-fracties uit het buffermengsel. Gemengd met oxaalzuur is het $P \% = 0,15$. Het N-percentage werd niet bepaald.

7de P- en N-bepalingen van het vrije P.-zuur, verkregen door het lipoïd te verwijderen met ijsazijn in de koude.

$$P \% = 0,08 \text{ en } N \% = 0,02.$$

Tevens werden P- en N-bepalingen gedaan van het P.-natriumzout, verkregen door het lipoïd te verwijderen met ijsazijn in de koude. $P \% = 0,09$; $N \% = 0,03$.

Tabel 5.

No.	Onderzochte stof	P%	N%	P: N
1	L.-P.-natriumzout	0,26	0,33	1: 2,8
2	vrij L.-P.-zuur	0,24	0,11	1: 1,0
3	L. uit azijnzuur bij 90° C	0,81	4,08	1: 2,4
4	L. uit buffer bij 18° C	1,24	0,62	1: 1,1
5	L. uit buffer bij 90° C	1,48	3,47	1: 5,2
6	L. uit ijsazijn bij 18° C	2 58	1,32	1: 1,2
7	Lecithine zuiver	3,23	1,55	1: 1,0
8	Phosphatide van Bleyer	2,2	1,0	1: 1,0
9	vrij P.-zuur uit azijnzuur 90° C	0,25	0,03	
10	vrij P.-zuur uit buffer	0,15		
11	vrij P.-zuur uit ijsazijn	0,68	0,62	
12	P.-natriumzout uit ijsazijn	0,09	0,03	

Overzicht van de gedane P- en N-bepalingen.

D. Conclusies uit de P- en N-bepalingen.

Naar aanleiding van onze bepalingen konden wij de volgende conclusie's trekken:

- 1ste Een phosphatide van de Lecithine-Kephalline-groep is aanwezig in de specifieke kapselstof van *B. pneumoniae* type A. (Zie No. 2, 4 en 6).
- 2de Het phosphatide ontleedt in de warmte, waarbij de phosphor- en stikstofverbindingen gedeeltelijk vrij komen. Deze zijn verantwoordelijk voor de te hoge percentages in No. 3 en 5.
- 3de Ons lipoid-polysaccharide-natriumzout heeft een te hoog stikstofpercentage, zoodat wij ondanks de negatieve eiwitreacties, niet met zekerheid kunnen beweren dat wij een eiwitvrije stof in handen hebben gekregen. (Zie No. 1).
- 4de Het phosphatide kan zuiver worden afgescheiden met ijsazijn; de P % en N % komen mooi overeen met die van lecithine of met die van een phosphatide van Bleyer. (Zie No. 6, 7 en 8).
- 5de Het zuiverste phosphatide zal kunnen worden afgescheiden door eerst het vrije L.-P.-zuur te maken en dit daarna met ijsazijn in de koude te behandelen. Het iets te hoge percentage N in No. 6 moet veroorzaakt zijn door een onzuiverheid in het lipoid-polysaccharide-natriumzout.

4. EIGENSCHAPPEN VAN HET LIPOID-COMPLEX UIT HET L.-P.

Bereiding van het lipoid.

Het lipoid-complex dat het eerst bereid werd, door een oplossing van het L.-P.-natriumzout in in azijnzuur op het waterbad te verhitten, trachtten wij te zuiveren door er een loodverbinding van te maken. Hiertoe werd het lipoid opgelost in 0,1n NaOH en na filtratie direct met enkele druppels azijnzuur op een p_{H} van 6,0 gebracht. Daarna voegden we een geringe overmaat van een verzadigde loodacetaat-oplossing toe. Het neerslag werd na een nacht staan afgecentrifugeerd en goed uitgewassen. Het lipoid-loodzout kon in vacuo gedroogd worden en was toen een lichtgeel poeder.

Tabel 6.

Ingewogen stof	cm ³ 0,01 n HCl	N%	Ingewogen stof	Blauww. -blanco	mg P	P%	P : N
4,84mg	0,665	1,92	5,31mg	1,0	0,040	0,75	1 : 5,7
4,50mg	0,572	1,78	6,20mg	1,1	0,043	0,70	1 : 5,6

P.- en N-bepalingen van een lipoid-loodzout.

Inplaats van een te verwachten verhooging der percentages P en N, zien wij een sterke daling van het phosphor-gehalte. Tevens vinden wij evenals Bleyer en Diemair (1931) de onderling sterk wisselende percentages N en P, die volgens deze schrijvers te wijten zou zijn aan resten Pb(OH)₂ in het neerslag. Er trad in elk geval een storing op waardoor onze poging, om het ruwe lipoid door middel van het loodzout te zuiveren, dus niet het gewenschte resultaat opleverde.

Het lipoidcomplex werd later bereid volgens de methode, die berust op de 5de conclusie van de vorige bladzijde. Hiertoe werd uit 10 g specifieke stof, na bereiding van het vrije lipoid-polysaccharide-zuur, een fractie afgescheiden, die het lipoid moest bevatten. Na de aceton droogmethode te hebben toegepast, kregen wij echter een bijna wit amorph poeder in handen.

Deze stof was onoplosbaar in alcohol, aether, petroleum-aether, benzol, chloroform en aceton. In warm water loste de stof onder ontleding een weinig op, terwijl het lipoid in verdunde loog bijna volledig oplosbaar was.

Reacties op het Lipoid-complex.

De eiwitreactie van Millon, de biureet- en xanthoproteïne-reactie zijn negatief; op aminozuren zijn de ninhydrine reactie evenals de kleurreactie van Folin met β -naphtochinonsulfon-zuur negatief, terwijl ook de reactie op tryptofaan van Hopkins-Cole-Winkler negatief is.

Elementair analyses.

Het stikstofgehalte werd door ons zelf bepaald volgens ter

Meulen en Heslinga, en gaf een gemiddelde van 1,6 %, terwijl de gemiddelde phosphorbepalingen 3,2 % opleyden.

De P : N-verhouding van het lipoid is dus 1 : 1,1. In deze stof vonden wij hogere P- en N-percentages, doordat het lipoid niet direct uit het L.-P.-natriumzout maar door middel van het vrije L.-P.-zuur werd afgescheiden. Ook uit de P : N-verhouding bleek dus, dat er een beter resultaat verkregen was.

Diemair en Weiss (1939) konden volgens de methode van Peters en van Slyke (1932) uit het percentage aminostikstof en het totale stikstofgehalte de kephaline- en lecithine-percentages berekenen. Het is echter bij hoogmoleculaire gemengde lipoidcomplexen moeilijk, om volgens deze methode het aminostikstofgehalte van het in het phosphatide aanwezige colamine te bepalen. Door het geringe stikstofgehalte en de slechte verdeling van het in water gesuspendeerde materiaal kloppen de bepalingen over het algemeen slecht.

Daar ons ervaring en tijd ontbrak om met het complete originele „van Slyke”-toestel te experimenteren, waren wij tevreden met de resultaten, die in Amsterdam met het vereenvoudigde „van Slyke”-toestel voor ons bereikt werden. De eerste bepalingen vielen daar echter veel te hoog uit, doordat het lipoidcomplex bij het oplossen in loog, nog geruimen tijd luchtbelletjes afgaf. Nadat de oplossingen van de stof in loog vóór de bepaling in hoogvacuum hadden gestaan, bleek het percentage $N_{NH_2} = 1,1$ te zijn.

Uit het totale N-percentage van 1,6 berekenden wij dus voor het lipoidcomplex 72 % kephaline en 28 % lecithine. Gezien de moeilijkheden bij de aminostikstof-bepalingen, hechtten wij hier echter niet veel waarde aan; temeer daar de stof asch bevatte moet het kephaline-gehalte nog hoger zijn.

Het lipoid bevatte verder 42,6 % koolstof en 6,8 % waterstof, benevens asch.

Zuurhydrolyse.

Ongeveer 50 mg lipoid werd drie uur met 10 %-ig HCl boven de vrije vlam gekookt. De oplossing was toen lichtgeel en werd, na drie keer uitschudden met aether om de vetzuren op te lossen, ingedampt.

In het residu werd gereageerd op glycerine volgens Muliken met pyrogallol en zwavelzuur, evenals volgens Denigès met codeïne; beide reacties waren positief. Na neutralisatie van de zoutzure oplossing was de reactie met het alkaloid-reagens van Bouchardat positief, hetgeen op choline wijst.

Het indampen van de aetherische oplossing leverde een vet-tige stof op, die zuur reageerde op lakmoes, en met loog een troebele vloeistof gaf, die bij schudden sterk schuimde. Dit wijst op de aanwezigheid van vetzuren.

Zuivering van het lipoid.

Ongeveer 50 mg lipoid losten we op in 5cc 0,1n NaOH waarbij wij het neerslag afcentrifugeerden en dit nog twee keer met 0,1n loog uitwaschten.

Dit onoplosbare deel woog ongeveer 0,5 mg en loste maar gedeeltelijk in 2n HCl op. De helft hiervan gebruikten wij om op calcium te reageren in azijnzuurmilieu met ammonium-oxalaat. Er ontstond een neerslag na verwarmen, dat in verdund zoutzuur oploste. Uit de asch van het oorspronkelijke lipoid konden wij de calciumreactie duidelijk bevestigen. De andere helft gebruikten wij om met natriumphosfaat te reageren op magnesium, waarbij geen neerslag te zien was. Het lipoid is dus niet vrij in onze handen gekomen, maar gebonden aan calcium; nu kunnen wij de onoplosbaarheid van het lipoid in organische oplosmiddelen ook beter begrijpen.

De vereenigde 0,1n-loogoplossingen werden met een dubbel volume ijsazijn weggezet; het lipoid sloeg hiermee niet neer. De ijsazijnoplossing kon in vacuo bij 30° C tot een klein volume worden ingedampt; na neutralisatie met 0,1n NaOH en aanzuren met 0,1n HCl werd de oplossing drie keer met aether uitgeschud. Na de aetherische oplossing te hebben gewasschen, gedroogd en in vacuo te hebben ingedampt, ontstond aan de invoercapillair een kleine hoeveelheid witte amorphe slijmerige stof. Aan de lucht was deze stof binnen tien minuten door waterdamp vervloeid, dit komt mooi overeen met het gedrag der zuivere phosphatiden. Nadat het lipoid opnieuw in eenige druppels aether opgenomen en in een vacuum-exsiccator gedroogd was, bleef een witte kleverige stof over. De opbrengst was

5. Eigenschappen van het polysaccharide-complex uit het L.-P. 49

echter slechts 4 mg, en werd voor de phosphor- en stikstofbepalingen gebruikt. Het percentage P is 3,00 en dat van N is 1,47; dus $P:N = 1:1,1$.

Er werd nog een aparte proef gedaan op het lipoïdcomplex voor het aantoonen van glyceriden. Hiertoe losten wij de stof op in 1n loog, voegden een druppel kopersulfaatoplossing toe en filtreerden door een propje asbest. Het filtraat gaf met ferrocyaanalium na aanzuren met azijnzuur het bruine neerslag van het koperzout. Een meerwaardige alcohol is dus aanwezig, in dit geval glycerine.

In een aparte proef werd ook uitgemaakt, dat de reactie op cholesterine van Liebermann-Storch-Morawski negatief was.

Samenvatting:

1. De specifieke stof van *B. pneumoniae* type A bevat een phosphatide van de *Lecithine-Kephaline*-groep ($P:N = 1:1,1$).
2. Uit het gehalte aan amino-stikstof kunnen wij berekenen, dat het phosphatide *méer* dan 72% kephaline moet bevatten.
3. In het phosphatide zijn glycerine, choline en vetzuren aanwezig, maar géén cholesterine.
4. De analyse geeft $\%C = 42,6$; $\%H = 6,8$; $\%N = 1,6$; $\%P = 3,2$; benevens asch van het calcium.
5. Het phosphatide is *onoplosbaar* in de gebruikelijke organische oplosmiddelen en komt niet vrij, doch aan *calcium* gebonden voor.
6. Het is mogelijk om van het phosphatide een gedeelte af te splitsen dat wél oplosbaar is in aether, en waarvan de $P:N$ -verhouding eveneens 1:1 bedraagt.

5. EIGENSCHAPPEN VAN HET POLYSACCHARIDE-COMPLEX UIT HET L.-P.

Reeds eerder vermeldden wij de methode voor de isolatie van het polysaccharide-natriumzout en de omzetting hiervan in het vrije zuur (blz. 43).

De bepaling van het zuuræquivalent.

Het zuuræquivalent bepaalden wij door een afgewogen hoe-

veelheid zuur op te lossen in gedestilleerd water en te titreeren met 0,1n NaOH met phenolphthaleïne als indicator. Het zuur-aequivalent wordt dan berekend uit:

Aeq. Getal = $\frac{\text{mg}}{\text{cm}^3 \text{ 1n NaOH}}$ en was voor het vrije polysaccharidezuur 625.

De bepaling van de p_H.

De p_H-bepalingen werden uitgevoerd t.o.v. standaard-buffer-oplossingen van een bekende p_H, door middel van een geschikte kleurindicator. Een 1 %-oplossing van het vrije P.-zuur had een p_H van 4,2.

De bepaling van het optisch draaiingsvermogen.

Het optisch draaiingsvermogen van het vrije polysaccharidezuur kon met nauwkeurigheid bepaald worden. In verband met metingen van andere onderzoekers en met die, door ons gedaan met het vrije L.-P.-zuur, namen we toch een 0,5 %-oplossing hiervoor. De $[\alpha]_D$ bleek -90° te zijn.

Het aschgehalte.

Voor de bepaling van het aschgehalte werd de stof ongeveer 20 minuten in een platina kroesje met deksel zóó verhit, dat alleen de bodem in een zuurstofrijke vlam er roodgloeiend uitzag. Ingewogen werd ongeveer 15 mg stof per bepaling, die op een micro-balans kon worden afgewogen.

Het aschgehalte van het polysaccharide-natriumzout, dat ongeveer 10 % was, daalde na één HCl-behandeling tot 3,5 %; na 3 keer met HCl behandeld te hebben, was het aschgehalte van het vrije zuur 0,0 % geworden.

Koolstof- en waterstof-gehalte.

