

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR
PRAEVENTIEVE GENEESKUNDE - LEIDEN

ONDERZOEKINGEN OVER DE NEUTRALISATIE- EN
HAEMAGGLUTINATIEREMMINGSREACTIE
BIJ ENIGE VIRUS-INFECTIES

Uit de Afdeling voor Bacteriologie en Experimentele Pathologie
van het Nederlands Instituut voor Praeventieve Geneeskunde
Leiden

STELLINGEN

STELLINGEN

I

Men dient de opvatting, dat de „antigene structuur” van dierlijke cellen door het kweken in homoloog medium zou kunnen veranderen, te laten varen.

II

Er bestaan aanwijzingen dat de antilichamen, welke na een reeks experimentele en wellicht ook natuurlijke besmettingen gevormd worden, specifiekere kunnen zijn dan na een enkele besmetting.

III

De stijging der ongevoeligheid van micro-organismen voor antibiotica kan niet alleen door mutatie van deze micro-organismen, noch uitsluitend door inductie van de antibiotica verklaard worden.

IV

Het is wenselijk (in wetenschappelijke verhandelingen) de begrippen leugenachtigheid en steelzucht niet te verbinden met het gedrag van een kind beneden het zesde jaar, ook al wekt het kind de indruk zelf goed te weten, dat het zich misdraagt.

V

Dat Bunyamweravirus zich in de cellen van Ehrlich's ascites tumor vermenigvuldigt, waardoor deze tumor te gronde gaat, is onvoldoende geargumenteed. (R. Love, H. Koprowski en H. R. Cox: *Cancer Research*, 13, 350, 1953).

VI

De onaangename gewaarwordingen optredende bij langdurig verblijf in centraal verwarmde ruimten, kunnen door eenvoudige maatregelen worden voorkomen.

VII

In de differentiaal diagnose van lymfomen moet toxoplasmosis opgenomen worden.

VIII

Het is de taak van de arts „mens sana in corpore sano” te bevorderen, doch hij moet beseffen, dat door ziek-zijn en lijden de mens een zekere afstand kan krijgen ten opzichte van zijn psychofysisch bestaan en daardoor zijn diepste menselijkheid kan vinden.

ONDERZOEKINGEN OVER DE NEUTRALISATIE- EN
HAEMAGGLUTINATIEREMMINGSREACTIE

BIJ ENIGE VIRUS-INFECTIES

(WITH A SUMMARY IN ENGLISH)

kg
w 19
2)

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR
IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJSUNIVERSITEIT
TE LEIDEN, OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS
Mr J. M. VAN BEMMELEN, HOGLERAAR IN DE
FACULTEIT DER RECHTSGELEERDHEID, TEGEN DE
BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE
TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG 14 OCTOBER 1953
TE 14 UUR

DOOR

PAULINE WALLER-FETTER

GEBOREN TE ROTTERDAM IN 1925

1953

H. E. STENFERT KROESE N.V. - LEIDEN

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR
PRAEVENTIEVE GENEESKUNDE - LEIDEN

515/53

PROMOTOR: PROFESSOR DR J. D. VERLINDE

*Aan mijn ouders,
aan mijn man*

INHOUD

	blz.
Inleiding	ix
I. Variola- en Vacciniavirus (Haemagglutinatieremmende en neutraliserende antilichamen)	1
II. Influenzavirus (Haemagglutinatieremmende en neutraliserende antilichamen)	22
III. Columbia SK-virus (Haemagglutinatieremmende en neutraliserende antilichamen)	42
IV. Beschouwingen	52
V. Samenvatting en conclusies	61
Summary	66
Literatuur	70

INLEIDING

De ontdekking, dat verscheidene virussoorten in staat zijn erythrocyten te doen agglutineren en dat deze haemagglutinatie specifiek kan worden geremd door homoloog antiserum, heeft ertoe geleid, dat het aantonen en de titratie van antilichamen tegen deze virussen thans algemeen geschiedt met behulp van de haemagglutinatieremmingsreactie.

De meningen lopen uiteen over de vraag of de haemagglutinatieremmende en de neutraliserende antilichamen al dan niet identiek zijn en of zij betekenis hebben voor de immuniteit.

Bij influenza-reconvalescentensera werd een lineaire correlatie aangenomen tussen de antilichaamtiters, verkregen met de haemagglutinatieremmingsreactie en de neutralisatiereactie (HIRST, 1942). Latere onderzoekers (BURNET en BEVERIDGE, 1943; FRIEDEWALD, 1944; STUART-HARRIS en MILLER, 1947) trokken HIRST's opvatting in twijfel. MAGRASSI en MURATORI (1937) deden vaccinatieproefnemingen met dood en levend vacciniavirus. De hoeveelheid neutraliserende antilichamen bleek bij titratie in beide gevallen gelijk te zijn; de immuniteit voor de vaccinia-infectie was echter verschillend. CHU toonde in 1948 aan, dat de neutraliserende en haemagglutinatieremmende antilichamen niet identiek waren in vaccinia-reconvalescentensera van een konijn. McCARTHY en DOWNIE (1953) vonden de beide soorten antilichamen in de sera van alastrim-patiënten vanaf 10 dagen na het begin der ziekte. De antilichamen van de Columbia SK-groep kunnen eveneens o.a. met de haemagglutinatieremmingsreactie en met neutralisatiereacties in vivo worden bepaald en men neemt in het algemeen geen constante relatie tussen de respectieve uitkomsten waar (JUNGBLUT en HORVATH, 1951; GARD en HELLER, 1951).

Het doel van het hier te beschrijven onderzoek is, na te gaan in hoeverre de titers der haemagglutinatieremmende en neutraliserende antilichamen van een aantal immuunsera tegen drie virussen correleren. Indien een lineaire correlatie kan worden aangetoond, wordt de hypothese dat deze beide soorten antilichamen identiek zijn immers

aannemelijk, tenzij beide soorten antilichamen op een gelijk tijdstip en in evenredige mate gevormd worden. Maar ook dan kan men, evenals bij identieke antilichamen, aan de haemagglutinatieremmings-titer relatief een even grote waarde toekennen als aan de neutralisatie-titer (wanneer er geen factoren bestaan, welke haemagglutinatieremmingstiter en neutralisatietiter onevenredig verstoren). Dit is van het grootste belang, omdat haemagglutinatieremmingsreacties bij de drie te onderzoeken virus-infecties eenvoudiger te verrichten, goedkoper en minder tijdrovend zijn dan neutralisatiereacties.

