

OND.

2

ONDERZOEKINGEN EN MEDEDEELINGEN
UIT HET INSTITUUT
VOOR PRAEVENTIEVE GENEESKUNDE

No. 2

Over een positieve reactie van Bordet-Wassermann,
verkregen met een serum tegen longweefsel en een
vaccine-immuunserum

door

ONG SIAN GWAN

1943

H. E. STENFERT KROESE'S UITGEVERS-MIJ N.V.
LEIDEN

1e ex.

OND.

2
①

H
026
1)

Over een positieve reactie van Bordet-Wassermann,
verkregen met een serum tegen longweefsel en een
vaccine-immuunserum

door

ONG SIAN GWAN

1. In den loop van onze onderzoekingen over de bereiding van een serum tegen longweefsel zijn de volgende resultaten verkregen (1):

- a. het is mogelijk een immuunserum te verkrijgen dat zoowel met zuiver uit de long geïsoleerde eiwitten als met een waterig long-extract een positieve complementbindingsreactie geeft;
- b. hetzelfde resultaat werd ook verkregen door uit de long ge-extraheerde lipoiden als antigeen te gebruiken.

Men kan zich dus afvragen of het aldus verkregen serum tegen longweefsel niet een positieve complementbindingsreactie zou kunnen geven met een antigeen van BORDET-RUELENS, dat men in de reactie van BORDET-WASSERMANN gebruikt. Het is bekend, dat dit antigeen een alcoholisch extract is van runderhart; het bevat lipoiden die onoplosbaar zijn in aceton, met name phosphatiden: kephalinen en lecithinen.

De in deze onderzoekingen verkregen resultaten bewijzen dat deze gedachtengang juist is: het serum tegen longweefsel geeft een positieve reactie van BORDET-WASSERMANN. Bovendien werd nog een ander, onverwacht resultaat verkregen, nl. dat het serum van een met dermovaccine of neurovaccine ingespoten konijn niet alleen een positieve reactie van BORDET-WASSERMANN, maar tevens een positieve complementbindingsreactie geeft met eiwitten en lipoiden die uit een varkenslong zijn geïsoleerd. Ook veroorzaakt de intraveneuse inspuiting van een met keukenzout verdund antigeen van BORDET-RUELENS bij een konijn, dat tevoren is ingespoten met dermovaccine of neurovaccine, een groote vermeerdering van amboceptoren tegen het antigeen van BORDET-WASSERMANN, en tegen de uit varkenslong geïsoleerde lipoiden en eiwitten.

Ter vergelijking werd het serum van 12 nieuwe konijnen onder-

zoekt. Men weet sedert langen tijd dat konijnenserum een positieve reactie van BORDET-WASSERMANN kan geven.

2. *Techniek*

De gebruikte techniek voor de complementbindingsreactie was die van BESREDKA (2). De reactie wordt direct, na een uur en na 15 à 20 uur afgelezen. Indien de reactie sterk positief is, herhaalt men haar met verdund serum, terwijl men met deze verdunning rekening houdt. Het resultaat wordt uitgedrukt in het aantal complement-eenheden (een complementeenheid is gelijk aan 1 c.c. versch cavia-serum in een verdunning van 1 : 15) gebonden door 1 c.c. serum.

Om een vergelijkbaar resultaat te verkrijgen wordt het complement volgens MASSOL en NOWACZYNSKY bewaard door 10 vol. versch serum te mengen met 1 vol. verzadigde keukenzoutoplossing (3). Dit mengsel blijft bij -17° C. gedurende 2 à 3 maanden goed. Wij moeten evenwel opmerken, dat het bewaren van complement in vloeibare lucht (-190° C.), waar wij onlangs op gewezen hebben, veel doeltreffender is (4).