Deze bepalingen werden uitgevoerd door den heer P. J. H u b e r s te Amsterdam, evenals de aminostikstof-bepalingen. Het polysaccharidevrije-zuur bevatte 44,1 % C en 6,2 % H.

Stikstof- en phosphor-gehalte.

Deze bepalingen werden op de reeds eerder beschreven wijze verricht en gaven voor het P.-vrije zuur 0,0 % N en 0,1 % P.

5. Eigenschappen van het polysaccharide-complex uit het L.-P. 51

Een vergelijking tusschen de eigenschappen, die in Amerika en die hier in Utrecht zijn gevonden, vindt men in de volgende tabel.

Tabel 7

	Bottema L.-P. zuur F10 type C	Bottema P. zuur F10 type C	Goebel P. zuur type C	Goebel P. zuur type A	Alsche P. zuur F23 type A	Alsche L.-P. zuur F23 type A
[α] _D	+108°	+118°	+100°	-100°	-90°	-100°
zuuraeq.	590	996	620*	430	625	410
% asch	0,3	0,0	0,0*	0,0	0,0	0,1
% C	44,7	41,6	45,0*	43,9	44,1	41,1
% H	5,9	6,3	5,8*	6,0	6,2	6,7
% N	0,3	0,0	0,0*	0,0	0,0	0,1
% P	+	—			0,1	0,2

Kenmerkende gegevens van de specifieke stoffen uit het A- en C-type van *B. pneumoniae* volgens Goebel (Amerika) en Bottema en Alsche (Utrecht).

Wij zien dus aanmerkelijke verschillen tusschen de onderzoeken; over het algemeen lijken de eigenschappen van de L.-P.-zuren uit Utrecht het meeste op die van de P.-zuren uit Amerika.

Er kan in dit verband nog worden opgemerkt, dat wij C- en H-bepalingen lieten doen van een P.-zuur, geïsoleerd na verwijdering van het lipoid in 1n-azijnzuur op het waterbad. Deze zelfde methode werd indertijd door Bottema gebruikt en gaf bij hem voor het P.-zuur t.o.v. het L.-P.-zuur van het C-type een verlaging te zien van het C-percentage (van 44,7 tot 41,6) en een verhooging van het H-percentage (van 5,9 tot 6,3). Ook wij vonden voor dit P.-zuur t.o.v. het L.-P.-zuur van het A-type een verlaging van het C-percentage (van 41,1 tot 40,5) en een verhooging van het H-percentage (van 6,6 tot 6,9).

Na verwijdering van het lipoid met ijsazijn kregen wij daarentegen voor het P.-zuur t.o.v. het L.-P.-zuur een verhoging te zien van het C-percentage (van 41,1 tot 44,1) en een verlaging van het H-percentage (van 6,6 tot 6,2).

*) Deze waarden zijn overgenomen uit de publicaties van Lévy-Bruhlen Courtois (1940).

De laatste waarden van de C- en H-percentages voor het P-zuur uit ijszijn kloppen met die welke door G o e b e l gevonden zijn.

Acetylgroepen.

0,5 gram polysaccharide-natriumzout werd opgelost in 50 cm³ water, en met 5 cm³ 4n loog vier uur onder terugvloei-coeling op een kokend waterbad verwarmd. Na aanzuren van de oplossing met 4n zwavelzuur werd afgedestilleerd tot een klein volume. Bij toevoeging van 5 cm³ water en daarna opnieuw afdestilleeren, vertoonden de verzamelde destillaten een zure reactie op lakmoes. Door met alcohol en zwavelzuur te koken, kon echter geen esterlucht worden waargenomen noch gaf het met MgO ingedampde destillaat, na filtratie, een reactie met natrium-uranylpropionaat. Ondanks dat het destillaat zuur was, mogen wij dus niet besluiten, dat er acetylgroepen in het polysaccharide aanwezig zijn.

Daar de reactie van T o l l e n s op alduronzuren bij het destillaat sterk positief was, moeten wij aannemen, dat de uronzuren uit ons polysaccharide met waterdamp vluchtig zijn.

Hydrolyse met zwavelzuur.

Het hydrolyseeren van het polysaccharide geschiedde door een 1%-oplossing hiervan in 1n zwavelzuur op een kokend waterbad te verwarmen, totdat geen toename meer van het reduceerend vermogen viel waar te nemen. Dit werd gecontroleerd door ieder uur een beetje van de oplossing te nemen en hiervan het reduceerend vermogen te bepalen volgens F o l i n en W u (beschreven in de meeste handboeken voor pathologische chemie).

Deze suikerbepaling verkozen wij boven die van H a g e d o r n en J e n s e n, omdat de laatste methode veel reagentia vergt die kunnen bederven, terwijl ook de titer van de natriumthiosulfaat-oplossing na verloop van eenigen tijd moet worden bijgesteld.

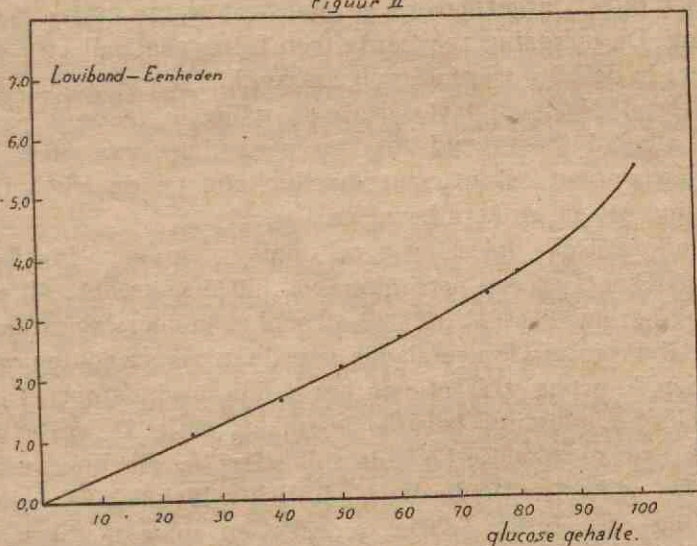
Het voordeel van de glucosebepaling van F o l i n en W u is tevens dat de blauwwaarde gemakkelijk kan worden vastgelegd met de Lovibond-tintometer. In plaats van 0,1 cm³ van een 1%-oplossing, beschouwden wij 5 cm³ van een 0,01%-glucoseoplossing als standaard 100. Deze hoeveelheid werd 6 minuten met

2 cm³ Folin's koperreagens in het waterbad verhit, en na afkoelen met 1,5 cm³ phosphormolybdeen-zuur gemengd. Na even schudden werd direct in een 50 cm³ maatkolf gespoeld en de blauwwaarde bepaald. Wij verkregen zoo:

voor de standaard 100 een gem. blauwwaarde van 5,5 Lo.E.

„	„	„	80	„	„	„	„	3,8	„
„	„	„	75	„	„	„	„	3,4	„
„	„	„	60	„	„	„	„	2,7	„
„	„	„	50	„	„	„	„	2,2	„
„	„	„	40	„	„	„	„	1,7	„
„	„	„	25	„	„	„	„	1,1	„

Figuur II



Verband tusschen de blauwwaarde bepaald met de Lovibond-tintometer en het reduceerend vermogen van glucose.

Om met behulp van de graphiek het reduceerend vermogen van een 1%-ige onbekende suikeroplossing te kunnen bepalen moeten wij nu 1 cm³ tot 100 verdunnen en hiervan de blauwwaarde per 5 cm³ volgens Folin en Wu vaststellen. De blauwwaarde van het molybdeenblauw neemt zeer snel af en is alleen de eerste paar minuten als juiste maatstaf te beschouwen, zoodat onmiddellijk afgelezen moet worden.

Met deze suikerbepaling vonden wij na 0, 1, 2, 3, 4 en 5 uur een reduceerend vermogen van resp. 8 %, 47 %, 63 %, 64 %, 64 % en 62 %. De hydrolyse was dus na drie uur volledig, zoodat wij ook bij latere proeven steeds 3 uur hydrolyseerden.

In tegenstelling met alle andere onderzoekers van de polysacchariden der *Klebsiellae*, vonden wij al direct een reduceerend vermogen. De *Fehling*-proef op het L.-P.-zout of -zuur en op het P.-zout of -zuur vonden wij namelijk in alle gevallen zwak positief.

Na afloop van de hydrolyse werd bij kooktemperatuur een heete barietwateroplossing toegedruppeld, totdat eenige druppels een sterke geelkleuring veroorzaakten. Den volgenden dag kon het BaSO_4 afgefiltreerd en met heet water uitgewasschen worden. De oplossing reageerde toen bijna neutraal op Congo-papier; in de hitte werd vervolgens een kleine overmaat BaCO_3 toegevoegd. Na indampen van de oplossing in vacuo tot 5 cm^3 , werd alcohol toegevoegd tot een percentage van 80 %. Het neerslag zou nu het uronzure-barium zijn en de alcoholische oplossing zou de suikers bevatten.

De alcoholische oplossing werd opnieuw in vacuo ingedampt en met alcohol op een percentage van 80 % gebracht; dit werd zoolang herhaald totdat in 80 % alcohol geen neerslag meer ontstond. De vereenigde neerslagen van de uronzure zouten vormden toen de uronzuurfractie en het residu, na indampen van de alcoholische oplossing, bevatte de suikerfractie. De verhouding van de uronzuurfractie t.o.v. de suikerfractie was ongeveer als 4:5. De suikerfractie bestond uit lichtgele kristallen, die in oplossing een sterke *Fehling*-reductie en soms nog een zéér zwakke alduronzuur-reactie van *Tollens* vertoonden; terwijl de uronzuurfractie een zwakke *Fehling*-reductie en een sterke reactie van *Tollens* te zien gaf.

De uronzuurfractie.

De uronzuurfractie bleek in drie deelen gesplitst te kunnen worden:

- a) een deel dat slecht oplosbaar was in water, het red. verm. was 8% t.o.v. glucose.
- b) een klein deel dat onoplosbaar was in 32 % alcohol; het red. verm. was 35 %.

- c) het grootste deel was oplosbaar in 32%, sloeg met 80% alcohol neer en een red. verm. had van 55%.

Alleen door het laatste deel op te nemen in weinig water en met alcohol aan te vullen tot een percentage van 90 %, sloeg het zuivere uronzure-bariumzout neer. Uit het verlies van bijna 20% bij het opnieuw neerslaan van het bariumzout bleek, dat dit zout zelfs in 90% alcohol gedeeltelijk oploste. Dit uronzure-barium is een zeer sterk hygroskopische, witte kristallijne stof.

Het vrije uronzuur kon bereid worden door een waterige oplossing van het barium-zout met basisch loodacetaat te behandelen. Daarna werd het neerslag goed uitgewassen, gesuspenderd in water en met H_2S verzadigd. Door de oplossing met norit te behandelen en in vacuo in te dampen, verkregen wij na droging mooie, bijna kleurloze kristallen van het uronzuur. Uittrekken met 96% alcohol bij $30^\circ C$ gaf een witte kristallijne stof, waarvan het smeltpunt door ontleding niet te bepalen was.

Analyse van het vrije uronzuur.

Het uronzuur was niet heelemaal aschvrij, zoodat de koolstof- en waterstof-bepalingen iets te laag uitvielen voor een glucuronzuur-glucose, zooals door Goebel werd voorgesteld. Wij vonden een C-percentage van 38,9 en een H-percentage van 5,5 (theoretisch % C = 40,4; % H = 5,6).

De $[\alpha]_D$ werd bepaald op -63° , bij een $c = 0,5$; (Goebel vond -54°). Het zuuraequivalent was 292 (Goebel 354) en het reduceerend vermogen slechts 25% (Goebel 50%). Verder werden eenige kleurreacties gedaan, die later beschreven zullen worden.

Hydrolyse van het alduronzuur om de suikerhelft af te splitsen, door 15 uur te koken met $1n H_2SO_4$, leverde niets bruikbaar op.

De poging om *glucose* aan te toonen als component van het uronzuur, door met behulp van salpeterzuur het suikerzure kaliumzout uit het glucose-deel te maken, is niet gelukt; dit was trouwens bij dezelfde behandeling van de suikerfractie of van het geheele polysaccharide-complex, na sterke hydrolyse door 10 uur te koken in $4n$ zwavelzuur-oplossing, eveneens het geval.

De suikerfractie.

De suikerfractie werd drie keer met warme absolute alcohol uitgetrokken. Hierdoor kregen we een in absolute alcohol oplosbaar deel A_1 en een in absolute alcohol onoplosbaar deel A_2 .

Onderzoek van het in absolute alcohol onoplosbare deel A_2 .

Deze lichtgele stof bevatte slechts ongeveer 5% van de geheele suikerfractie, zoodat wij maar enkele eigenschappen konden bepalen. Het reduceerend vermogen was 42% (Goebel 40%), en de $[\alpha]_D$ ongeveer -30° . Een phenylosazon kon gevormd worden en deze stof was oplosbaar in aceton. Het osazon ontleedde echter tijdens het omkristalliseeren.

De resultaten van de kleurreacties, die wij deden op de verschillende onderdeelen van het polysaccharide en die o.a. te vinden zijn in het handboek voor organische analyse II van N. Schoorl, hebben wij in tabel 8 bijeengebracht. Bij de kleurreactie van Ihl-Pechmann duidt een blauwkleuring van de amyalkohol op fructose en een groenkleuring op pentosen. De kleurreactie van Foulger geeft alléén blauw voor fructose, saccharose en inuline. De orcine-reactie van Bial is positief voor pentosen, rhamnose, fructose en alduronzuren. Tenslotte duidt bij de naphtoresorcine kleurreactie van Tollens een paarskleuring in benzol alléén op alduronzuren.

Tabel 8.

Onderzochte stof	Fehling	Tollens	Foulger	Ihl-Pechmann	Bial (orcine)
Alduronz. fractie	zwak +	paars		—	+
Suikerfractie	sterk +	bruin		—	
Vrij Alduronzuur		donkerpaars		—	+++
Abs. A. opl. suikers		bruin	+	groenblauw	++
Abs. A. onopl. suikers		lichtbruin		licht groen	+
Fructose			+	blauw	+
Mannose			—	—	
Glucose			—	—	
Rhamnose				bruingroen	
Xylose		—		licht groen	

Kleurreacties van de polysaccharide-fracties en van enkele monosen.