I

NEUTRALISERENDE EN HAEMAGGLUTINATIE- REMMENDE ANTILICHAMEN BIJ VARIOLA-VACCINIA

Er bestaat een zeer nauwe antigene verwantschap tussen het variola- en het vacciniavirus. De pathogeniteit van beide virussen is gebonden aan de elementairlichaampjes, terwijl een antigeen dat door centrifugatie of door adsorptie aan kippenerythrocyten van de elementairlichaampjes kan worden gescheiden (BURNET en STONE, 1946), verantwoordelijk is voor het haemagglutinerend vermogen.

Antilichamen tegen het haemagglutinine kunnen met behulp van de haemagglutineremmingsreactie worden aangetoond. Neutraliserende antilichamen kunnen in vivo (konijnenhuid, muizenhersenen of in ovo) worden aangetoond. De neutralisatiereactie in ovo wijkt echter volgens HAAGEN en CRODEL (1939—'40), wat resultaten betreft, aanzienlijk af van de beide andere reacties in vivo. HAAGEN meent, dat embryo's anders reageren dan volwassen dieren op de zelfde antigeen-antilichaam mengsels. HAAGEN en CRODEL hebben de overtuiging, dat het aantal pokken op het chorio-allantoïsvlies geen maat is voor de virulentie van het vacciniavirus, noch voor het aantal deeltjes, waarmee men infecteerde. KEOGH (1936) daarentegen meent, dat de titer van een vaccinia-suspensie door de telling van eilaesies verkregen, correspondeert met die, welke door intradermale enting van verschillende virusverduunningen in de konijnenhuid is bepaald. Neutraliserende antilichamen kunnen dan ook naar zijn mening in ovo worden getitreerd door telling van de laesies op de chorio-allantoïsmembraan. DOWNIE en DUMBELL (1947) schrijven, dat deze zogenaamde pock-counting test even waardevol is als de complementbindingsreactie. BLATTNER, HEYS en GOLLUP (1943) voerden in ovo neutralisatiereacties uit met 10 à 12 E.I.D. (egg infecting dose) virus en verkregen goede resultaten, en wel de beste, indien zij eerst het serum en later pas het virus aan het ei toedienden, zoals BURNET en LUSH (1939) en SHAFFER en ENDERS (1939) het bij herpesvirus deden.

CHU (1948) vond met behulp van absorptieproeven van vaccinia-reconvalescentenserum, dat de neutraliserende en haemagglutinerende antilichamen bij vaccinia niet identiek zijn. Bovendien vond DOWNIE (1951), dat bij variola-vaccinia-infecties de complementbindende antilichamen na enkele maanden en de haemagglutinerende antilichamen na 1 of 2 jaar niet meer aanwezig waren (dit laatste werd eveneens door COLLIER vermeld in 1951), terwijl de neutraliserende vele jaren langer aanwezig bleven. McCARTHY en DOWNIE (1953) onderzochten de sera van een aantal alastrimpatiënten op complementbindende, haemagglutinerende en neutraliserende antilichamen. Volgens hen kan men slechts zeggen, dat de respectieve reacties na 10 dagen vanaf het begin der ziekte positief zijn. Zij hechten aan de neutralisatiereactie (een sterk vereenvoudigde pock-counting test) geen quantitative waarde.

MATERIAAL EN TITRATIEMETHODEN

Virus

Het vacciniavirus was afkomstig van hier te lande voor de pokkenvaccinatie gebruikte kalverlymphe. Deze werd als 1 %-suspensie, na behandeling met 300—500 E. Penicilline (en eventueel 300 E. Streptomycine) per ml geënt op het chorio-allantoïsvlies van 10—11 dagen bebroede kippeneieren. Het virus werd geogst na drie dagen bebroeden bij een temperatuur van 36° C. De delen van de eivliezen, waarop de vaccinia-laesies aanwezig waren, werden bewaard bij — 20° C. Op gezette tijden werden nieuwe eipassages gemaakt.

Het variolavirus was geïsoleerd in het Nederlands Instituut voor Praeventieve Geneeskunde tijdens de pokkenepidemie van 1951 te Tilburg.

Sera

De sera, waarmee de titraties op antilichamen werden verricht, zijn afkomstig van:

- 1e. patiënten uit de Tilburgse epidemie, die lijdende waren aan of hersteld waren van variola.
- 2e. personen met vaccinia generalisata na vaccinatie.
- 3e. konijnen, die met vacciniavirus waren besmet.
- 4e. konijnen, die 4 maal met tussenposen van 5 dagen 1 ml van een 20 %-variola- of vaccinia-eivliezen-suspensie intramusculair toegediend kregen, al dan niet tevoren 60 min. op 70° C verhit. Het bloed werd 14 dagen na de laatste inspuiting afgenomen.
- 5e. „normale” mensen en konijnen.

Erythrocyten

Niet alle kippenerythrocyten zijn bruikbaar voor de haemagglutinatie met variola- of vacciniavirus (COLLIER, 1949). CLARK en NAGLER (1943) vonden, dat de erythrocyten van slechts 50 % der kippen te gebruiken waren. Onderstaande tabel 1 geeft een overzicht van de agglutinabiliteit door vacciniavirus, waarbij de bovenstaande vloeistof van gecentrifugeerde 20 %-suspensies van fijngewreven gelaedeerde delen der besmette chorio-allantoïsvliezen werd gebruikt, van de erythrocyten van 17 kippen, beschikbaar voor ons onderzoek. De verdunningsvloeistof was steeds physiologische keukenzoutoplossing ($P_H = 7$).

TABEL I

Overzicht van de agglutinabiliteit van de erythrocyten der beschikbare kippen voor vacciniavirus

Percentage van de kippenerythrocyten, welke eventueel geagglutineerd werden	Haemagglutinatie-titer Vaccinia
25 %	geen haemaggl.
31 %	1 : 320
19 %	1 : 320/640
19 %	1 : 640
6 %	1 : 640/1280

Titratie van variola- of vaccinia-antilichamen door middel van de haemagglutinatieremmingsreactie

GINSBERG en HORSFALL (1949) beschrijven dat normaal serum een labiele component bezit, die zich bindt met verscheidene virussoorten en die zowel de haemagglutinatieremmingsreactie kan storen als de infectiviteit kan verminderen. Daarom werden in alle reacties die hier beschreven worden, de sera tevoren geïnactiveerd door verwarming gedurende 30 min. op een temperatuur van $56^{\circ} C$.