De zuivere eiwitten van de varkenslong werden verkregen door het waterig extract vier maal achtereen neer te slaan in de koude met aceton en te wasschen met aether. Het lipoidextract van de long werd verkregen in een Soxhlet-apparaat, uitgezonderd het alcoholisch extract. Dit werd verkregen door gedroogde long en alcohol te mengen en dit mengsel gedurende zes dagen te laten macereeren.

TABEL I

Resultaten van de complementbindingsreacties bij nieuwe konijnen

Konijn no.	Antigeen		
	Bordet-Ruelens	Alcoholisch extract van varkenslong	Eiwitten van varkenslong
1	8	—	—
2	8	—	—
3	20	30	10
4	40	140	35
5	0	—	—
6	0	—	—
7	0	18	0
8	20	30	20
9	0	0	10
10	30	0	20
11	20	10	30
12	10	10	20
Totaal	156	238	145
Gemiddeld	13,0	29,8	18,1

3. Resultaten

Tabel 1 geeft de resultaten van de complementbindingsreacties met 12 normale konijnen weer. Wij zien hieruit, dat konijnenserum niet alleen een positieve complementbindingsreactie geeft met het antigeen van BORDET-RUELENS, maar ook met alcoholisch extract en met zuivere eiwitten van de varkenslong. De gemiddelde hoeveelheid door 1 c.c. serum gebonden complementeenheden bedraagt 13,0 voor het antigeen van BORDET-RUELENS, 29,8 eenheden voor alcoholisch extract van de varkenslong en 18,1 eenheden voor de zuivere, uit de varkenslong geïsoleerde eiwitten. Konijn 4 gaf een duidelijke complementbindingsreactie met alcoholisch extract, zonder dat wij de oorzaak konden vinden. Als men geen rekening houdt met het bij konijn 4 verkregen resultaat, zou de gemiddelde hoeveelheid door 1 c.c. serum gebonden complementeenheden met alcoholisch extract van de long 14,0 eenheden zijn.

TABEL 2

Resultaten van de complementbindingsreactie bij konijnen, ingespoten met longextract of vaccine

Antigeen	Konijn 25 (longextract)	Konijn 29 (longextract)	Konijn A (vaccine- titratie)			Konijn B (dermo- vaccine)			Konijn C (Neuro- vaccine)
			c_1	c_2	c_2/c_1	c_1	c_2	c_2/c_1	
longeiwitten	300	225	—	—		10	20	2,0	70
waterig longextr.	400	200	—	—		10	—		110
petroleum-aether- extr. v. d. long	450	70	—	100		100	—		300
acetoneextr. v. d. long	225	50	—	100		100	—		600
aetherextract v. d. long	225	50	—	200		125	—		600
Bordet-Ruelens..	300	100	10	175	17,5	125	250	2,0	750
Alcoholisch long- extract	150	130	—	300		140	325	3,3	1050

c_1 = Aantal complementeenheden gebonden door 1 c.c. serum na inspuiting van vaccine.

c_2 = Aantal complementeenheden gebonden door 1 c.c. serum na drie intraveneuze inspuitingen van antigeen van BORDET-RUELENS.

Vergelijken wij deze resultaten met die, welke verkregen zijn bij konijnen, die behandeld zijn met extract van varkenslong, neurovaccine of dermovaccine (tabel 2). Men ziet dan dat de sera van konijn 25 en 29, die meerdere intraveneuze inspuitingen met waterig extract van varkenslong hebben gehad, veel hooger waarden hebben gegeven dan die van een normaal konijn ¹⁾. De sterke positieve reacties werden niet slechts verkregen met specifieke eiwitten, maar ook met lipoiden van de long en met het antigeen van BORDET-RUELENS.