De T o l l e n s-reactie op de suikerfractie gaf een iets groenachtige troebeling, die met een bruine kleur in aether oploste. Dit is volgens v a n d e r H a a r (1920) een aanwijzing voor fructose.

Onze conclusies uit de kleurreacties zijn, *dat het A₁-deel fructose bevat en waarschijnlijk een pentose, maar geen alduronzuren terwijl het A₂-deel geen fructose, maar wèl de pentose bevat.*

Onderzoek van het in absolute alkohol-oplosbare deel A₁.

De optische draaiing hiervan bleek $-21,7^\circ$ te bedragen. Het reduceerend vermogen was echter in plaats van ongeveer 100% slechts 65%. Deze fractie bevat dus behalve zuivere monosen ook hogere sacchariden.

Bereiding van het Phenylosazon.

100 mg A₁-fractie met 200 mg phenylhydrazinechloride (zuiver) en 300 mg natriumacetaat werden in 5 cm³ water opgelost. Er kwam een lichte troebeling, maar met krassen was ook na een uur nog geen neerslag te zien. In een kokend waterbad verhit kwam na vijftien minuten het osazon er uit. Den volgende dag werd het neerslag afgezogen, met water en daarna met twee druppels alkohol gewassen. Dit osazon kon gescheiden worden in een in aceton oplosbaar en een in aceton onoplosbaar deel.

Het in aceton onoplosbare phenylosazon werd uit 60 %-ige A. omgekristalliseerd. Wij kregen toen gele naalden met een smeltpunt van 200° C, die gemengd met een zelfbereid fructosazon met smeltpunt 202° C géén depressie te zien gaven.

Het in aceton oplosbare phenylosazon sloeg door sterk te verdunnen uit de oplossing neer en kon uit aceton met petroleum-aether worden omgekristalliseerd. Het smeltpunt van deze lichtgele naalden was 172° C (gecorr.).

Gezien de oplosbaarheid van het phenylosazon in aceton en de kleurreacties, is het waarschijnlijk, *dat de suiker uit de A₂-fractie identiek is met de 2de suiker uit de A₁-fractie.*

Bereiding van het α -methyl-phenylhydrazon.

Volgens Neuberg werd deze verbinding gemaakt door 200 mg van de A₁-fractie in 1 cm³ water met 0,44 cm³ 50 % azijnzuur, 0,44 cm³ α -methyl-phenylhydrazine en 3 druppels alcohol te behandelen. Na enkele oogenblikken ontstond een neerslag van een hydrazon. Den volgenden dag kon het neerslag worden uitgewasschen met water en omgekristalliseerd worden uit 30 %-ige alcohol. Het zijn dan lichtgele naaldjes die oplossen in chloroform en weer neerslaan met petroleumaether. Door met norit te behandelen in 30%-ige A. krijgen wij mooie witte naalden met een scherp smeltpunt van 177° C (gecorr.).

Zoowel het smeltpunt van het phenylosazon als van het α -methyl-phenylhydrazon komen overeen met die van fucose. De $[\alpha]_D$ in pyridine van fucose- α -methyl-phenylhydrazon is volgens de literatuur 3,6°, indien $c = 2$. Een oplossing van ons hydrazon in pyridine geeft echter een $[\alpha]_D = 34,2^\circ$ bij een concentratie van 1,9; de draaiing is echter moeilijk te bepalen, daar de vloeistof sterk fluoresceert. Aangezien het reduceerend vermogen van de geheele suikerfractie slechts 65% was (t.o.v. glucose) zullen wij hier wel geen monosaccharide in handen hebben gekregen, maar waarschijnlijk een disaccharide.

Het eerste filtraat van het α -methyl-phenylhydrazon werd gedurende vijf minuten in een waterbad verhit, zooals bij de bereiding van een d-fructosazon. Na eenige dagen in de ijskast gestaan te hebben was het neerslag vast geworden en kon na filtratie met een weinig water gewasschen worden. Oplossen in chloroform en neerslaan met petroleumaether gaf een stof met een Smp. = 138° C; na omkristallisatie uit 20%-ige A. met norit was het smeltpunt 143° C geworden. Een mengsmeltpunt van deze stof met een α -methyl-phenyl-d-fructosazon met een smeltpunt 144° C, gaf géén depressie te zien.

Samenvatting:

1. Het polysaccharide van *B. pneumoniae* type A bestaat uit één of meer uronzuren, d-fructose en waarschijnlijk een disaccharide, met pentose-kleurreacties. Een samenstelling dus die analoog is met die, welke G o e b e l voor het A-type

vond, n.l. een aldobionzuur, d-glucose en een disaccharide-zuur-lacton.

2. Het is ons niet gelukt om behalve fructose nog andere suikers te identificeeren, wèl kunnen wij naar aanleiding van de bereiding van het phenylosazon nog opmerken, dat mannose niet aanwezig is, evenmin als galactose, dat anders als slijmzuur bij de oxydatie voor glucose te voorschijn zou zijn gekomen.
3. Wij konden eenige eigenschappen van het uronzuur vaststellen, evenals de smeltpunten van het disaccharide-phenylosazon (172° C) en van het disaccharide- α -methylphenylhydrazon (177° C).
4. G l u c o s e in welke vorm ook is niet aanwezig in ons polysaccharide, daar wij noch uit het oorspronkelijke polysaccharide, noch uit één van haar onderdeelen, een suikerzuur-kaliumzout konden verkrijgen.

Gezien deze totale afwezigheid van glucose in ons polysaccharide was het onmogelijk onze bezwaren (zie blz. 23) tegen de onderzoeken van Goebel en Avery (1927), naar aanleiding waarvan wij een hernieuwd chemisch onderzoek zouden instellen, te weerleggen.

In plaats van deze onderzoeken te kunnen aanvullen en iets bij te dragen tot de opheldering van de samenstelling van het polysaccharide uit het A-type, verkregen wij een geheel ander polysaccharide, waarvan de samenstelling slechts voor een zeer klein gedeelte kon worden bepaald.

Een mogelijke verklaring van deze geheel verschillende polysacchariden zullen wij in de slotbeschouwing geven.

HOOFDSTUK II.

BEREIDING VAN DE SPECIFIEKE STOF UIT
B. PNEUMONIAE TYPE C.A. *De gebruikte stam.*

De door ons gebruikte F10-stam is dezelfde, die *Bottema* bij zijn onderzoekingen over het C-type gebruikte. De eigenschappen in cultureel en morphologisch opzicht waren geheel gelijk gebleven en weken ook niet af van een nieuwe overenting, die wij uit Amsterdam kregen toegestuurd.

B. *De gebruikte voedingsbodem.*

De gebruikte voedingsbodem samengesteld volgens *Bottema*, gaf een opbrengst aan specifieke stof van 1 gram per 50 liter cultuur, in plaats van 3 tot 5 gram.

Een Chamberland L3-filtraat van een cultuur, die één dag bij 37° C bebroed was, gaf met anti-C-serum, verdunning 1:5, een positieve precipitatie-titer tot slechts 1/8. Deze precipitatie-titer was 10 keer zoo klein als die door *Bottema* gevonden werd. Dit kwam hoofdzakelijk, doordat de stam op dat moment minder specifieke stof produceerde.

Ter bevordering der productie van de hoeveelheid specifieke stof werd de groei nu nagegaan op voedingsbodems met toevoeging van ½ % van verschillende suikers. Er moet hier nog opgemerkt worden, dat de F10-stam niet groeit op de voedingsbodem, die wij voor de F23-stam van het A-type samenstelden. De groei van de F10-stam werd dus nagegaan door aan de synthetische voedingsbodem van *Bottema* toe te voegen: d-galactose, d-fructose, d-sorbit, lactose, dulciet, mannose, raffinose of glycerine.

Alleen bij glycerine-toevoeging was, na twee dagen broeden bij 37° C, een sterke groei waar te nemen. Een Chamberland L3-filtraat van een cultuur, die één dag bebroed was bij 37° C, gaf met anti-C-serum, verdunning 1:5, nu een positieve precipitatie-reactie tot 1:32 verdunning. Hoewel de groei zeer snel

was, bleef de opbrengst aan specifieke stof per 50 liter nog ver beneden het gewenschte; deze was slechts 1,5 gram.

Daarna werd de invloed van sporen cystine op de groei van de F10-stam nagegaan. Evenals bij de F23-stam konden wij hiermee een belangrijke verbetering van de groei bij de F10-stam bewerkstelligen. De volgende synthetische voedingsbodem werd sindsdien door ons gebruikt:

- 5 g d-glutaminezuur
- 2 g sec. kaliumphosfaat
- 9 g natriumcarbonaat. 10 aq.
- 5 g NaCl
- 6 cm³ 80 % ammoniumlactaat
- 10 mg cystine
- 1 mg *Saccharomyces cervisiae*

De stoffen werden opgelost in 1 liter leidingwater en met verdund zwavelzuur op een p_H van 7,4 gebracht. Na steriliseeren op 110° gedurende een half uur, kon de voedingsbodem direct gebruikt worden, daar het ontstane neerslag, na bezinking, geen merkbaren invloed op de groei had. Per 50 liter kultuur konden nu resp. 3 en 2,5 gram eiwitvrije specifieke stof worden verkregen, hetgeen echter nog zeer weinig was in verhouding tot de opbrengst aan specifieke stof uit de F23-stam van het A-type.

C. *De opwerkings-methode.*

De opwerkings-methode was geheel dezelfde als bij de F23-stam. Door de ingedampde kulturen aan te zuren met ijsazijn tot een p_H van 4,2, onstond echter een zwaar neerslag van eiwit en phosphorzouten. Na één nacht staan kon de alcoholische oplossing niet afgeschonken worden, maar moesten wij het neerslag door centrifugeeren verwijderen. Hierbij kregen wij evenals B o t t e m a twee vaste lagen, die gedeeltelijk gemengd waren en daarom gezamenlijk opgewerkt werden. Door eenige malen de specifieke stof in het buffermengsel op te lossen en neer te slaan met alcohol, konden wij zeer veel eiwit verwijderen. Het alcoholpercentage dat noodig was om de stof neer te slaan liep hier niet omhoog, zooals bij de specifieke stof uit de F23-stam, maar bleef constant op 45. Door de

onteiwittingsmethode van Sevag toe te passen verwijderden wij de laatste sporen eiwit. Het lipoid-polysaccharide-natriumzout kregen wij vervolgens door de stof in gedestilleerd water op te lossen en bij een alcoholpercentage van 72 neer te slaan. Na toepassing van de aceton-droogmethode had deze stof de volgende eigenschappen: de eiwitreacties waren negatief (Millon-, ninhydrine-, biureet-), de polysaccharide-reactie van Molish was sterk positief, het N-percentage was ongeveer 0,4 en de phosphorreactie zwak positief. De optische draaiing was door opalescentie niet te bepalen. De precipitatie-titer werd bepaald op 1:3.000.000.

D. *De verhooging van de pathogeniteit.*

Vanwege de geringe opbrengst aan specifieke stof, ondanks de eenigszins verbeterde voedingsbodem, trachtten wij door pathogeniteitsverhoging een vergroting van de hoeveelheid kapselstof te bewerkstelligen. De pathogeniteit van de F10-stam was erg verminderd, en een witte muis, subcutaan ingespoten met 0,2 cm³ van een afgeslibde schuine agar-kultuur, stierf niet eens aan de gevolgen. Ondanks dat wij de F10-stam eenige muispassages lieten ondergaan, was de pathogeniteit er niet beter op geworden. Het lag voor de hand, om op grond van het verlies aan pathogeniteit, een verandering van de serologische eigenschappen aan te nemen.

Door deze verandering van de F10-stam, zijn wij niet in staat geweest om voldoende specifieke stof te isoleren voor een uitgebreid chemisch onderzoek van het lipoidcomplex.

E. *De scheiding van het L.-P. in lipoid en polysaccharide.*

Als eerste scheidingsmethode voor het L.-P. gebruikten we die met azijnzuur op het kokende waterbad. Een 1%-oplossing van de specifieke stof in gedestilleerd water werd met azijnzuur gebracht tot 0,15 normaal en gedurende 1 uur verhit. Het vlok-kige neerslag kon worden opgelost in 0,1n NaOH en met azijnzuur weer worden neergeslagen. Dit lipoid was goed oplosbaar in alcohol, aether en chloroform, echter niet in aceton. Indampen in vacuo van de alcoholische oplossing gaf per gram specifieke stof ongeveer 150 mg ruw lipoid.

Het aschgehalte van dit lipoid was ook zeer gering; er kon geen calcium in worden aangetoond.

De oplossing van het polysaccharide, dus die waaruit het lipoid was neergeslagen, gaf tot in 80 % alcoholische oplossing géén neerslag. Bij neutraliseeren met loog, verscheen echter wel een neerslag, dat na behandeling met HCl en alcohol het vrije polysaccharidezuur opleverde.

Als tweede scheidingsmethode gebruikten wij die met ijszijn in de koude, zooals reeds eerder bij de F23-stam beschreven werd. (Zie blz. 42). Hierbij kregen we uit de polysaccharide-oplossing, dus die waaruit het lipoid verwijderd was, met alcohol het polysaccharide-natriumzout waarvan als N-percentage 0,0 en als P-percentage 0,2 werd gevonden. Dit zout gebruikten wij voor onze immuniteitsproeven.

De meest treffende verschillen in algemeene samenstelling tusschen de specifieke stoffen uit het A-type en C-type zijn:

1ste Het Lipoid-Polysaccharide-Eiwitcomplex van het A-type bestaat uit weinig eiwit, weinig lipoiden en veel polysaccharide; dat van het C-type uit veel eiwit, veel lipoiden en weinig polysaccharide.

2de Het lipoidcomplex van het A-type is onoplosbaar in organische oplosmiddelen en is aan calcium gebonden, terwijl dat van het C-type goed oplosbaar is in organische oplosmiddelen en geen calcium gebonden heeft.

Of ondanks deze algemeene eigenschappen de lipoidcomplexen van het A-type en C-type in chemische samenstelling verschillen, blijft nog een open vraag.