Van het geïnactiveerde serum wordt een tweevoudige verdunningsreeks gemaakt, te beginnen met onverdund serum. De verdunningsvloeistof is physiologische keukenzoutoplossing ($P_H = 7$). Elk (Wasserman)-buisje bevat 0,25 ml. Hieraan wordt 0,25 ml van een virus-suspensie toegevoegd, welke 8 A.E.virus (zie later) bevat. De serumvirus mengsels worden na goed schudden, gedurende 60 min. in een

waterbad met een temperatuur van 37° C geplaatst. Daarna wordt 0,5 ml kippenerythrocyten-suspensie (1 %-suspensie in physiologische keukenzoutoplossing) toegevoegd. In alle buizen bevindt zich nu 1 ml vloeistof. Men plaatst daarop de buizen bij een temperatuur van 4° C en leest na 1 uur en na 24 uur de resultaten af. De titer van het serum is de hoogste verdunning van het serum vermengd met virus, die nog de agglutinatie van de toegevoegde erythrocyten verhindert; de titer van het serum wordt dus aangegeven door tweemaal de oorspronkelijke verdunning!

De 8 A.E.virus (A.E. = agglutinatie-eenheid) waarover hierboven werd gesproken, worden met een voorafgaande virustitratie bepaald. Om het virus in suspensie te krijgen worden met vaccinia-laesies bedekte delen van besmette chorio-allantoïsvliezen fijngewreven met steriel glaspoeder en met physiologische keukenzoutoplossing tot een 20 %-suspensie verwerkt. Deze suspensie wordt 25 min. met een snelheid van 2500 omw./min. in een International clinical centrifuge gecentrifugeerd en de bovenstaande vloeistof afgepipetteerd. Voor de virustitratie wordt een tweevoudige verdunningsreeks van de bovenstaande vloeistof gemaakt en in elk van de buizen wordt 0,5 ml virus-suspensie en een gelijke hoeveelheid kippenerythrocyten-suspensie (1 %-suspensie in physiologische keukenzoutoplossing) gebracht. Virus en erythrocyten worden goed gemengd, waarna de buizen in een koelcel met een temperatuur van 4° C worden geplaatst. Na 1 uur en na 3 uur wordt afgelezen, welke virusverdunning nog juist deze 0,5 ml kippenerythrocyten-suspensie doet agglutineren. Dit noemt men 1 A.E.virus.

Bij elke antilichaamtiteratie moet een virus-, een serum- en een erythrocytencontrôle worden verricht, waaruit moet blijken dat de gekozen hoeveelheid A.E.virus de erythrocyten inderdaad doet agglutineren, terwijl de erythrocyten niet auto-agglutinabel mogen zijn. Evenmin mag het serum in de serumcontrôle de erythrocyten, welke gebruikt worden, doen agglutineren.

COLLIER en VAN THIEL (1949) beschrijven deze reactie voor variolavirus met andere hoeveelheden serum, virus en kippenerythrocyten. Wij variëerden deze hoeveelheden met het oog op de eenheid in de haemagglutineringsremmingsreactie van variola-, vaccinia-, influenza- en Columbia SK-virus. Terwille van deze zelfde eenheid verdisconteren wij niet de verdunning door de kippenerythrocyten-oplossing teweeggebracht, bij het vermelden van de virustiters.

Het aantal A.E.variola- en vacciniavirus beïnvloeden evenredig de titer van het serum in deze haemagglutinatieremmingsreactie, zoals getoond wordt in de onderstaande tabellen 2 en 3. Door middel van een voorafgaande titratie werden variolavirus-suspensies bereid, die 1, 2, 4, 8 respectievelijk 16 A.E.virus bevatten. Van het serum werden de verdunningen aangegeven, zoals zij waren voordat de erythrocyten-suspensie werd toegevoegd.

TABEL 2

Invloed van het aantal A.E.variolavirus op de haemagglutinatieremmingstiter van een homolog antiserum

Variola- virus A.E.	Serumverdunningen variola-reconvalescentenserum (mens)													
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	1/8192	1/16384
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+
8	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	±	+	+	+
16	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Eveneens door middel van een voorafgaande titratie werden vacciniavirus-suspensies bereid, die 1, 2, 4, 8, 16, 32 respectievelijk 64 A.E.virus bevatten.

TABEL 3

Invloed van het aantal A.E.vacciniavirus op de haemagglutinatieremmingstiter van een anti-variola-serum

Vaccinia- virus A.E.	Serumverdunningen variola-reconvalescentenserum (mens)													
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	1/8192	1/16384
1	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
2	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
4	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+
8	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+
16	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
32	±	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
64	+	+	±	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

+ = haemagglutinatie
 ± = dubieuze haemagglutinatie
 - = geen haemagglutinatie

De haemagglutinatie, die op de tabellen 2 en 3 staat aangegeven bij de laagste serumverdunding, is de zelfde haemagglutinatie die het contrôlebuisje, waarin zich slechts serum en erythrocyten-suspensie bevindt, laat zien.

Als contrôle voor deze haemagglutinatiereactie werden enige malen de chorio-allantoïsvliezen van niet-besmette 13 tot en met 17 dagen oude kippenembryonen in 20 %-suspensie gebracht met physiologische keukenzoutoplossing (PH = 7). Tabel 4 laat zien, dat de normale chorio-allantoïsvliezen van 16 en 17 dagen oude embryonen kippenerythrocyten tot lage titer kunnen doen agglutineren, maar dat vliezen van 12 tot en met 15 dagen oude embryonen daartoe niet in staat zijn. Indien men variola- of vacciniavirus kweekt op chorio-allantoïsvliezen van 10—11 dagen oude bebroede eieren en men oogst de vliezen na 48—72 uur, zullen de vliezen nooit ouder zijn dan 14 dagen.

TABEL 4
Gedrag van normale allantoïsvliezen van 12 tot en met 17 dagen oude embryonen ten opzichte van kippenerythrocyten

Normale chorio-allantoïsvliezen	Haemaggl. titer
12 d.	geen haemaggl.
13 d.	„
14 d.	„
15 d.	„
16 d.	geen haemaggl. tot 1 : 10
17 d.	1 : 10 tot 1 : 40

Eveneens als contrôle werden enige weken haemagglutinatieremmingsreacties uitgevoerd met normaal konijnenserum en foetaal menselijk serum. Beide sera brachten geen haemagglutinatieremming tot stand. STONE en BURNET (1946) namen een aspecifieke haemagglutinatie waar (van lipoiden), wanneer men een suspensie van vaccinia-chorio-allantoïsvliezen bij voorbeeld 10 dagen laat staan en deze wordt geremd door normaal serum. Contrôlereacties met normaal serum zijn daarom zeer belangrijk.