Dr. J. D. VERLINDE was zoo vriendelijk konijn A, B en C te vaccineeren. Het eerste werd gebruikt voor de virulentiebepaling van het vaccinevirus. Volgens de methode van GROTH ontving het hiertoe een aantal intracutane virusinspuitingen. Het tweede kreeg een intraveneuze inspuiting (0,5 c.c.) van dermovaccine in een verdunning van 1 : 10 dat gedurende een half uur op 70° C is verhit, en het derde kreeg een subcutane inspuiting van een mengsel van 1 c.c. neurovaccine in een verdunning van 1 : 10 en twee c.c. gelijke deelen lanoline-vaseline.

Het na 26 dagen verkregen serum van Konijn A gaf ternauwernood een positieve reactie van BORDET-WASSERMANN. Het serum van Konijn B daarentegen, dat 22 dagen na de inspuiting werd verkregen gaf duidelijke reacties met het antigeen van BORDET-RUELENS en met uit de long geïsoleerde lipoiden. Het resultaat met het serum van Konijn C, dat 37 dagen na de inspuiting is afgenomen, is echter nog belangrijker. Het serum geeft inderdaad niet slechts zeer duidelijke reacties met het antigeen van BORDET-RUELENS en met uit de long geïsoleerde lipoiden, maar ook met longeiwitten. Het alcoholisch extract gaf een buitengewoon hooge waarde (1050 eenheden).

Konijn A en B kregen vervolgens drie intraveneuze inspuitingen van 2 c.c. antigeen van BORDET-RUELENS verdund in 16 c.c. physiologische keukenzoutoplossing. Het eerste kreeg een heldere lipoidemulsie, terwijl het tweede een zeer ondoorschijnende emulsie kreeg. De titratie van het acht dagen na de laatste inspuiting verkregen serum gaf in beide gevallen een belangrijke vermeerdering van amboceptoren.

4. Verklaring van de verkregen resultaten

Het waterig extract van de varkenslong bevat eiwitten, lipoiden en waarschijnlijk lipoideiwitcomplexen. Het is dus duidelijk dat inspuiting van een dergelijk extract bij het dier antilichamen daartegen opwekt.

De lipoiden van varken en rund hebben een gelijke moleculaire groepeerings, want het serum tegen lipoiden van het varken is ook gericht tegen lipoiden van het rund (antigeen van BORDET-RUELENS).

¹⁾ Konijn 25 is bovendien subcutaan ingespoten met 10 c.c. van een mengsel bestaande uit 1 vol. longextract en 2 vol. gelijke deelen lanoline-vaseline. De lanoline-vaseline hebben wij gebruikt bij de praeventieve of curatieve enting tegen tuberculose (Zeitschrift f. Immunitätsf., 1939, 96, 334—352).

Wij moeten opmerken dat het varken noch het rund het antigeen van FORSSMAN bezitten, wat het verkregen resultaat zou hebben kunnen verklaren.

Wat betreft het immuunserum, verkregen na inspuiting van neurovaccine, dat niet anders is dan konijnenhersenen en vaccinevirus, zou men kunnen denken, dat het serum orgaan-specifieke antilichamen bevat tegen de hersenen. Daar de hersenen bestaan uit eiwitten, lipoiden en waarschijnlijk lipoid-eiwitcomplexen, zou men dus antilichamen moeten verkrijgen tegen eiwitten en lipoiden van de hersenen. En daar het aldus verkregen immuunserum ook gericht is tegen het antigeen van BORDET-RUELENS en tegen lipoiden van de varkenslong, kan men hieruit opmaken, dat de lipoiden van konijn, rund en varken een zelfde moleculaire groepeerings hebben. Ook het konijn bezit het antigeen van FORSSMAN niet.

En hoe kan men de duidelijke vermeerdering van antilichamen tegen eiwitten van de varkenslong na inspuiting van neurovaccine verklaren? Het gaat hier waarschijnlijk om een niet-specifieke vermeerdering van normale antilichamen (tabel 1) na inspuiting van neurovaccine. Wij hebben inderdaad er reeds op gewezen, dat bij den mensch verscheidene ziekten als syphilis, tuberculose en gonorrhoe de normale agglutinenen voor den colibacil kunnen doen vermeerderen (5). In samenwerking met Dr. KOURILSKY hebben wij proeven genomen bij ziekenhuispatiënten en constateerden dat de lijders aan tuberculose en vooral personen met leveraandoeningen zeer sterk agglutinenen tegen den colibacil hebben (6).