Voor onze immuniteitsproeven bereidden wij ook nog het polysaccharide-natriumzout van de *B. pneumoniae* type A uit een F15-stam. De methode was geheel gelijk aan die voor de F23-stam, alleen was de opbrengst nog beter. Het N-percentage hiervan was 0,0 en het P-percentage 0,1.

IMMUNITEITS-PROEVEN.

INLEIDING.

Zoals wij reeds eerder in ons hoofdstuk „Het probleem” beschreven, is het onze bedoeling om dieper door te dringen in de antigeniteit van de kapselstof der *B. pneumoniae*.

Het begrip antigeniteit was al sinds lang bekend en onwillekeurig dacht men hierbij direct aan eiwitten. Iedere scheikundige stof, mits een eiwit of gebonden aan een eiwit, is immers in staat antistoffen op te wekken.

Zoowel de onderzoekers Lévy-Bruhl en Courtois als Bottema vonden echter een volledige antigeniteit voor proteïde-vrije lipoïd-polysaccharide-complexen der *B. pneumoniae*, terwijl Boivin en medewerkers deze antigeniteit reeds eerder bij *Salmonella*-soorten en andere bacteriën opmerkten.

Dus niet alleen eiwitten zijn volwaardige antigenen, maar ook lipoïd-polysacchariden kunnen als zoodanig werkzaam zijn. Bovenstaande schrijvers baseerden hun stelling op het feit, dat door het lipoïd-polysaccharide antistoffen in het bloed van het proefdier worden opgewekt, die zij met precipitatie-reacties konden aantonen.

Hoewel de resultaten van deze onderzoekingen zeer overtuigend waren, kòn of wilde men over het algemeen deze nieuwe theorie niet aanvaarden. Ze strookte in menig opzicht niet met de algemeene immunitetsleer.

Men maakte zich er van af, door te veronderstellen, dat het stikstofgehalte, dat men bij de lipoïd-polysacchariden vond, afkomstig moest zijn van eiwitten, die dan aansprakelijk zouden zijn voor de antigeniteit dezer lipoïd-polysacchariden. Een tweede bedenking tegen deze antigeniteit is, dat sommige van die stoffen voor het eene dier wèl en voor het andere dier nièt antigeen zijn. Hierdoor krijgt men wel een zeer onduidelijk beeld van de antigeniteit der lipoïd-polysacchariden hetgeen echter niet te vermijden is, aangezien iedere diersoort nu eenmaal op eigen wijze zich zal kunnen verwerven tegen deze vreemde stoffen.

Wij stelden het ons tot taak om langs chemische weg lipöïd-polysacchariden en polysacchariden te bereiden, *die chemisch en analytisch eiwitvrij waren*, en slaagden er in uit de P:N-verhouding van 1:1 te bewijzen, dat het door ons verkregen L.-P. inderdaad geen eiwit meer bevatte.

Als proefdier kozen wij uitsluitend de witte muis, daar deze het voordeel heeft gevoelig te zijn en snel te reageeren, en het mogelijk maakt tegelijkertijd meerdere proeven in te zetten. Het nadeel van de kleine muis, o.a. gelegen in de geringe hoeveelheid bloed, die zij kan opleveren, trachtten wij te ondervangen door de precipitaties als semi-micro-reacties uit te voeren.

Zéér tot onze spijt waren wij door de tijdsomstandigheden toch gedwongen om het aantal proefdieren te beperken, zoodat onze immuniteitsproeven hoofdzakelijk tot het A-type beperkt bleven.

Voor onze antigeniteits-proeven maakten wij in de eerste plaats gebruik van precipitatie-reacties. Andere reacties, zooals de complementbindings-reacties of die, berustend op anaphylactische verschijnselen, werden niet door ons gedaan. De eerste leverden trouwens, volgens de Fransche onderzoekers met het L.-P. verricht, specificiteit voor de bacterie-soort op. De anaphylactische verschijnselen zijn over het algemeen zeer afhankelijk van de diersoort en daarom moeilijk te beoordeelen.

B o t t e m a was op het idee gekomen om de antigeniteit ook door actieve immunisatie te bewijzen. Dat hem dit niet gelukte was voor ons juist een prikkel te meer om deze proeven te herhalen.

Wij zullen trachten om met uitvoeriger proeven niet alleen door de opgewekte precipitinen, maar ook door een actieve immunisatie de antigeniteit van onderdeelen van het kapsel-complex te bewijzen. *Actieve immunisatie is o.i. wel het beste bewijs voor een volledig antigeen vermogen van de stoffen, welke men het dier toedient.*

In het nu volgende gedeelte zullen wij eerst de proeven „in vitro” behandelen, welke verdeeld worden in antigeniteits-proeven en specificiteits-proeven van de lipöïd-polysacchariden en polysacchariden. Hierop zullen de bereiding van het anti-A-serum bij het konijn, de

bepaling van de precipitatie-titer en de absorptie-proeven volgen. Daarna komen de proeven „in vivo”, welke handelen over de toxiciteit van onderdelen van het kapselantigeen en tot slot de actieve (anti-infectieuze) immunisatie door L.-P. en P. preparaten.

1. PROEVEN „IN VITRO”.

A. *De antigeniteits-proeven over het L.-P. en P*

Voor onze antigeniteits-proeven maakten wij gebruik van precipitatie-reacties. Hiertoe werden muizen herhaalde malen ingespoten met een bepaalde hoeveelheid van een preparaat, om dan na een rustpoos van 7 tot 10 dagen gedood te worden. Dit geschiedde door lichtgas, zooals in ons laboratorium gebruikelijk was.

De *precipitatie-reactie* werd daarna als semi-micro-reactie uitgevoerd op de volgende manier:

Uit het hart van een juist gedooide muis werd zooveel mogelijk bloed in een kort uitgetrokken pipet-Pasteur opgezogen en daarna in een klein buisje uitgeblazen. Na een half uur kon de bloedkoek van de wand losgemaakt worden met een fijne uitgegloeide naald. Vervolgens werd na een uur staan gecentrifugeerd en het heldere serum in een fijn uitgetrokken pipet-Pasteur opgezogen. Kleine precipitatiebuisjes van ongeveer 1 cm³ inhoud, werden elk gevuld met 1 druppel serum en 9 druppels physiologische keukenzoutoplossing. Nadat de buisjes even gerold waren kon men de verschillende verdunningen van het precipitinogeen voorzichtig boven op de serumverdunning pipetteeren.

De verdere uitvoering der diverse precipitatie-reacties verschilde van geval tot geval, zoodat wij die bij de volgende proeven steeds apart zullen vermelden.

Als inleidende proef werden vier muizen twee keer, om de vier dagen subcutaan ingespoten met een oplossing van de natriumzouten van het L.-P. F23 en het P. F23, terwijl deze oplossingen voor een deel met 20 % steriel paardenserum gemengd werden. Bij gebrek aan varkensserum kon hiervan in onze proeven eerst later gebruik worden gemaakt.

De precipitatie-titer werd t.o.v. de ingespoten stof bepaald, na de buisjes 1 uur bij 37° C te hebben laten staan. Na één dag

Tabel 9.

Muis	Totale hoeveelheid ingespoten stof	Behandeling na de laatste injectie	Prec. titer t.o.v. ingesp. stof
No 1	3,5 mg L.—P. F23	gedood na 5 dagen	1:5000
No 2	9 mg L.—P. + serum	” ” 5 ”	1:10000
No 3	22 mg P. F23	” ” 5 ”	> 1:2000
No 4	22 mg P. F23 + serum	” ” 9 ”	1:10000
No 5	phys. zout oplossing	” ” 5 ”	—

Iste Precipitatie-titer-bepalingen van het L.-P. en P. F23.

was toen bij kamertemperatuur de witte ring in het grensvlak goed zichtbaar. Bij de blanco proef werd het serum van de muis ingezet t.o.v. het L.-P.

Evenals *Bottema* vonden wij, dat het L.-P.-zout een volwaardig precipitinoëen was en dat soortvreemd serum deze antigeene eigenschap verhoogt. Eveneens was het begrijpelijk, dat het haptëen polysaccharide uit de F23-stam, na serumtoevoëging als een volwaardig antigeen reageerde. Bovendien zagen wij bij *No. 3* die met het zuivere P.-zout werd behandeld, dat ook het serum de hoogste door ons ingezette verdunning van het zuivere P. F23-zout precipiteerde, zoodat tot een nieuwe serie proeven werd besloten.

Hiertoe werden eenige muizen subcutaan ingespotten met het L.-P. en P., wël en niet gemengd met varkensserum. De inspuitingen geschieden weer 2 keer om de vier dagen, terwijl vijf dagen na de laatste injectie de muizen gedood werden. De precipitatie-titer t.o.v. de ingespotten stof werd bepaald, na de buisjes 1 uur bij 37° C te hebben weggezet en dan na 1, 2 en 3 dagen af te lezen. Bij de blanco proef werd het serum van de muis ingezet t.o.v. het P. F23.

Soms ontstond pas na drie dagen een ring, niet op het oorspronkelijke grensvlak maar meer boven in de buis. Dit verschijnsel zou men kunnen verklaren op grond van het *Neisser-Wechsberg* phenomeen. Er werd gebruik gemaakt van het P. F23-natriumzout met %P = 0,1 en %N = 0,0, terwijl het L.-P. een %P = 0,2 en %N = 0,1 bezat.

Tabel 10.

Muis	Totaal ingespoten	Verdunningen der ingespoten stoffen, beoordeeld na 1, 2 en 3 dagen																										
		1 : 2000			1 : 5000			1 : 7000			1 : 10000			1 : 15000			1 : 20000			1 : 50000			blan					
		1 d.	2 d.	3 d.	1 d.	2 d.	3 d.	1 d.	2 d.	3 d.	1 d.	2 d.	3 d.	1 d.	2 d.	3 d.	1 d.	2 d.	3 d.	1 d.	2 d.	3 d.	1 d.	2 d.	3 d.			
No 6	8 mg L.-P.				-	+	+				-	+	+															
No 7	" "				+	+	+				+	+	+	-	-	-												
No 8	" "				-	+	+		+	+				-	-	-												
No 9	6 mg L.-P. + serum				-	-	+				-	+	+				-	-	+	-	-	-						
No 10	6 mg L.-P. + serum				-	-	+				-	-	+				-	-	-	-	-	-						
No 11	20 mg P. F 23	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	±															
No 12	" "	-	-	+	-	+	+	-	-	±	-	-	-															
No 13	" "	-	+	+	-	+	+				-	±	±															
No 14	" "				-	+	+				+	+	+															
No 15	" "				+	+	+				+	+	+															
No 16	" "				-	-	-				-	-	±															
No 17	physiol. zout				-	-	-				-	-	-															

2de Precipitatie-titer-bepalingen van het L.-P. en P. F 23.

De precipitatie-titer van het anti-L.-P. F23-serum was dus 1:10.000 en werd door varkensserum maar weinig verhoogd, terwijl die van het anti-P. F23-serum eveneens bijna 1:10.000 was.

Doordat het polysaccharide uit den F23-stam in staat was precipitinen op te wekken, moet dit zuivere polysaccharide dus ook als een volwaardig antigeen worden beschouwd. Het bezit deze eigenschap dus evenals een proteïde antigeen.

Terwijl wij bij vorige dierproeven steeds precipiteerden t.o.v. de stof, waarmee de muis werd ingespoten, maakten wij bij No. 16 een uitzondering, door hierbij het anti-polysaccharide-A-serum in te zetten met het polysaccharide uit het C-type.

Het uitblijven van de precipitatie-reactie bij muis No. 16 was een verrassend resultaat, later zullen wij hierover meer proefnemingen bespreken.

Er is weinig verschil in precipitinoogen karakter tusschen het L.-P. F23 en het P. F23; wèl werd van deze laatste stof ongeveer drie keer zooveel ingespoten.

Terwijl onze oorspronkelijke gedachten waren, dat het lipoid-polysaccharide de antigeniteit en het polysaccharide hieruit de specificiteit zou bepalen, moesten wij ons nu op het standpunt

stellen, dat het polysaccharide behalve de specificiteit óók de antigeniteit bepaalt.

B. De specificiteits-proeven met het anti-polysaccharide-A-serum.

Naar aanleiding van de bij muis No. 16 gevonden afwezige precipitatie t.o.v. het P. F10 zetten wij een nieuwe reeks proeven in, om de specificiteit van anti-polysaccharide-sera na te gaan.

Hiervoor maakten wij gebruik van de volgende preparaten:

- 1°: P. F23-natriumzout met %N van 0,0 en %P van 0,1.
 2°: P. F15-natriumzout met %N van 0,0 en %P van 0,2.
 3°: P. F10-natriumzout met %N van 0,0 en %P van 0,1.

De eerste twee stoffen waren afkomstig uit stammen van het A-type, terwijl de laatste stof uit een stam van het C-type afkomstig was.

Na twee subcutane injecties om de vier dagen en doden der muizen na vijf dagen rust, kregen wij de volgende resultaten te zien:

Tabel 11.

Muis	Totaal ingespoten	Precip. t.o.v.	Precipitatie-titer na drie dagen beoordeeld					
			1 : 2000	1 : 5000	1 : 7000	1 : 10000	1 : 15000	blanco
No 18	20 mg P. F23	P. F23	+	+	+	±	—	—
No 19	" "	P. F23	—	—	—	—	—	—
No 20	" "	P. F10	—	—	—	—	—	—
No 21	" "	P. F10	—	—	—	—	—	—
No 22	niets	P. F10	—	—	—	—	—	—
No 23	niets	P. F23	—	—	—	—	—	—

Iste Specificiteits-bepalingen van anti-P.-sera na subcutane injecties.

De precipitatie-titer werd evenals den vorigen keer afgelezen na 1 uur broeden op 37° C en 3 dagen staan bij kamertemperatuur.

Omtrent de F23-stam hebben wij, na subcutane injectie, tot nog toe onderzocht:

Muizen ingespoten met L.-P. en geprecipiteerd t.o.v. L.-P.: No. 1, 6, 7, en 8, die alle positief zijn.

Muizen ingespoten met P. F23 en geprecipiteerd t.o.v. P. F23: No. 3, 11, 12, 13, 14, 15, 18 en 19; 7 van de 8 zijn positief; terwijl de twee blanco's No. 17 en 23 t.o.v. P. F23 beiden negatief zijn.