De invloed, die de PH van de verdunningsvloeistof heeft op deze haemagglutinatiereactie, wordt weergegeven in tabel 5:

TABEL 5

Virus	Haemaggl. titer bij phys. NaCl-oplossing met een PH van:		
	5.5	6	7
Vacciniavliezen	1 : 160	1 : 320	1 : 320
Normale vliezen 13 d. oud	geen haemaggl.	geen haemaggl.	geen haemaggl.

Hieruit volgt, dat veranderen van de PH der verdunningsvloeistof in 5,5 of 6 weinig of geen wijziging van de haemagglutinatietiter van vacciniavirus tot stand brengt.

De invloed van de temperatuur werd niet bestudeerd. NORTH (1944) geeft aan, dat de hoogste titers worden bereikt, indien men de buizen bij een temperatuur van 37° C plaatst. COLLIER en VAN THIEL (1949) plaatsen de buizen echter bij 4° C.

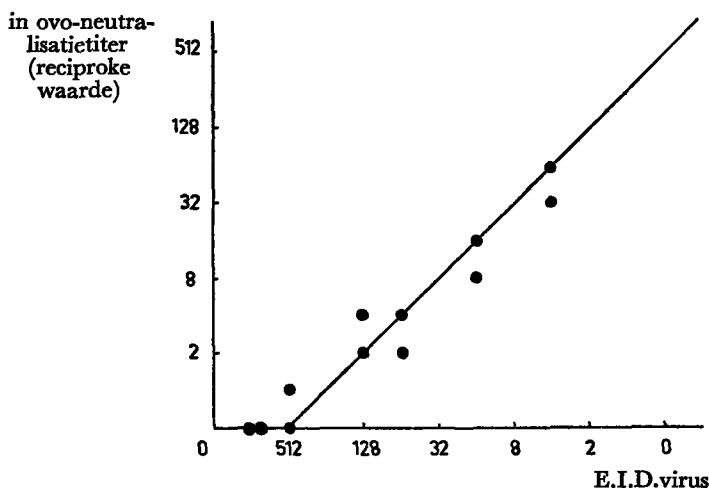
Het allantoïsvocht van de met variola- of vacciniavirus besmette eieren gaf een zeer lage (ten hoogste 1 : 16) respectievelijk geen titer te zien, indien men een haemagglutinatiereactie hiermee uitvoerde.

Titratie van variola- of vaccinia-antilichamen door middel van een neutralisatiereactie „in ovo”

Van het serum wordt een tweevoudige verdunningsreeks gemaakt met physiologische keukenzoutoplossing (PH = 7), te beginnen met 0,2 ml onverdund geïnactiveerd serum. Hieraan wordt een virus-suspensie (zie later) toegevoegd, eveneens 0,2 ml in elk buisje. Deze mengsels van serum en virus brengt men gedurende 1½ uur in een waterbad met een temperatuur van 37° C. Daarna wordt met 0,1 ml van iedere verdunning elk der chorio-allantoïsvliezen van drie 10—11 dagen bebroede kippeneieren geënt. Na 48 uur bebroeden bij een temperatuur van 36° C worden alle eieren gekoeld bij 4° C, en enige tijd later geopend. De chorio-allantoïsvliezen zonder laesies worden als negatief, de vliezen met laesies als positief beschouwd. Men kan gemakkelijk op deze wijze aflezen, welke verdunning van het serum nog juist de hoeveelheid toegediend virus kan neutraliseren. Vrijwel steeds bleken de drie eivliezen, welke met een zelfde serumverdunning vermengd

met virus werden geënt, alle positief of negatief te zijn. Waar dit niet het geval was, bepaalde het overwegende aantal negatieve vliezen de neutralisatietiter.

De aan het serum toegevoegde hoeveelheid virus moet ongeveer 10 E.I.D. bedragen. Aan de in ovo-neutralisatiereactie moet dus een virustitratie voorafgaan. Hiervoor wordt een 10-voudige verdunningsreeks, uitgaande van een 2 %-suspensie van chorio-allantoïsvliezen, gemaakt. Gelijke delen physiologische keukenzoutoplossing worden toegevoegd en de mengsels, evenals in de neutralisatiereactie 1½ uur



FIGUUR 1 *Inloed van het aantal E.I.D. vacciniavirus op de in ovo-neutralisatietiter van een anti-variola-serum*

bij 37° C bewaard, voordat 0,1 ml van ieder mengsel op elk van drie 10—11 dagen bebroede eieren wordt geënt. De hoogste verdunning, waarbij na 48 uur bebroeden nog juist vaccinia-laesies op het chorio-allantoïsvlies worden waargenomen, geeft 1 E.I.D. aan van deze virus-suspensie.

10 E.I.D. zou nu een bruikbare grootheid zijn om de neutralisatiereactie mee te verrichten, indien de virulentie van het virus constant zou blijven gedurende de periode, die verloopt tussen de voorafgaande virustitratie en de neutralisatiereactie in ovo. Het is daarom gewenst 100 E.I.D. te gebruiken voor de neutralisatiereactie in ovo, terwijl een contrôle-virustitratie tegelijk met de neutralisatiereactie moet worden ingezet, ten einde zekerheid te hebben omtrent het aantal gebruikte

E.I.D. Slechts zelden blijkt nu, dat men de neutralisatiereactie in ovo inderdaad met 10 E.I.D.virus heeft verricht. In hoeverre mag men nu de serumtiter naar evenredigheid wijzigen, wanneer men b.v. met 2 of 100 E.I.D.virus de reactie heeft uitgevoerd? Immers, wanneer men verschillende sera wil vergelijken, wat betreft de neutraliserende werking op virus, moet men eenheid scheppen in de virushoeveelheden.

TABEL 6

Haemagglutinatieremmingstiters (reciproke waarden) van anti-variola-vaccinia-sera voor vacciniavirus

Serum no.	Serum	Vaccinia HAR-titer
1	Variola-acute phase-serum (mens)	0—8
2	Variola-reconvalesc.serum (mens)	16384
3	Variola-hyperimmuun-serum (konijn)	0
4	„	4
5	Vaccinia generalisata-serum, acute phase (mens)	8192—16384
6	Vaccinia-hyperimmuun-serum (konijn)	32768—65536
7	„	0
8	„	1024
9	Vaccinia-reconvalesc.serum (konijn)	64
10	„	2048
11	„	16384
12	„	1024
13	„	1024
14	„	256
15	„	256

Het antwoord op deze vraag wordt door middel van de volgende proefneming gegeven.