Inspuiting met verhit dermovaccine verhoogt eveneens de antilichamen tegen lipoiden van rund en varken. Volgens HUGHES, PARKER en RIVERS bevat het vaccinevirus 81,6 à 83,4 % eiwitten en 6,5 à 10,2 % lipoiden (7). Inspuiting van vaccinevirus zou dus waarschijnlijk de vorming van antilichamen, gericht tegen lipoiden bevorderen. Het voorgaande resultaat verkregen met het neurovaccine zou eveneens op deze manier verklaard kunnen worden.

Door F. KLOPSTOCK (1926) is verondersteld dat de positieve reactie van BORDET-WASSERMANN wordt veroorzaakt doordat de spirochaeta pallida zelf lipoiden bevatten en hierdoor antilichamen tegen lipoiden worden gevormd. Indien men kan aantonen dat de spirochaeta pallida lipoiden bevatten dan zou deze verklaring overeenkomen met onze resultaten en ons lijkt de hypothese van KLOPSTOCK voor het ontstaan van de positieve reactie van BORDET-WASSERMANN het meest waarschijnlijk.

Men zou tenslotte het na de inspuiting van lipoiden van het rund verkregen resultaat op verschillende wijzen kunnen verklaren (antigeen van BORDET-RUELENS). Ten eerste zou men zich kunnen voorstellen, dat inspuiting van lipoiden een niet-specifieke vermeerdering van normale antilichamen zou veroorzaken. Ten tweede zou men kunnen denken, dat de lipoidemulsie nog zeer kleine hoeveelheden eiwitten bevat, die bij aanwezigheid van lipoiden als een antigeen werken.

Het antigeen van BORDET-RUELENS is een alcoholisch extract van runderhart, dat gedurende verscheidene dagen met aceton behandeld is, waardoor alle eiwitten zijn gecoalugeerd. Het is dus duidelijk, dat het alcoholisch extract slechts lipoiden bevat. Dit met een physiologische keukenzoutoplossing verdunde extract geeft inderdaad een negatieve reactie met het reagens van TANRET; ook de MILLON- en biureetreacties zijn negatief. Er blijft nu nog te onderzoeken of niet de inspuiting van lipoiden zelf, in tegenstelling met de algemeene opvatting, een specifieke vorming van antilichamen veroorzaakt. De resultaten van de onderzoekingen, die wij hebben verkregen pleiten voor de laatste opvatting.

(Instituut voor Praeventieve Geneeskunde
en Kamerlingh Onnes laboratorium.)

Leiden, 19 October 1942.

LITERATUUR.

- (1) ONG SIAN GWAN, Verslagen Ned. Akad. v. Wetensch. 1943, 52, 40.
- (2) ONG SIAN GWAN, Zeitschrift f. Immunitätsf., 1941, 101, 13—39.
A. URBAIN, La réaction de fixation dans les tuberculoses humaines et animales. 2e édition, Paris, MASSON et Cie 1939.
- (3) MASSOL et NOWACZYNSKY, C. R. Soc. Biol. 1910, 69, 430.
- (4) ONG SIAN GWAN, Proc. Ned. Akad. v. Wetensch., Amsterdam, 1940, 43, 1133 en 1250.
- (5) ONG SIAN GWAN, C. R. Soc. Biol., 1934, 115, 587 en 695.
- (6) R. KOURILSKY en ONG SIAN GWAN, C. R. Soc. Biol., 1934, 117, 855 en 857.
- (7) TH. P. HUGHES, R. F. PARKER en T. M. RIVERS, J. Exp. Med. 1935, 62, 349.