Naar aanleiding van de onderzoeken van Avery en Goebel (1933) over de immuniteit bij het G₁-polysaccharide der pneumococcen, werden eenige veranderingen aangebracht. De Amerikanen vonden een immuniseerende werking van het G₁-polysaccharide voor muizen bij intraperitoneale inspuitingen met 0,75 γ stof om den anderen dag.

In navolging van deze methode werden nu muizen drie keer, om den anderen dag, intraperitoneal ingespoten met enkele gamma's stof, en na 6 dagen rust gedood, om de precipitatietiter te bepalen. De resultaten zijn in tabel 12 bijeen gebracht.

Tabel 12.

Muis	Totaal ingesp.	Prec. titer t. o. v. de ingesp. stof				Blanco	t. o. v. P. F 23	t. o. v. P. F 15	t. o. v. P. F 10
		1:1000	1:1500	1:2000	1:5000		1:1000	1:1000	1:1000
No 24	1,7 γ P. F 23	+	+	+	—	—	+	+	—
No 25	0,8 γ P. F 23	+	+	±	—	—	+	+	—
No 26	1,5 γ P. F 15	+	+	+	—	—	+	+	—
No 27	0,7 γ P. F 15	+	+	+	—	—	+	+	±
No 28	1,5 γ P. F 10	+	±	—	—	—	+	+	+

2de Specificiteits-bepalingen van anti-P.-sera na intraperitoneale injecties.

De precipitatie-titer kon bepaald worden door 0,2 cm³ polysaccharide-oplossing voorzichtig op 0,2 cm³ serum (verd. 1:10) te laten vloeien; na eenige uren staan bij kamertemperatuur kon worden afgelezen. Door de buisjes één uur in de stoof bij 37° C, of een dag bij kamertemperatuur te laten staan, kwam géén zichtbaar precipitaat, of een uitzakken van den eerst gevormden precipitatie-ring.

Wij hebben dus op twee verschillende manieren de precipitatietiter moeten bepalen n.l.:

1°. Bij de subcutane inspuitingen met P. F23 (± 20 mg) kwam het neerslag soms direct, doch meestal pas na 1 uur op 37° C en na twee tot drie dagen staan bij kamertemperatuur.

2°. Bij de intraperitoneale inspuitingen met P. F23 ($\pm 1\gamma$), kwam direct of na enkele uren bij gewone temperatuur het neerslag; bij 37° C werd het precipitaat onzichtbaar.

In het eerste geval (titer 1:10.000) hadden wij weinig antigeen en veel precipitinen, zoodat het serum eerst door de oplossing der specifieke stof moest diffundeeren vóórdat de juiste verhouding ontstond, die noodig was om een precipitaat te vormen.

In het tweede geval (titer 1:2000) hadden wij veel antigeen en weinig precipitinen, zoodat de verhouding antigeen: anti-lichaam gunstig was om een neerslag snel te laten ontstaan.

Ook hier dus kunnen wij het waargenomene verklaren op grond van het verschijnsel van Neisser-Wechsberg.

Het prozone-effect kan verklaard worden uit de lading. Men neemt uit physische overwegingen aan, dat de lading van het antigeen en van het anti-lichaam tegengesteld zijn. Indien één van deze twee in groote overmaat aanwezig is, zal een verschuiving van de lading in de richting van het iso-electrische punt niet voldoende plaats vinden, om vlokking tot stand te brengen. Indien het serum dus in verhouding een te groote hoeveelheid anti-lichaam bevat, zal er pas precipitatie kunnen optreden, indien, na diffundeeren in de bovenste laag, de hoeveelheid anti-lichaam voldoende verminderd is. Hierdoor ziet men de precipitatie-ring niet op het oorspronkelijke grensvlak, maar boven in de buis ontstaan.

Naar aanleiding van de niet specifieke precipitatie in tabel 12 van het anti-polysaccharide serum van de F10-stam en vooral door de precipitatie van 1:1000 verdunning P. F10 met anti-P. F15-serum, besloten wij eerst deze reactie nog eens nader te onderzoeken.

Twee muizen No. 29 en 30 werden intraperitoneaal ingespoten met een physiologische zoutoplossing en daarna werd op gelijke manier hun sera behandeld t.o.v. de verschillende polysaccharide-verdunningen.

Het bleek toen, dat zoowel het P. F23 als het P. F15 tot een verdunning van 1:1000 en het P. F10 tot bijna 1:1000 met

het serum uit de muizen 29 en 30 *niet-specifiek* precipiteerde.

In normaal muizenserum zijn dus steeds precipitinen tegen de polysacchariden der B.-pneumoniae aanwezig.

Bij hogere verdunning tot 1:1500 waren wél alle reacties met normaal-serum negatief, zoodat de verdunningen boven de 1:1000 in de vorige tabel hun waarde als specifieke reactie behouden.

Om de specificiteit der anti-polysaccharide-sera aan te toonen, moesten wij dus eerst sera maken met een hogere precipitatie-titer, die wij trachtten te verkrijgen door meer antigeen in te spuiten.

In de volgende tabel zijn de uitkomsten opgenomen van de precipitatie-reacties t.o.v. het P. F23; P. F15; P. F10 en tevens t.o.v. het L.-P. F23 De muizen werden ieder ingespoten met 0,2 mg polysaccharide volgens reeds eerder vermelde methode.

Tabel 13.

Muis	Ingesp. met:	Prec. t. o. v. P. F 23			Prec. t. o. v. P. F 15			Prec. t. o. v. P. F 10			Prec. t.o.v. L.-P.F23		
		1:1500	1:2000	1:5000	1:1500	1:2000	1:5000	1:1500	1:2000	1:5000	1:1500	1:2000	1:5000
No 31	P. F 23	+			—			—			+	+	—
No 32	P. F 23	+	±	—	+			—			+	+	±
No 33	P. F 15	±			+	+	—	—			+		
No 34	P. F 15	+	—		+	—		—			+	—	
No 35	P. F 10	—			—			+	±	—	±		
No 36	blanco	—	—		—	—		—	±		—	—	

3de Specificiteits-bepalingen van anti-P.-sera na intraperitoneale injecties.

Wij zien nu, dat het P. F23 en het P. F15 in staat zijn specifieke antilichamen op te wekken gericht tegen het polysaccharide uit het A-type en niet tegen dat uit het C-type: *het anti-P.-serum type A reageert dus specifiek.* Ook de P. F10-stof is misschien in staat om anti-C- en niet anti-A-lichamen op te wekken.

Tevens is de precipitatie-titer van het anti-P. F23-serum t.o.v. de L.-P. F23 hoger dan die t.o.v. de P. F23-stof. Hierop zullen wij later terug komen.

Of er nog verschil in specificiteit tusschen het P. F23 en het

P. F15 is — beide stammen van het A-type — konden wij niet uitmaken. Hierover zullen veel meer proeven gedaan moeten worden vóór een zuiver oordeel hier omtrent kan worden gevormd. Eveneens zijn wij er lang niet zeker van, dat het P. F10 werkelijk op zichzelf in staat zou zijn antistoffen tegen het C-type op te wekken, het aantal proeven hierover is onvoldoende, wèl moeten wij deze stof als een reagens op de precipitinen van het C-type beschouwen, gezien de eerder verkregen precipitatie-titer van 1:3.000.000 met anti-C-serum (zie blz. 62).

Tenslotte werd nog nagegaan de invloed van serum-toevoeging in vivo aan het P. F23 en P. F15, door intraperitoneale injecties met 0,2 mg stof. Hierbij vonden wij, dat beide polysacchariden tot 1:5000 reageerden met een antiserum, verkregen uit de muizen *No. 37* en *No. 38* op de bovenbeschreven manier.

Door subcutane injecties van de polysacchariden met serum-toevoeging verkregen wij reeds op blz. 68 een titer van 1:10.000 t.o.v. het polysaccharide.

2. BEREIDING VAN ANTI-A-SERUM BIJ KONIJNEN.

De bereiding van immuunsera door middel van bacterie-suspensies kan op verschillende manieren geschieden. Het gehalte aan antilichaam hangt af van het proefdier zèlf en van de gevolgde methode.

Er bestaan slechts weinig gegevens omtrent de wijze waarop hoogwaardige sera bij kapselbacteriën kunnen worden verkregen. Dit zal kunnen afhangen van de bereiding der suspensies, de ingespoten hoeveelheden, de methode van injectie, het aantal inspuitingen en de frequentie hiervan.

Bottema heeft de methode van injectie uitvoerig bestudeerd aan de hand van de gegevens van Wielenga (1937). Hij komt tot het resultaat, dat de volgende manier de meeste kans op succes biedt: Als antigeen moet gebruik gemaakt worden van suspensies van bacteriën, die bereid zijn door een 24 uur oude, schuine agarkultuur af te slibben met 10 cm³ fysiologische zoutoplossing en daarna door een steriel filtreerpapier te filteren. De bacteriën moeten vervolgens gedood worden door verhitting gedurende een half uur op 54° C., òf door toe-

voeging van 0,1 % formaldehyde. Van deze suspensie moeten drie series van elk zes injecties intraveneus aan het konijn worden toegediend. Tusschen de series is een rustpoos van 7 à 10 dagen noodig, terwijl alléén wanneer na drie series de titer nog erg laag is, een vierde serie voordeelen kan opleveren.

De resultaten van *Bottema* waren zeer goed voor het C- en B-type, doch bij het A-type lieten ze nogal te wenschen over. Hij verkreeg bij één konijn voor de F1-stam van het A-type, pas na vier series een titer van 1/100 en bij een ander konijn na de 1ste, 2de en 3de reeks, de titers 0; 1/20 en 0.

Deze weinig belovende resultaten voor het anti-A-serum deden ons besluiten om óók het antiserum te bereiden, zooals *Lévy-Bruhlen* en *Courtois* hadden gedaan. Deze Franschen maakten anti-A-serum, door 5 weken lang achter elkaar drie injecties per week te geven. Tevens spoten zij grootere hoeveelheden antigeen in, waarbij zij opmerkten, dat na een vermagering van het konijn in de eerste week, daarna weer een gewichtstoename optrad.

Daar wij de beschikking hadden over drie konijnen, werd konijn *A* volgens de methode van *Bottema* en de konijnen *B* en *C* volgens die der Franschen behandeld.

Konijn A kreeg dus zes intraveneuze injecties van resp. 0,1; 0,2; 0,5; 0,5; 1 en 1 cm³ van een bacterie-suspensie, waaraan 0,2 % formaldehyde was toegevoegd en na een week rust weer zes injecties om den anderen dag van elk 1 cm³. Na drie series werd de agglutinatie-titer bepaald.

Konijn B en *C* kregen ieder vijf weken lang achter elkaar drie injecties per week, van een eveneens met 0,2 % formaldehyde behandelde bacterie-suspensie. De hoeveelheden suspensie, die toegediend werden, waren opklimmend van 0,1 cm³ tot 3 cm³ per injectie.

Bij deze konijnen konden wij een gewichtsafname in de eerste week en daarna weer een gewichtstoename bevestigen. Na goed vier weken succumbeerde echter konijn *B* en gaf bij sectie het volgende beeld te zien:

puntvormige bloedingen in het longweefsel, geen afwijkingen van de nier, in de lever talrijke necrobiotisch-necrotische haardjes; de long gaf bij microscopisch onderzoek plaatselijk verbreedde alveolairsepta met groote celrijkdom

te zien, terwijl in enkele alveolen een groote meerkernige reuzencel aanwezig was *).

Het is opmerkelijk, dat dit konijn te gronde ging aan soortgelijke verschijnselen als die, welke de levende pneumobacteriën kunnen verwekken. Toch was de suspensie vrij van levende bacteriën, daar zoowel door ons als bij onderzoek in het Centraal Laboratorium te Utrecht geen levende bacteriën hierin gevonden werden.

De agglutinatie-titers der sera uit de konijnen A en C (na tien dagen rust) werden op de in Utrecht gebruikelijke methode bepaald op 1/100; dus voor beide sera gelijk.

Er kon worden opgemerkt, dat snel opeenvolgende intraveuze injecties geen voordeel hadden en dat een rustpoos van een week tusschen de series zeer goed was. Bij onze opeenvolgende injecties, konijn B en C, werden meer dan 22 cm³ suspensie ingespoten, waarbij één konijn dood ging, terwijl het andere konijn er zeer slecht aan toe was en geheel verharde ooren had gekregen. De meer gematigde methode bij Konijn A met een totale toegediende hoeveelheid van 9 cm³ en een rustpoos tusschen de series, gaf maar weinig verharding van de ooren en tóch een evenhooge agglutinatie-titer.

De specificiteit der agglutinatie werd vastgesteld, doordat stammen van het type B of type C niet met deze immuunsera agglutineerden.

A. De bepaling van de precipitatie-titer.

Deze bepalingen konden in twee groepen gescheiden worden:

1. Een precipitatie-titer-bepaling van de sera; hieronder verstaan wij de verdunning der sera, die nog juist met een bepaalde hoeveelheid polysaccharide reageert.
2. Een precipitatie-titer-bepaling van de specifieke stoffen; hieronder verstaan wij de verdunning der specifieke stoffen, die nog juist met een bepaalde verdunning van het anti-A-serum reageert.

*) Volgens de opgaven van Dr. H. H. V i n k, dierenarts, die zoo hulpvaardig was de sectie te verrichten.

Voor de bepaling van de precipitatie-titer van de sera moesten wij als standaard een bepaalde hoeveelheid polysaccharide kiezen, waartoe gebruik gemaakt werd van een 0,1 % oplossing van het zuivere P. F23-natriumzout; dus een verdunning van 1:1000. In tegenstelling met normaal muizenserum reageert normaal konijnenserum niet met 1:1000 verdunning van het P. F23.

De reactie werd gedaan door ongeveer 1 cm³ van de serumverdunning onder in agglutinatiebuisjes te brengen en daarbovenop de standaard P-oplossing zeer voorzichtig te pipetteeren. Het precipitaat ontstond na 2 tot 3 uur bij kamertemperatuur. In de stoof bij 37° C ontstond nog wèl een ringreactie, die echter snel verdween. Beide sera hadden een precipitatie-titer van 1/80 en deze was specifiek, daar het P. F10-natriumzout (verdunning 1:1000) niet met deze sera reageerde.