Een vacciniavirus-suspensie werd getitreerd op de vliezen van bebroede eieren en op deze wijze verkregen wij suspensies, die 2, 8, 32, 64, 256 en 512 E.I.D.virus bevatten. Wij maakten nu mengsels van deze hoeveelheden virus en gelijke hoeveelheden onverdund reconvalescentenserum van een variola-patiënt en eveneens met gelijke hoeveelheden van de verdunningen 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64, 1 : 256, 1 : 1024 en 1 : 4096 van dit zelfde serum. Nadat de mengsels 1½ uur in een waterbad met een temperatuur van 37° C hadden gestaan, werden zij elk op de vliezen van twee 10—11 dagen bebroede eieren geënt. Fig. 1 geeft de resultaten van deze neutralisatie-



reactie met zowel wisselende hoeveelheden virus als wisselende hoeveelheden serum weer.

Men mag afleiden, dat de titers van het serum evenredig veranderen, naarmate men in de neutralisatieproef de E.I.D. van het virus wijzigt.

De chorio-allantoïsvliezen, die met vacciniavirus worden geënt, oogst men na 48 uur. In de periode van 48—72 uur namelijk vinden

TABEL 7

Aantallen geneutraliseerde M.I.D. vacciniavirus door anti-variola-vaccinia-sera in de konijnen-huidreactie

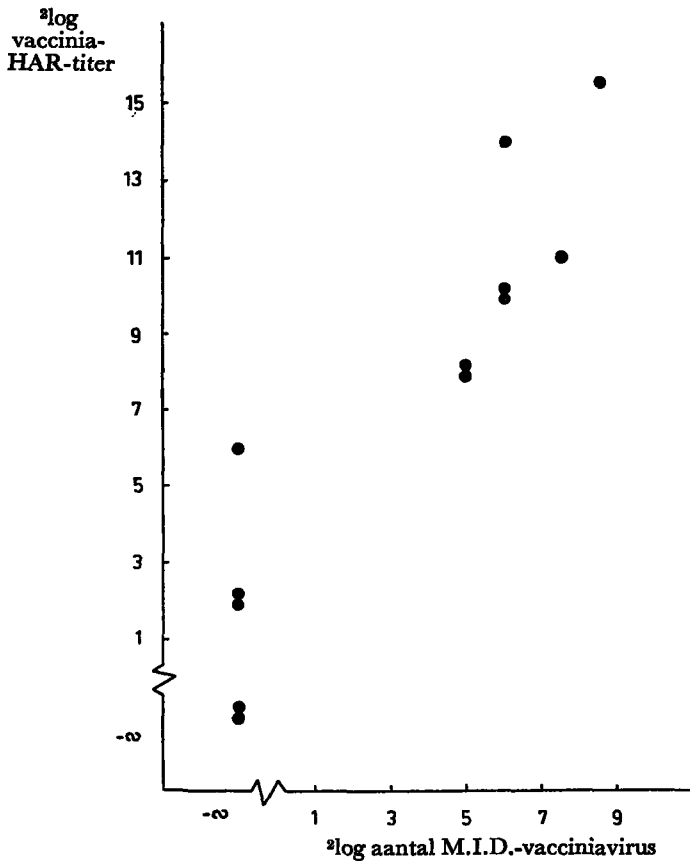
Serum no.	Serum	Vaccinia M.I.D.
1	Variola-acute phase-serum (mens)	0
2	Variola-reconvalesc.serum (mens)	—
3	Variola-hyperimmuun-serum (konijn)	0
4	”	0
5	Vaccinia generalisatie-serum, acute phase (mens)	—
6	Vaccinia-hyperimmuun-serum (konijn)	256—512
7	”	0
8	”	—
9	Vaccinia-reconvalesc.serum (konijn)	0
10	”	128—256
11	”	64
12	”	64
13	”	64
14	”	32
15	”	32

uitzaaiingen over het vlies plaats (LÉPINE et al., 1951), welke de secundaire pokken te zien geven, waardoor het aantal laesies, dat evenredig aan het toegediende aantal infecterende deeltjes zou zijn (KEOGH, 1936) verstoord wordt. Hoewel enige onderzoekers menen (zie blz. 1), dat het reductie-percentages van de laesies op de chorio-allantoïsmembraan goede aanwijzingen kan geven omtrent de neutraliserende werking van een serum (pock-counting test), brachten de bezwaren van andere onderzoekers ons ertoe de in ovo-neutralisatie-reactie, welke op blz. 7 werd beschreven, te verrichten. De sera

werden geïnactiveerd (30 min. bij 45° C verhit), omdat actief normaal serum volgens CRAIGIE (1932) reeds een neutraliserende werking ten opzichte van vacciniavirus heeft.

TITRATIE VAN VACCINIA-ANTILICHAMEN DOOR MIDDEL VAN DE NEUTRALISATIETREACTIE IN DE KONIJNENHUID. METHODE VAN GROTH

Het onverdunde geïnactiveerde serum (0,1 ml) wordt vermengd met 0,1 ml van tweevoudige virusverduningen (verdunningsvloeistof physiologische keukenzoutoplossing, PH = 7), te beginnen met kalverlymphe (hier te lande gebruikt bij de pokkenvaccinatie) 1 : 1000 en



FIGUUR 2 *Correlatie tussen de geneutraliseerde aantallen M.I.D. vacciniavirus volgens tabel 7 en de vaccinia-HAR-titers volgens tabel 6*

eindigend met 1 : 512.000 verdund. De mengsels worden 2 uur in een broedstoof met een temperatuur van 37° C geplaatst en tenslotte 30 min. bij 4° C. Van elk der verdunningen wordt 0,1 ml intradermaal ingespoten op de geschoren linkerrughelft van een konijn. Dit konijn moet 1500—2000 gram wegen.

Ter contrôle worden op de geschoren rechterrughelft van dit zelfde konijn de bovenbeschreven virusverdunningen gemengd met normaal

TABEL 8

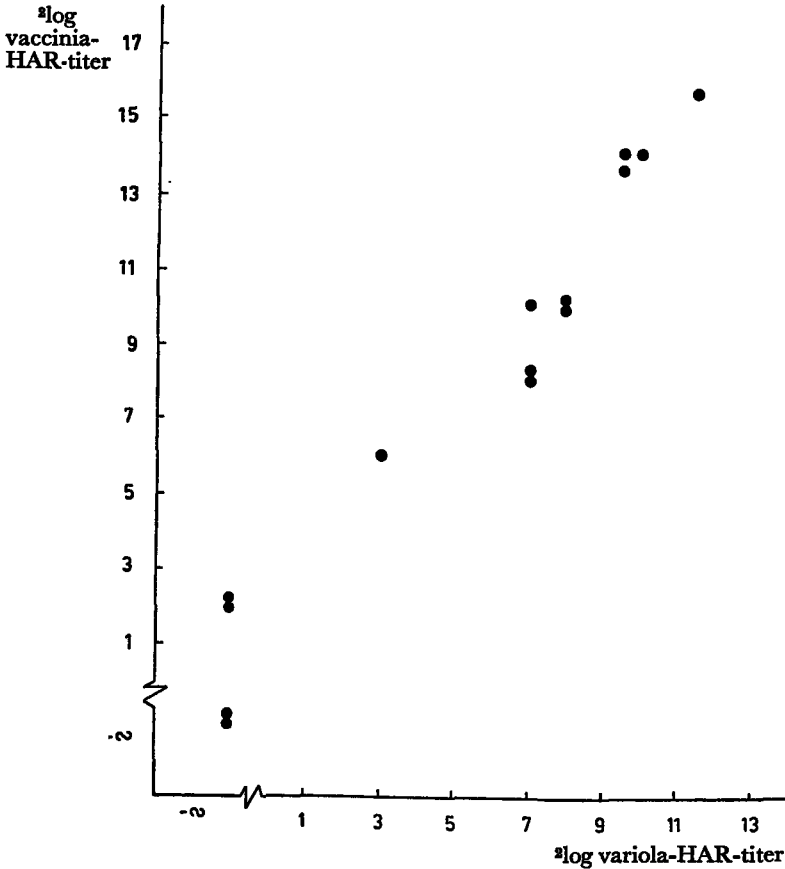
Haemagglutinatieremmingstiters (reciproke waarden) van anti-variola-vaccinia-sera voor variolavirus

Serum no.	Serum	Variola-HAR-titer
1	Variola-acute phase-serum (mens)	0
2	Variola-reconvalesc.serum (mens)	1024
3	Variola-hyperimmuun-serum (konijn)	0
4	”	0
5	Vaccinia generalisata-serum, acute phase (mens)	512—1024
6	Vaccinia-hyperimmuun-serum (konijn)	2048—4096
7	”	0
8	”	128
9	Vaccinia-reconvalesc.serum (konijn)	8
10	”	—
11	”	512—1024
12	”	256
13	”	256
14	”	128
15	”	128
16	Normaal serum (konijn)	0
17	Foetaal serum (mens)	0

serum (of 0,9 % NaCl, PH = 7) intradermaal geënt. De viruscontrôle mengsels worden eveneens 2 uur bij 37° C en 30 min. bij 4° C geplaatst. Na, 3, 4 en 5 dagen wordt de rug van het konijn geïnspecteerd. In beide reeksen wordt de hoogste virusverdunning bepaald, die nog juist een huidreactie veroorzaakt. Op deze wijze kan men de neutraliserende werking van verschillende sera in getallen (het aantal M.I.D. = minimum infecterende dosis) uitdrukken.

SERUM-ONDERZOEK

Vijftien anti-variola- of anti-vaccinia-sera werden aan de vaccinia-haemagglutinatieremmingsreactie (vaccinia-HAR-reactie) onderworpen en de op deze wijze verkregen antilichaamtiters worden in tabel 6 vermeld.



FIGUUR 3 *Correlatie tussen vaccinia-HAR-titers volgens tabel 6 en variola-HAR-titers volgens tabel 8*

Toen de titraties van de sera met tussenpozen van 1 tot 3 weken enige malen als contrôle werden herhaald, daalden de titers langzaam. In tabel 6 worden dan ook *die* titers vermeld, die ongeveer gelijktijdig met de vaccinia-neutralisatiereactie „in ovo” en de konijnenhuidreactie, die beide eveneens bij deze 15 respectievelijk 12 sera

TABEL 9

In ovo-neutralisatietiters (reciproke waarden) van anti-variola-vaccinia-sera voor vacciniavirus

Serum no.	Serum	Vaccinia-neutralisatietiter (met 10 E.I.D.)
1	Variola-acute phase-serum (mens)	—
2	Variola-reconvalesc. serum (mens)	4000—8000
3	Variola-hyperimmuun-serum (konijn)	200
4	„	0
5	Vaccinia generalisata-serum, acute phase (mens)	1600
6	Vaccinia-hyperimmuun-serum (konijn)	12800
7	„	0
8	„	100
9	Vaccinia-reconvalesc. serum (konijn)	100
10	„	800
11	„	8000
12	„	100
13	„	200
14	„	100
15	„	100
16	Normaal serum (konijn)	0

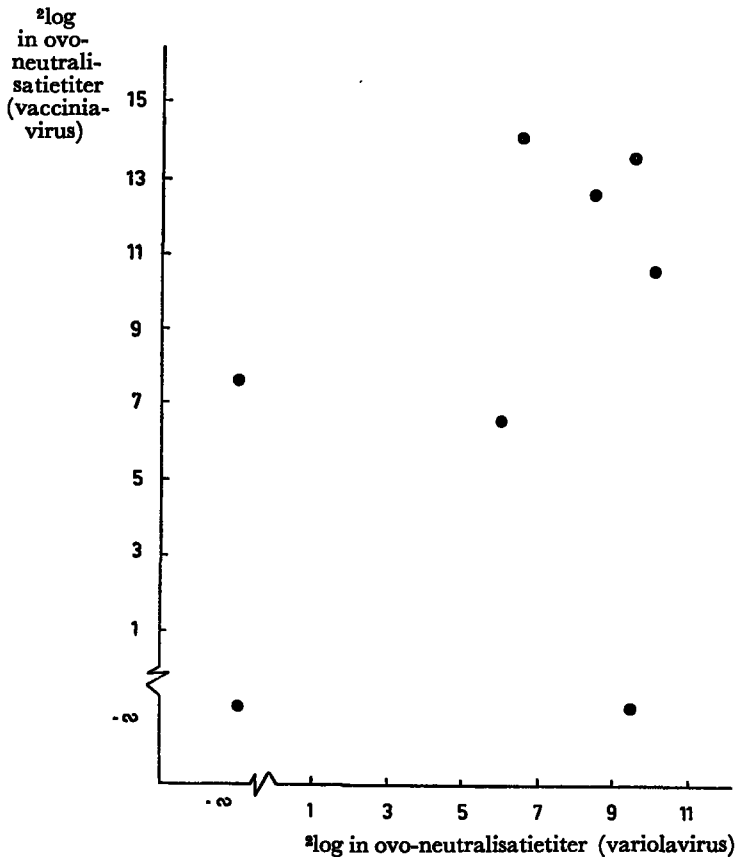
TABEL 10

In ovo-neutralisatietiters (reciproke waarden) van anti-variola-vaccinia-sera voor variolavirus