Voor de precipitatie-titer-bepalingen van de specifieke stoffen werd gebruik gemaakt van een 1:10 verdund immuunserum (ongeveer 1 cm³) waarop een gelijke hoeveelheid van een P. F23- of L.-P. F23-verdunning voorzichtig werd gepipetteerd. Het neerslag ontstond pas na 1 uur op 37° C en na één nacht staan, volgde de beoordeeling.

De precipitatie-titer van het P. F23 bepaalden wij op 1:500.000.000 en die van het L.-P. F23-natriumzout op 1:1000.000.000.

Zóó buitengewoon hoge precipitatie-titers zijn wij nog niet in de literatuur tegen gekomen.

Deze precipitatie-titer wil zeggen, dat wanneer wij 1 mg van onze specifieke stof zouden oplossen in 1000 liter water, de aanwezigheid hiervan nog *specifiek* met het homologe antiserum zou zijn aan te toonen.

B. De absorptie-proeven.

Door absorptie-proeven trachtten wij uit te maken of er, evenals B o t t e m a voor het C-type vond, een serologisch verschil bestond tusschen het L.-P. en het P. uit stammen van het A-type.

Hiertoe lieten wij 1 cm³ antiserum (type A) reageeren met 1 cm³ van een 1:1000-verdunning van het P. F23-natriumzout, door het buisje 2 uur bij 37° C te plaatsen. Na verwijdering

van het precipitaat door middel van centrifugeeren, werd de heldere oplossing opnieuw met 1 cm³ polysaccharide-oplossing behandeld. Deze behandeling en het afcentrifugeeren van het neerslag werden zoo vaak herhaald, tot geen precipitaat meer ontstond. Het serum konden wij dan als „verzadigd” met polysaccharide beschouwen d.w.z. alle tegen het polysaccharide gerichte antistoffen waren uit het serum verwijderd. Dit inmiddels tot 1:5 verdunde serum reageerde daarna nog tot een verdunning van 1:100.000 met het L.-P. F23.

Indien omgekeerd 1 cm³ antiserum met L.-P. F23 „verzadigd” werd, konden wij géén precipitatiereactie meer met het P. F23 verkrijgen. Wél ontstond dan nog een precipitaat met een lipoid-polysaccharide-eiwit-preparaat, hetgeen ook begrijpelijk is, daar immers in het antiserum precipitinen aanwezig moeten zijn tegen het proteïde uit het kapselantigeen.

Wij zouden nu kunnen concludereen tot een serologisch verschil tusschen het P. en het L.-P. of met andere woorden: er komen in het immuunserum precipitinen gericht tegen het P. en tegen het L.-P. voor. Hierop komen wij in onze slotbeschouwing nog terug.

3. PROEVEN „IN VIVO”.

A. *De toxiciteit van het P., L.-P. en L.-P.-E.*

De toxische werking van de lipoid-polysacchariden uit B. pneumoniae is bij muizen over het algemeen gering. Bottema vond, dat pas door subcutane injectie van 2 mg L.-P. F10 de dood na 24 uur intrad. Lévy-Bruhl en Courtois vonden voor een stam uit het A-type, dat 1 mg L.-P. hiervan bij subcutane injectie de dood na 2 à 3 dagen veroorzaakte, terwijl bij intraperitoneale injectie van deze dosis, de dood al na drie uur intrad.

In tegenstelling met deze toxiciteit konden wij bij onze eerste muizenproeven, op No. 39, 40 en 41 gedaan, géén doodelijke dosis bereiken met subcutane injecties van resp. 2, 3 en 6 mg L.-P. F23. Wij moesten dus constateeren, dat het lipoid-polysaccharide uit de F23-stam, bij subcutane injectie, niet of weinig toxisch is voor muizen.

Hoewel de muizen, na inspuitingen met L.-P. wel ziek werden, konden wij dit niet waarnemen na de subcutane injecties met

grootte hoeveelheden P. F23, zooals die gebruikt werden voor het opwekken der anti-polysaccharide precipitinen.

Ook gebruikten wij nog een L.-P.-E.-preparaat, dat afkomstig was van een vijfmaal volgens S e v a g onteiwitte-oplossing van de specifieke stof uit de F23-stam. Daar een gedeelte van dit preparaat na 4 keer extra onteiwitten vrij van proteïden was, kunnen wij aannemen, dat het L.-P.-E. slechts sporen bacterieel-eiwit bevatte. *Muis No. 42* werd subcutaan ingespoten met 2 mg van dit preparaat en was na één dag ernstig ziek, na vier dagen bijna dood, maar de zesde dag weer geheel hersteld.

Er is dus een groot verschil in de toxiciteit van de verschillende specifieke stoffen uit de F23-stam te zien; terwijl het P. niet en het L.-P. slechts een weinig toxisch is, doet een spoortje van het bijbehorende eiwit de toxiciteit sterk stijgen.

Ook intraperitoneale injecties van de specifieke stoffen werden door ons gedaan.

Muis No. 43 werd intraperitoneaal ingespoten met 1,5 mg L.-P.

F23; deze muis was ernstig ziek gedurende 2 à 3 dagen, na herstel op de vierde dag, kreeg hij de 5de dag weer een injectie van 1,5 mg stof waarna geen ziekteverschijnselen optraden.

Muis No. 44 werd op gelijke manier behandeld en gaf volkomen hetzelfde ziektebeeld te zien.

De toxiciteit was bij intraperitoneale injecties dus niet hoger en het is ons niet gelukt een dodelijke intoxicatie te verwekken.

B. *De actieve immunisatie door het L.-P. en P.*

Het was de bedoeling om na te gaan, of muizen na herhaalde subcutane inspuitingen met het L.-P. F23 tegen infecties met de virulente homologe bacteriestam bestand zouden zijn. Hiertoe werden vier muizen (*No 45; 46; 47; 48*) bij de staartwortel drie keer subcutaan, om de vier dagen, ingespoten met 0,1; 0,1 en 0,2 mg specifieke stof. Na een week werden twee muizen geïnfecteerd met 0,1 cm³ F23-type A-kultuur, één met 0,2 cm³ F10-type C-kultuur en één met 0,1 cm³ F24-type B-kultuur. Onder een F23-type A-kultuur verstaan wij een bacterie-suspensie, bereid door een 24 uur oude schuine agar-kultuur, bebroed bij 37° C, af te slibben met 10 cm³ physiologische zoutoplossing.

Twee à drie dagen na de infectie met de verschillende bacteriën waren de muizen, ingespoten met de F23- of F24-stam dood en konden de bacteriën weer uit het hartebloed gekweekt worden. De met de F10-stam behandelde muis bleef in leven, daar deze stam niet meer virulent was.

Een immuniseerende werking kon door ons dus nog niet aangetoond worden.

Nadat uit de gegevens van tabel 9 gebleken was, dat wèl precipitinen in het muizen-serum aanwezig waren, zetten wij een nieuwe serie proeven in. Hiertoe werden muizen twee keer, om de vier dagen, subcutaan ingespoten met grotere hoeveelheden L.-P. F23 met serum gemengd (zie tabel 14). Tien dagen na de laatste injectie, werden zij toen met 0,1 cm³ F23-kultuur besmet en stierven alle. Uit het bloed van alle muizen kon de F23-stam weer gekweekt worden.

Tabel 14.

Muis	Totale hoeveelheid ingespoten stof	Gestorven aan de infectie
No 49	10 mg L.-P. F 23	na 2 dagen
No 50	9 mg L.-P. F 23 + serum	na 3 dagen
No 51	22 mg P. F 23 + serum	na 2 dagen
No 52	blanco	na 3 dagen

Muizen geïnfecteerd met een F 23-kultuur, na vóórbehandeling met het L.-P. en P.

Nadat bij de muizen No. 42 en 43 (zie blz. 78) het sterke ziekteverloop bij intraperitoneale injecties met het L.-P. en het L.-P.-E. was gebleken, werden deze muizen met 0,1 cm³ F23-kultuur subcutaan besmet.

Muis No. 43 (met L.-P. behandeld) stierf na 1½ dag.

Muis No. 42 (met L.-P.-E. behandeld) stierf pas na 3½ dag.

Muis No. 53, die onbehandeld was en als contròle diende stierf na twee dagen. Misschien zou dus toch wel eenige immuniteit met de specifieke kapselstof verwekt kunnen worden. Om echter goede vergelijkende waarden te vinden, zal het eerst noodig zijn, dat wij de Minimum Letale Dosis van de bacterie-suspensie vaststellen.

Toen was komen vast te staan, dat het mogelijk was om door middel van intraperitoneale injecties niet alleen met lipoid-polysacchariden maar ook met vrije polysacchariden bij muizen precipitinen op te wekken, leek het ons gewenscht opnieuw de beschermende werking voor muizen na te gaan.

B o t t e m a vond na inspuitingen met L.-P.- of P.-preparaten van de F10-stam géén beschermende werking bij muizen, terwijl met het G₁-polysaccharide der pneumococcen bij muizen, door intraperitoneale injectie met 0,75 γ -stof, wél een actieve immunisatie kon worden verkregen (zie theoretisch overzicht blz. 8).

Voor het vaststellen van de M.L.D. van de smetstof kozen wij zooveel mogelijk gelijkwaardige muizen. Hiervoor werden acht muizen van vrijwel gelijk gewicht en uit eenzelfde nest in behandeling genomen.

Als infectiemateriaal kozen wij een F23-type A-kultuur.

Muis No. 54 werd subcutaan ingespoten met 0,1 cm³ van deze bacterie-suspensie en stierf na twee dagen; een sectie gaf longbloedinkjes en een abnormale milt (groot en zeer donker gekleurd) te zien.

Muis No. 55 werd subcutaan ingespoten met 0,1 cm³ van een 1:10-verdunning van deze bacterie-suspensie en stierf na 3 dagen; volgens de groote-plaat-telmethode waren ongeveer 20 miljoen bacteriën ingespoten.

Muis No. 56 werd subcutaan ingespoten met 0,1 cm³ van een 1:100 verdunning van deze bacteriesuspensie en stierf na 3 dagen; volgens een telling waren ongeveer 2 miljoen bacteriën ingespoten. Het sectie-beeld was als bij No. 54.

Muis No. 57 werd subcutaan ingespoten met 0,1 cm³ van een 1:200 verdunning van deze bacterie-suspensie en stierf na goed 3 dagen. Er werden ongeveer 1 miljoen bacteriën ingespoten.

Muis No. 58 werd subcutaan ingespoten met 0,1 cm³ van een 1:1000 verdunning van deze bacterie-suspensie en was na 5 dagen dood. Een sectie gaf hetzelfde beeld te zien als bij No. 54.

Onderwijl werden de muizen 59 en 60 drie keer binnen een week tijds intraperitoneal ingespoten met in totaal 1,5 γ P. F23-natriumzout. Na een week rust kregen ze een nieuwe serie

inspuitingen met in het geheel 200 γ van deze specifieke stof. Daarna lieten wij deze dieren opnieuw een rustpoos van tien dagen ondergaan, om ze vervolgens subcutaan te infecteeren met de 1:200-verdunning van de bacterie-suspensie. Als contrôle werd ook een muis *No. 61* met dezelfde hoeveelheid bacteriën ingespoten. Deze laatste muis stierf na 3 dagen en 5 uur en gaf bij een sectie hetzelfde beeld te zien als *No. 54*, terwijl de F23-stam weer uit het hartebloed kon worden gekweekt. De muizen *59* en *60* leken actief geïmmuniseerd en vertoonden geen ziekteverschijnselen; het sectie-beeld gaf géén afwijkingen te zien; ook kon de F23-stam niet meer uit het bloed gekweekt worden.

Deze actieve immunisatieproef herhaalden wij op geheel dezelfde manier met acht muizen, die na de vóórbehandeling eveneens met de F23-stam besmet werden. De virulentie van de F23-stam was echter verminderd, zoodat wij toen opnieuw de M.L.D. op de eerder beschreven manier moesten bepalen.

Muizen ingespoten met 1:200-verdunning van de bacterie-suspensie gingen toen na 5 dagen dood, terwijl bij injecties met hogere verdunningen de dieren steeds in leven bleven. Daar de geïmmuniseerde muizen niet konden wachten, totdat de pathogeniteit weer voldoende kon zijn opgevoerd, spoten wij ze in met 1:100 bacterie-verdunning, evenals de vier contrôle-dieren. Ondanks de nadeelige proefopstelling, doordat wij de muizen met een nog grooter aantal bacteriën moesten inspuiten, waren de resultaten bevredigend. De gemiddelde levensduur werd zooals uit tabel 15 blijkt dank zij de vóórbehandeling verhoogd, terwijl 25% der muizen actief geïmmuniseerd was.

Tabel 15.

	Aantal	Gestorven										Overlevend.	Gemidd. levensduur
		1 d.	2 d.	3 d.	4 d.	5 d.	6 d.	7 d.	8 d.	9 d.	10 d.		
Contrôle	4	—	1	3	0	2,75 d.
Proef	8	—	1	3	1	1	—	—	—	—	—	2	5,00 d.

Vergelijking van de gemiddelde levensduur der geïmmuniseerde muizen en contrôle-dieren.

SLOTBESCHOUWINGEN.

Aan de hand van onze immuniteits-proeven hebben wij be-
wezen, dat niet alleen het lipoïd-polysaccharide maar ook het
vrije polysaccharide een volwaardig antigeen is. Dit opmerke-
lijke feit is, voor zoover ons bekend, slechts geconstateerd bij
het G₁- en misschien bij het G₂-polysaccharide der pneumo-
coccen.

Allereerst zullen wij thans een verklaring trachten te vinden
voor de antigeniteit van het polysaccharide.

Toen vastgesteld werd, dat lipoïd-polysacchariden in tegen-
stelling met polysacchariden, antigenen waren, moest de oor-
zaak hiervan wel in het lipoïd worden gezocht. Een moeilijkheid
hierbij is echter, dat lipoïden in het algemeen (getuige de W a s e r m a n n-reactie) een tamelijk polyvalente rol spelen. Uit de
proeven van B o t t e m a en ook uit die van ons, blijkt, dat
eiwit-toevoeging aan het L.-P. de precipitatie-titer van het
antiserum verhoogt, dus ook de antigeniteit. Hieruit kan men
concludeeren, dat eiwit als „activator” van het lipoïd-polysac-
charide fungeert en de werking hiervan versterkt, hetgeen ver-
klaard kan worden uit de plaatshebbende vergrooting der col-
loïde deeltjes.