Serum no.	Serum	Variola-neutralisatietiter (met 10 E.I.D.)
1	Variola-acute phase-serum (mens)	—
2	Variola-reconvalesc. serum (mens)	320
3	Variola-hyperimmuun-serum (konijn)	0
4	„	0
5	Vaccinia generalisata-serum, acute phase (mens)	640—2000
6	Vaccinia-hyperimmuun-serum (konijn)	640—1000
7	„	80—100
8	„	20—100
9	Vaccinia-reconvalesc. serum (konijn)	—
10	„	—
11	„	100
12	„	—
13	„	—
14	„	—
15	„	—

werden verricht, waren bepaald. In hoeverre nu de titers der sera, gevonden met de haemagglutinatieremmingsreactie, correleren met de aantallen M.I.D.virus, die door de respectieve sera worden geneutraliseerd in de konijnenhuidreactie (zie tabel 7), laat fig. 2 zien. Ook werd van 14 van de 15 sera de haemagglutinatieremmingsreactie met variolavirus uitgevoerd. De titers zijn vermeld in tabel 8.

Van deze 14 anti-variola-vaccinia-sera wordt de correlatie tussen de HAR-antilichaamtiter voor vacciniavirus (tabel 6) en de respectieve HAR-titers voor variolavirus (tabel 8) aangegeven in fig. 3.



FIGUUR 4. *Correlatie tussen vaccinia-in ovo-neutralisatietiters volgens tabel 9 en variola-in ovo-neutralisatietiters volgens tabel 10*

Totaal werden 21 vaccinia-neutralisatiereacties „in ovo” met 14 verschillende sera verricht, waarvan de titers bij benadering in tabel 9 worden vermeld. Bovendien werd nog een in ovo-neutralisatiereactie uitgevoerd met normaal konijnenserum. Dit laatste, eveneens geïnactiveerd, bleek geen vacciniavirus-neutraliserende werking te bezitten.

Met variolavirus en 8 verschillende sera werden 15 neutralisatiereacties in ovo uitgevoerd, waarvan de titers bij benadering in tabel 10 worden vermeld.

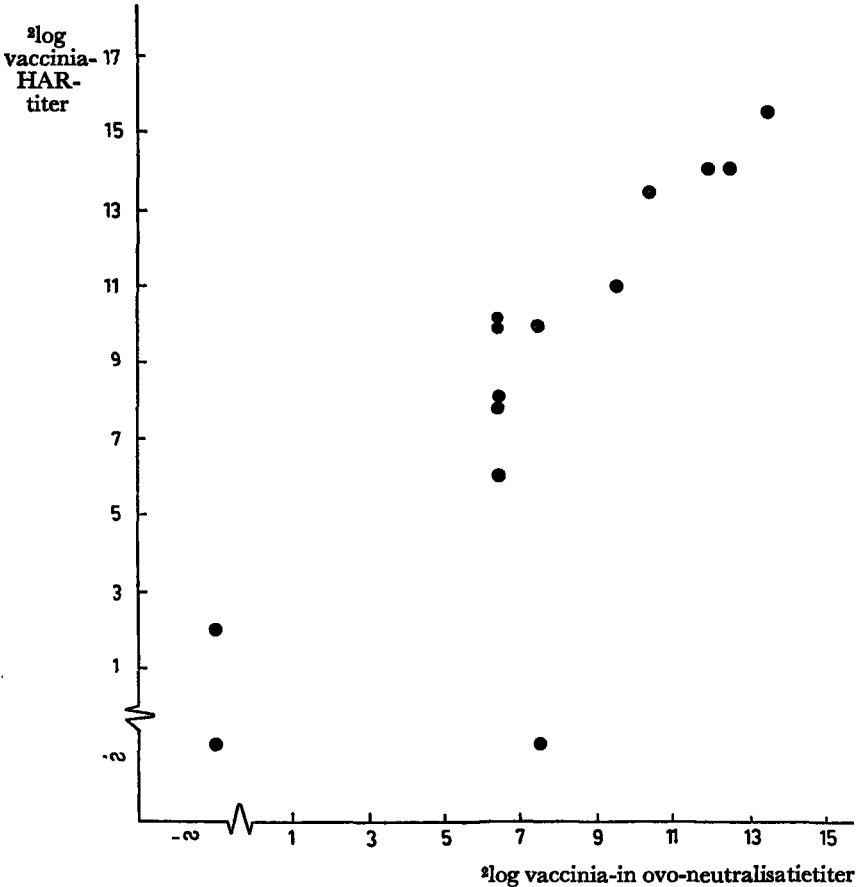
De correlatie tussen de in ovo-neutralisatietiters, welke voor vacciniavirus en variolavirus respectievelijk in de tabellen 9 en 10 worden vermeld, vindt men afgebeeld in fig. 4.

Fig. 5 geeft de correlatie aan tussen de titers met de neutralisatiereactie in ovo voor vacciniavirus verkregen bij 14 van de 15 al eerder genoemde anti-variola-vaccinia-sera en de vaccinia-HAR-titers van deze sera.