Nu echter ook de antigeniteit van het polysaccharide gebleken
is, die door vergrooting van het polysaccharide tot een L.-P.-
complex, òf tengevolge van eiwittoevoeging verhoogd kan
worden, moeten wij zoowel het lipoïd als het eiwit het ver-
mogen om als „gangmaker” dienst te doen, toeschrijven. Deze
stoffen zijn dus in staat om de antigeniteit van het polysac-
charide te versterken.

Uit de absorptie-proeven, welke door ons gedaan werden, be-
hoeft echter niet noodzakelijk te volgen, dat er verschil bestaat
tusschen precipitinen, welke tegen het lipoïd-polysaccharide en
die, welke tegen het polysaccharide gericht zijn. Het is in ver-
band met de antigeniteit van het polysaccharide ook zéér goed
mogelijk, dat dit polysaccharide als hoofdprecipitinogeen
moet worden beschouwd. Het polysaccharide in het L.-P. zou dan

in anderen toestand verkeeren dan het vrije polysaccharide; dit is zelfs zéér waarschijnlijk, daar bij de isoleering van deze laatste stof gebruik gemaakt moest worden van zuren, die zooals wij weten de viscositeit der oplossingen verlagen, dus tevens van invloed zijn op de grootte der deeltjes.

Een bevestiging uit eigen ervaring hiervan vinden wij op blz. 72, waaruit bleek, dat anti-P. F23-serum met een hogere verdunning van het L.-P. dan van het polysaccharide zelf reageerde. *Daar een anti-P.-serum alléén precipitinen tegen het polysaccharide gericht bevat, moèt er wel een verschil bestaan tusschen het zuivere polysaccharide en het polysaccharide, zooals het voorkomt in het L.-P.* Een andere bevestiging kunnen wij o.a. vinden in de proeven van Hornus en Grabar (1940) op blz. 18 beschreven, die vinden, dat er een groot onderscheid tusschen verschillende polysaccharide-preparaten bestaat. Het preparaat dat de zuurhydrolyse het kortste ondergaan heeft, precipiteert het mééste antilichaam.

Wij stellen ons nu voor, dat het polysaccharide in het L.-P.-E. het hóógste antigeenvermogen bezit en dat in het L.-P. minder, en in het polysaccharide zèlf weinig of geen antigeenvermogen aanwezig is, afhankelijk van de gebruikte isolatiemethode en andere factoren die wij hieronder zullen uiteenzetten. Zoowèl het lipoid als het eiwit beschouwen wij als de „gangmakers”, die noodzakelijk zijn, om het geringe antigeen-vermogen van het polysaccharide te versterken. Hierbij kan in het midden worden gelaten, of het lipoid, het eiwit, respectievelijk de combinatie lipoid-eiwit daarnaast zèlf nog al of niet specifiek antigeen-vermogen hebben. Hiervoor pleiten een aantal waarnemingen, andere doen dit in twijfel trekken, dit staat echter n a a s t hun vermogen om als „gangmaker” dienst te doen (zie hierover verder blz. 87).

Bovenstaande theorie steunt op de ontdekkingen van Zozaya (1932), die vond dat één van de factoren voor de antigeniteit gelegen was in de afmetingen der deeltjes in colloïdaal-dispersen toestand (zie blz. 4). Het gelukte hem o.a. om door absorbtie van dextrose aan collodium een precipitino-gen te verkrijgen; ingespoten bij konijnen was deze stof een volwaardig antigeen geworden en het serum gaf een precipitatie-reactie met dextrose. Evenals het lipoid of eiwit in onze

proeven de antigeniteit versterkt, moeten wij hier het collodium als „gangmaker” van de dextrose opvatten; de antigene werking wordt hierdoor versterkt.

Dat anderzijds niet ieder polysaccharide in staat is antigene werking te vertoonen alléén op grond van de afmetingen van zijn colloïde deeltjes, volgt uit het feit, dat hoogmoleculaire stoffen zooals arabische gom of latex deze werking niet te zien geven. Er zijn dus behalve de deeltjesgrootte nog wel degelijk andere voorwaarden, waaraan voldaan moet worden, opdat een stof antigeen zij.

Hieronder volgen de oorzaken, die mogelijker wijze er toe hebben bijgedragen, dat andere onderzoekers de antigeniteit der zuivere polysacchariden niet hebben opgemerkt:

- 1° Het isoleeren van een polysaccharide uit een lipoid-polysaccharide-eiwitcomplex is een moeilijke taak, daar in het algemeen deze complexen bestaan uit weinig polysaccharide en veel eiwit. In ons geval bij de F23-stam, of althans bij de oplosbare specifieke stof uit deze stam, bestaat het grootste gedeelte uit polysaccharide, zoodat wij niet intens behoeven te onteiwitten om het polysaccharide zuiver te verkrijgen. Daar in het algemeen de polysacchariden bij iedere onteiwittingsmethode gedeeltelijk met het eiwit neerslaan, is het géén wonder, dat bij een ongunstige polysaccharide-eiwitverhouding, geen polysaccharide gevonden wordt. Daarbij komt nog dat de polysacchariden, vooral als ze voor een gedeelte als zuur voorkomen, óók nog gedeeltelijk in de alcohol, benodigd voor het neerslaan, oplossen.
- 2° Zoowel Heidelberg er, als anderen die zijn methode toepassen, maken bij de onteiwitting in een buffermengsel gebruik van centrifugeeren en werken alléén de bovenste laag op. Wij daarentegen gebruiken het geheele neerslag, en in de onderste laag nu bevinden zich juist de grootste colloïde deeltjes, dus ook die van de specifieke stof waar het hier om gaat.
- 3° Veel onderzoekers passen de onteiwittings-methode van Sevag toe totdat er geen neerslag meer ontstaat en de oplossing vrijwel helder is. De eiwitreacties zijn echter

reeds veel eerder negatief; de laatste neerslagen bevatten veel polysaccharide en waarschijnlijk lipoid.

- 4° De keuze van de voedingsbodem kan ook van invloed zijn geweest. G o e b e l en A v e r y krijgen uit het A-type een polysaccharide, dat met immuunserum precipiteert tot 1:2000.000; wij daarentegen bepaalden de precipitatietiter van ons polysaccharide op 1:500.000.000.
- 5° Onze opwerkings-methode wordt zoo snel mogelijk achter elkaar afgewerkt, zoodat een onnoodig langen tijd van zuurinwerking vermeden wordt.
- 6° Bij toepassing van de door ons gevolgde droogmethode verkrijgen wij, in tegenstelling met de normale droogmethode, zéér gemakkelijk oplosbare stoffen. Het zou mogelijk kunnen zijn, dat ook hierin een factor schuilt, die van invloed is op de deeltjesgrootte van het polysaccharide in colloïdale toestand.
- 7° De antigeniteit van het polysaccharide kunnen wij bewijzen bij muizen, terwijl in het algemeen als proefdier voor de pneumobacteriën gebruik gemaakt wordt van konijnen. Gezien de ondervindingen bij de pneumococcen type I opgedaan, (blz. 8) en in verband met de theorie van P e t t e r s o n, (blz. 9), is het zeer wel mogelijk, dat ons polysaccharide bij een konijn geen antigeen zou zijn.

Bij de poging om de specificiteit van de polysacchariden te verklaren, bevinden wij ons in een moeilijk parket. Zooals reeds eerder opgemerkt, wordt deze specificiteit bij de B. pneumoniae en de pneumococcen wél geheel en al aan de polysacchariden geweten, maar er zijn verschillende kruisingsreacties, die moeilijkheden opleveren. Nu is uit de onderzoekingen van B o t t e m a en die van ons, in verband met die van G o e b e l, gebleken, dat het mogelijk is uit het C-type zoowel als uit het A-type *verschillende* polysacchariden te isoleeren, die tóch tot een hooge verdunning *specifiek reageeren*. Deze verdunningsgraad is natuurlijk relatief, daar de zeer hooge precipitatietiter, die G o e b e l voor de specifieke stof uit het A-type vindt (1:2000.000) weer laag is tegenover de titer van een 500 miljoenste, welke wij voor een preparaat uit het A-type vinden.

Het chemische verschil in opbouw der componenten moeten

wij voornamelijk wijten aan de voedingsbodem, en hierdoor zou het mogelijk kunnen zijn dat er nog veel meer „specifieke” polysacchariden uit hetzelfde type geïsoleerd kunnen worden. Om uit dit doolhof te geraken moeten wij wel aannemen dat niet zoozeer de bouwsteenen, maar de bouw zelf aansprakelijk is voor de specificiteit.

De bouwsteenen zijn dan afhankelijk van het milieu, terwijl de structuur, afhankelijk van de bacterie zelf, de specificiteit bepaalt.

Een bevestiging hiervoor kunnen wij o.a. vinden in de onderzoekingen van:

1. Goebel en Avery (1927), die de chemische verwantschap tusschen het G₃-polysaccharide en het polysaccharide uit *B. pneumoniae* type A vaststellen, terwijl serologisch géén verband kan worden aangetoond (blz. 6).
2. Heidelberger, Goebel en Avery (1925), die de serologische verwantschap tusschen het G₂-polysaccharide en dat uit *B. pneumoniae* type B vaststellen, terwijl chemisch géén overeenkomst aanwezig is (blz. 6).
3. Goebel, Avery en Babers (1934), die vaststelden dat de plaats der zuurstofbrug in disacchariden van invloed is op de specificiteit.
4. Heidelberger, Avery en Goebel (1929), die uit een structureele analogie tusschen het P. uit arabische gom en dat uit de G₂- of G₃-polysacchariden met de serologische verwantschap bevestigen, terwijl chemisch volgens Challinor, Hawthorth en Hirst in de polysacchariden het glucuronzuur aan glucose of galactose gebonden is.

Serologische verwantschap tusschen polysacchariden behoeft dus niet samen te gaan met chemische verwantschap, evenmin als het omgekeerde.

Of het ons gelukt is op onze synthetische voedingsbodem de bouw van het polysaccharide uit de bacterie, in zijn natuurlijke omgeving te evenaren, is moeilijk te beweren. De *actieve immunisatie* zou daar een bewijs voor kunnen zijn.

Terwijl het voorafgaande speciaal over de *B. pneumoniae* handelt en misschien ook van toepassing op de pneumococcen

kan worden geacht, moeten wij toch ook in het algemeen nog even de twee opvattingen over de oorzaak der specificiteit tegenover elkaar stellen. Aan den eenen kant staat Bierry met zijn bewering, dat de specificiteit van de proteïde-antigenen in het algemeen door de saccharide-fractie in het molecuul bepaald wordt, aan den anderen kant staat Landsteiner, volgens wien veel proteïde-antigenen specifiek zijn, zonder dat er sacchariden in voorkomen.

Hierover kunnen wij opmerken, dat het aantoonen van weinig polysaccharide naast veel eiwit zeer moeilijk is en dat de isolatie van deze polysacchariden, zoo dit al gelukt, dan toch met zulke ingrijpende middelen moet geschieden, dat er van de oorspronkelijke polysaccharide structuur niet veel meer over is; en zooals wij reeds beschreven, is juist de bouw aansprakelijk voor de specificiteits-reacties.

Het feit, dat het Wong (1938) is gelukt om uit kapsellooze stammen, dus stammen die géén kapselstof en géén polysaccharide zouden bevatten, tóch een lipoid-polysaccharide te isoleeren, is o.i. een bevestiging van de meening van Bierry en een bewijs ervoor hoe moeilijk het is te beweren specifieke eiwitten in handen te hebben, die vrij van polysaccharide zijn.

De specificiteit der eiwitten is de laatste jaren dan ook meer en meer op de achtergrond geraakt en het lijkt ons ook in het algemeen zeer waarschijnlijk dat de specificiteit, zoo niet geheel dan toch voor het grootste deel door de bouw der polysacchariden wordt bepaald.

S A M E N V A T T I N G.

1. Uit een kapseldragende stam van *Bacterium pneumoniae* type A (Frankland), isoleerden wij een lipoid-polysaccharide, dat tot een verdunning van 1:1000.000.000 een specifieke precipitatiereactie gaf met het homologe antiserum.
2. Deze stof kon, door hydrolyse met ijsazijn in de koude, gescheiden worden in een phospholipoiden en een polysaccharide.
3. Het lipoiden was een phosphatide van de lecithine-kephaline groep, het kwam aan calcium gebonden voor.
4. Het kristallijne polysaccharide, dat eiwit- en lipoid-vrij was, bevatte d-fructose, een uronzuur en waarschijnlijk een disaccharide.
5. De specifieke stof uit het C-type bestond, in verhouding tot die uit het A-type, uit veel eiwit, veel lipoid en weinig polysaccharide.
6. Het chemisch zuivere, gekristalliseerde polysaccharide uit het A-type, dat met het homologe antiserum een precipitatie-titer van 1:500.000.000 gaf, was, evenals het lipoid-polysaccharide uit het A-type, een volwaardig antigeen, dus in staat antilichamen bij de muis te verwekken.
7. Het anti-polysaccharide-serum van het A-type was specifiek en reageerde niet met het polysaccharide uit *B. pneumoniae* type C.
8. Actieve immuniteit kon, na herhaalde inspuitingen van het chemisch zuivere polysaccharide bij de muis, soms worden opgewekt.

R É S U M É.

1. D'une souche encapsulée du type A de *Bacterium pneumoniae* (Frankland) nous avons isolé une substance, qui précipitait spécifiquement par le serum correspondant titrant 1 p. 1.000.000.000.
 2. Après l'hydrolyse à froid avec l'acide acétique glacial de cette substance, elle paraît être composée d'une lipide et d'une glucide.
 3. La lipide était une phosphatide du groupe lécithine-képhaline, liée au calcium.
 4. La glucide, que nous avons isolée en état cristallin, exempt de protéide et de lipide, se composait de d-fructose, d'un acide uronique et d'une troisième substance, qui est probablement une disaccharide.
 5. A la différence de la substance spécifique du type C, qui est composée de beaucoup de protéide, beaucoup de lipide et peu de glucide, celle du type A se trouvait composé de peu de protéide, peu de lipide et beaucoup de glucide.
 6. La glucide du type A, chimiquement pure et cristalline, précipitait par le serum homologue au taux de 1 p. 500.000.000. Comme la substance glucido-lipidique elle avait la propriété d'être un antigène complet, c'est à dire de faire naître par injections à l'animal (la souris) des anticorps spécifiques.
 7. Le serum anti-glucide du type A précipitait spécifiquement la glucide du type A, ne réagissait pas avec la glucide du type C.
 8. Par injections répétées de la glucide pure la souris acquérait parfois une immunité active.
-

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Aus einem Kapsel tragenden Stamm von *Bakterium pneumoniae* Typ A (Frankland) wurde ein Lipoïd-Polysaccharid isoliert, das bis zu einer Verdünnung von 1:1.000.000.000 eine spezifische Praecipitationsreaktion mit dem homologen Antiserum gab.
 2. Dieser Stoff konnte durch Hydrolyse mit Eisessig in der Kälte in ein Phosphorlipoïd und ein Polysaccharid gespalten werden.
 3. Das Lipoïd war ein Phosphatid der Lecithin-Kephalin-Gruppe, es war an Kalzium gebunden.
 4. Das krystallinische Polysaccharid, das Eiweiss- und Lipoïd-frei war, enthielt d-Fruktose, eine Uronsäure und wahrscheinlich ein Disaccharid.
 5. Der spezifische Stoff aus dem C-Typ bestand im Gegensatz zu dem aus dem A-Typ aus viel Eiweiss, viel Lipoïd und wenig Polysaccharid.
 6. Das chemisch reine, krystallisierte Polysaccharid aus dem A-Typ, das mit dem homologen Antiserum einen Praecipitationstiter von 1:500.000.000 gab, war wie das Lipoïd-Saccharid aus dem A-Typ ein vollwertiges Antigen, also imstande, bei der Maus Antikörper zu erregen.
 7. Das Anti-Polysaccharid-Serum des A-Typs war spezifisch und reagierte nicht mit dem Polysaccharid aus *B. pneumoniae* Typ C.
 8. Aktive Immunität konnte nach wiederholten Injektionen des chemisch reinen Polysaccharids bei der Maus in einem Teil der Fälle erzeugt werden.
-

SUMMARY.

1. From an encapsulated strain of *Bacterium pneumoniae* type A (Frankland) we isolated a substance, which gave a type-specific precipitin reaction with the homologous immune serum in a dilution of 1 in 1000.000.000.
 2. On hydrolysis in the cold with glacial acetic acid this substance yields a lipoid and a polysaccharide.
 3. The lipoid turned out to be a phosphatide from the group lecithin-kephalin, and was linked to calcium.
 4. The protein- and lipoid-free, crystalline polysaccharide was composed of d-fructose, an uronic acid and a third substance, which is probably a disaccharide.
 5. In contrast with the specific substance from the C-type, which consisted of *much* protein and lipoid, but of little polysaccharide the specific substance from the A-type consisted of *little* protein and lipoid, but of much polysaccharide.
 6. The chemical pure, crystalline polysaccharide from the A-type gave a specific precipitation in a dilution of 1 in 500.000.000 with the homologous antiserum. Just like the lipoid-polysaccharide it was a complete antigen, because it gave rise to the development of specific antibodies on injection into animals (mouse).
 7. The polysaccharide antiserum of the A-type was type-specific, reacting not at all with the polysaccharide of the C-type.
 8. Sometimes an active immunity could be produced by repeated injections of the chemical pure polysaccharide into the mouse.
-

L I T E R A T U U R .

- Anally (B. A. Mc.) en Smedley-Maclean (I.) Biochem. J. 1937, 31, 72.
 van As (J.) Diss. 1939, A'dam.
 Avery (O. T.) en Goebel (W. F.) J. exp. Med. 1933, 58, 731.
 Avery (O. T.) en Morgan (H. J.) J. exp. Med. 1925, 42, 347.
 Beeson (P.) en Goebel (W. F.) J. exp. Med. 1939, 70, 239.
 Bell en Doisy J. of Biol. Chem. 1920, 44, 55.
 Bierry (H.) C. r. Soc. Biol. 1934, 115, 1168.
 Bleyer (B.) en Diemair (W.) . Biochem. Z. 1931, 235, 243.
 Boivin (A.) en Mesrobeanu (L.) C. r. Soc. Biol. 1933, 114, 307 en 115, 306.
 C. r. Soc. Biol. 1934, 118, 612; 1937, 124, 1177.
 Bottema (J. K.) Diss. 1940, Utrecht.
 Brahn (B.) en Schiff (F.) . . . Klin. W. schr. 1929, p. 1523.
 Briggs Zie o.a. Gorter en de Graaff, Klinische Diagnostiek 1940.
 Brown (Rachel) J. Immunol. 1939, 37, 445.
 Bruce-White J. Path. a. Bact. 1940, 50, 160.
 Challinor (S. W.), Haworth (W. N.) en Hirst (E. L.) . . . J. chem. Soc. 1931, p. 258.
 Denigès C. r. Soc. Biol. 1921, 17, 1974.
 Diemair (W.) en Weiss (K.) . . Biochem. Z. 1939, 302, 112.
 Dochez (A. R.) en Avery (O. T.) J. exp. Med. 1917, 26, 477.
 Enders (J. F.) en Chao-Jen-Wu J. exp. Med. 1934, 60, 127.
 Felton (L.) Amer. J. Publ. Health 1940, 30, 361.
 Felton (L.) en Prescott (B.) . . J. Bact. 1939, 38, 579.
 Finland (M.) en Curnen (E.) . . J. Immunol. 1940, 38, 457.
 Freudenberg (K.) en Eichel (H.) Liebig's. Ann. 1934, 510, 240.
 Freudenberg (K.) en Eichel (H.) Liebig's. Ann. 1935, 518, 97.
 Goebel (W. F.) J. of Biol. Chem. 1927, 74, 619.
 Goebel (W. F.) J. exp. Med. 1938, 68, 469 en 1939, 69, 353.
 Goebel (W. F.) en Avery (O. T.) J. exp. Med. 1927, 46, 601.
 Goebel (W. F.), Avery (O. T.) en Babers (F. H.) J. exp. Med. 1934, 60, 599.
 Goebel (W. F.), Beeson (P.) en Hoogland J. of Biol. Chem. 1939, 129, 455.
 Goebel (W. F.) en Goodner . . . J. of Biol. Chem. 1936, 114, 40.

- Goebel (W. F.) en
Hotchkiss (R. D.) J. exp. Med. 1937, 66, 191.
- Goslings (W. R. O.) en
Snijders (E. P.) Z. f. Bakt. Orig. 1936, 136, 1.
- de Graaff (W. C.) Ant. v. Leeuw. 1936, 3, 18.
- Heidelberger (M.) en
Avery (O. T.) J. exp. Med. 1923, 38, 73 en 40,
301.
- Heidelberger (M.), Avery
(O.T.) en Goebel (W. F.) . . . J. exp. Med. 1929, 49, 847.
- Heidelberger (M.) en Goebel
(W. F.) J. of Biol. Chem. 1927, 74, 613.
- Heidelberger (M.), Goebel
(W. F.) en Avery (O. T.) . . . J. exp. Med. 1925, 42, 701, 727.
- Heidelberger (M.) en
Kendall (F. E.) J. of Biol. Chem. 1929, 84, 639.
- Heidelberger (M.) en
Kendall (F. E.) J. Immunol. 1936, 30, 267.
- Heidelberger (M.), Kendall
(F. E.) en Scherp (H. W.) . . . Proc. Soc. exp. Biol. 1935, 33, 188
en 445.
- Heidelberger, Kendall en
Scherp J. exp. Med. 1936, 64, 559.
- Heidelberger, Menzel en Kendall
Hornus (G.) en Grabar (P.) . . . J. Bact. 1936, 31, 68.
C. r. Soc. Biol. 1940, 133, 58.
- Ivanovics (G.) Zeitschr. Imm. 1940, 98, 373.
- Julianelle (L. A.) (1) J. exp. Med. 1926, 44, 113.
- Julianelle (L. A.) (2) J. exp. Med. 1926, 44, 683.
- Julianelle (L. A.) J. exp. Med. 1930, 50, 539.
- Kendall, Heidelberger en
Dawson (M. H.) J. of Biol. Chem. 1937, 118, 61.
- Kolle en Hetsch Bacteriologie 1938, p. 428.
- Kurotchkin (T. J.) en
Wong (S. C.) Proc. Soc. exp. Biol. 1938, 38, 113.
- Landsteiner (K.) The specificity of serol. react.
1936.
- Levene, Mori en Rothen J. of Biol. Chem. 1929, 79, 63.
- Lévy-Bruhl (M.) en Jeanne
Courtois Ann. Inst. Pasteur 1940, 64, 316.
- ter Meulen (H.) Recueil 1934, T. 53 No. 2.
- ter Meulen (H.) en Heslinga (J.) Nieuwe methoden voor Elementair-
analyse 1930, p. 40.
- Meyer (K.) en Palmer (S. W.) . . J. of Biol. Chem. 1936, 114, 689.
- Morgan (W. T. J.) Biochem. J. 1936, 30, 909.
- Morgan (H. R.) en Beckwith
(T. B.) J. Bact. 1939, 37, 389.
- Morgan (W. T. J.) en
Partridge (S. M.) Nature 1939, 143, 1025.
- Neuberger (A.) en Yuill (M. E.) Biochem. J. 1940, 34, 109.

- Peters (J. P.) en van Slyke (D. D.) Quantitatieve Clinical. Chemistry 1932, p. 385.
- Petterson (A.) Zeitschr., Imm. 1940, 99, 142.
- Postic, Rabaté en Courtois J. de Pharm. et Chem. 1942, 9, 122.
- Reeson (P.) en Goebel (W. F.) J. Immunol. 1940, 38, 231.
- Rimington (C.) Biochem. J. 1931, 25, 1062.
- Roepke Z. f. Analyt. Chemie 1937, 108, 77.
- Sevag (M. G.) Biochem. Z. 1934, 273, 419.
- Steinhoff (G.) Z. f. Analyt. Chemie 1938, 115, 366.
- Toenissen (E.) Z. f. Bact. Orig. 1920, 85, 225.
- Tomczik (J.) Proc. Soc. exp. Biol. 1927, 24, 810.
- Vedder (A.) Leerboek der Bacteriologie en Immunologie 1935, p. 30.
- Walker (J.) Biochem. J. 1940, 34, 325.
- Wieghard (C. W.) en Julianelle (L. A.) J. exp. Med. 1935, 62, 23.
- Wielenga (D. K.) Diss. Amsterdam 1937.
- Witebsky, Neter en Sobotka J. exp. Med. 1935, 61, 703.
- Wong (S. C.) Proc. Soc. exp. Biol. 1938, 38, 107.
- Wong (S. C.) en Kurotchkin (T. J.) Proc. Soc. exp. Biol. 1939, 40, 357.
- Zozaya (J.) J. exp. Med. 1932, 55, 325.
- Zozaya (J.) en Clark (J.) J. exp. Med. 1933, 57, 21.

LIJST VAN AFKORTINGEN.

A.	= Aethylalkohol (96 %).
Lo. E.	= Lovibond-Eenheid.
L.	= Lipoïd.
L.-P.	= Lipoïd-Polysaccharide.
L.-P.-E.	= Lipoïd-Polysaccharide-Eiwit.
L.-P. FXX	= Lipoïd-Polysaccharide uit de FXX-stam.
P.	= Polysaccharide.
P. FXX.	= Polysaccharide uit de FXX- stam.

9/6

ms 256

STELLINGEN

I

De specificiteit der kapselstoffen wordt bepaald door de groepeerings der polysacchariden en niet door de chemische structuur der hydrolyse-producten.

Dit proefschrift, p. 86.

II

De identificatie van typhus-bacteriën kan, door alléén gebruik te maken van serologische reacties, binnen zeer korten tijd, eenvoudig en afdoende geschieden.

Kauffmann (F.), Die Bakteriologie der Salmonella-Gruppe p. 169.

III

Ten onrechte meent V a r g h a de constitutie van het benzal-d-sorbiet te hebben bewezen.

V a r g h a (L. v.), Ber. 68, 18, (1935).

IV

De door E n d e r s afgeleide conclusie, dat in 10% natronloog het maltose-molecuul als zoodanig niet bestaat, maar praktisch slechts als een oplossing van triose X, respectievelijk van methylglyoxaal voorkomt, is niet verantwoord.

E n d e r s (C.), Biochem. Z. 313, 18, (1943).

v a n O s (F. H. L.), Diss. Utrecht (1942), p. 119.

V

De voorstelling van Wassiljew over de inwerking van kleine hoeveelheden alkoholen op albumine-solen geeft van de optredende coagulatie-verschijnselen een verklaring, die zeer goed in overeenstemming is met de feiten. Hiermee wordt ook de algemeen toegepaste methode van Sevag, ter onteiwitting van bacterie-suspensies of specifieke stoffen, begrijpelijk.

Wassiljew (S. S.), *Acta Phys. U.R.S.S.* 9, 942, (1938).
Sevag (M. G.), *Biochem. Z.* 273, 419, (1934).

VI

Cerisulfaat is, in zure oplossing, een bestendig sterk oxydatie-middel, en biedt groote voordeelen boven het gebruik van kalium-permanganaat in de oxydometrie.

VII

Het onderzoek van Lebduska en Pidra, over de anti-septische werking van dampen uit vaste stoffen, levert geen bewijs voor de onwerkzaamheid van jodoform.

Lebduska (J.) en Pidra (J.), *Z. f. Bakt. Orig.* 145, 425, (1940).

Meyer (R.), *Z. f. Bakt. Orig.* 146, 296, (1940).

VIII

Indien precipitatie-reacties even gemakkelijk microscopisch waren uit te voeren als agglutinatie-reacties zou dit een groot voordeel beteekenen.

W. J. ALSCHE.

U
1