Terwijl de vaccinia-neutralisatiereacties in ovo geen technische moeilijkheden opleverden volgens de methode op blz. 7 beschreven, moet worden opgemerkt, dat zich bij de variola-neutralisatiereacties een factor voordeed, waardoor de laatste reacties soms bij het aflezen een beeld te zien gaven, dat niet betrouwbaar scheen. De virulentie van het variolavirus neemt n.l. bijzonder snel af in de 48 uur, die verloopt tussen de virustitratie en de neutralisatiereactie, waardoor herhaaldelijk titraties mislukten door onvoldoende virus. Ook indien de variola-suspensie werd bewaard bij -70° C in plaats van bij -20° C, leverden het bewaren, invriezen en ontdooien deze moeilijkheid op. Variola-neutralisatiereacties met 2—10 E.I.D.virus gaven bovendien soms een verwarrend beeld op de eivliezen te zien in tegenstelling tot de vaccinia-neutralisatiereacties met 2—10 E.I.D.virus verricht.

Proefneming A: Van een hyperimmuun konijnenserum (serum 18) werden twee porties van 2 ml, 1 : 5 verdund, goed gemengd met respectievelijk 2 ml physiologische zoutoplossing (PH = 7) en 2 ml normale eivliezen-(13 dagen oud)-suspensie, 1 : 50 verdund. De beide mengsels werden na $1\frac{1}{2}$ uur in een waterbad met een temperatuur van 37° C te hebben doorgebracht, bij 4° C geplaatst gedurende een nacht en daarop $1\frac{1}{2}$ uur gecentrifugeerd met een snelheid van 15.000 omw./min. Vervolgens werd de bovenstaande vloeistof van de serum-

mengsels geïnactiveerd (30 min. bij 56° C). Met beide porties serum (1 en 2 in tabel 11), 1 : 10 verdund vergeleken bij het oorspronkelijke serum, werd een vaccinia-HAR- en een vaccinia-in ovo-neutralisatiereactie verricht, waaruit bleek, dat een normale eivliezen-suspensie in vergelijking tot de physiologische keukenzoutoplossing, beide aan



FIGUUR 5 *Correlatie tussen vaccinia-in ovo-neutralisatietiters volgens tabel 9 en vaccinia-HAR-titers volgens tabel 6*

de zelfde handelingen onderworpen, geen invloed heeft op de HAR-titer, noch op de in ovo-neutralisatietiter.

Proefneming B: Van het zelfde hyperimmune konijnenserum werden twee porties van 1 ml goed gemengd met respectievelijk 1,5 ml physio-

logische keukenzoutoplossing en 1,5 ml elementairlichaampjes-suspensie van vacciniavirus (ELS).

Deze ELS werd van een 2 %-vaccinia-eivliezen (13 dagen oud)-suspensie bereid door 10 ml van deze suspensie één maal gedurende 25 min. met een snelheid van 3000 omw./min. in een International clinical centrifuge te centrifugeren ten einde de grove delen te verwijderen en de bovenstaande vloeistof hiervan 60 min. te centrifugeren met een snelheid van 15.000 omw./min. in een Spinco-centrifuge. Het centrifugaat, dat de elementairlichaampjes van het vacciniavirus vrijwel geheel bevat, werd nog 3 maal gewassen met physiologische zoutoplossing en 3 maal gedurende 60 min. met een snelheid van 15.000 omw./min. gecentrifugeerd en ten slotte in 2 ml geresuspendeerd.

Nadat de beide mengsels $1\frac{1}{2}$ uur in een waterbad met een temperatuur van 37° C en een nacht bij 4° C hadden doorgebracht, werden zij

TABEL I I

Vaccinia-HAR-titers en -neutralisatietiters in de porties 1, 2, 3, 4 en 5 in de proefnemings A, B en C

PORTIE		1	2	3	4	5
Mengsel		Serum + physiol. NaCl-opl.	Serum + norm.vl. suspensie	Serum + ELS	Serum + ELS 1 : 100	Serum + ELS 1 : 1000
Proefneming A	HAR-titer 4 A.E.	1 : 640	1 : 640			
	Neutral.titer 10 E.I.D.	1 : 200	1 : 200			
Proefneming B	HAR-titer 4 A.E.	1 : 640		1 : 80		
	Neutral.titer 10 E.I.D.	1 : 80		1 : < 2,5		
Proefneming C	HAR-titer 4 A.E.	1 : 640			1 : 640	1 : 640
	Neutral.titer 10 E.I.D.	1 : 80			1 : < 10	1 : 20

gedurende 60 min. met een snelheid van 15.000 omw./ sec. gecentrifugeerd en de bovenstaande vloeistof vervolgens geïnactiveerd. Met de beide porties serum (1 en 3 in tabel 11), 1 : 2½ verdund vergeleken met het oorspronkelijke serum, werd een vaccinia-HAR- en een in ovo-neutralisatiereactie verricht. Terwijl de HAR-titer 8-voudig bleek te zijn teruggelopen, was de neutralisatietiter meer dan 32 maal gedaald.

Proefneming C: Van drie porties serum (1, 4 en 5 in tabel 11), welke op de zelfde wijze als in proefneming B werden bereid na verdunning 1 : 2½ met respectievelijk physiologische zoutoplossing, ELS 1 : 100 verdund en ELS 1 : 1000 verdund, werden eveneens de vaccinia-HAR-titers en de in ovo-neutralisatietiters bepaald. De HAR-titers van de drie porties waren gelijk; de neutralisatietiters van porties 4 en 5 bleken, vergeleken bij portie 1, meer dan 8 maal respectievelijk 4 maal te zijn gedaald.

Uit de proefnemingen B en C bleek, dat absorptie van een vaccinia-antiserum met een onverdunde vaccinia-elementairlichaampjes-suspensie ELS, welke de infectieuze deeltjes van het virus (CRAIGIE, 1932) en nog wat haemagglutinenen (BURNET en STONE, 1946) bevat, de neutralisatietiter aanzienlijk meer doet dalen dan de HAR-titer, terwijl absorptie van dit zelfde vaccinia-antiserum met ELS 1 : 100 respectievelijk 1 : 1000 verdund, de neutralisatietiter meer dan 8 maal respectievelijk 4 maal doet dalen, terwijl de HAR-titer ongewijzigd blijft.

Dit wijst op het feit, dat er twee soorten antilichamen, neutraliserende en haemagglutinatieremmende, bestaan. Aangezien het haemagglutinine een antigeen is, dat gescheiden kan worden van de elementairlichaampjes, aan welke laatste de pathogeniteit van het virus is gebonden, hoeft het bestaan van deze twee soorten antilichamen geen verwondering te wekken.

Naar aanleiding van de proeven van WALKER en HORSFALL (1950), waarin anti-influenza-sera partiëel verzadigd werden met influenza-virus en de resterende niet door dit virus gebonden antilichamen op haemagglutinatieremmende en neutraliserende werking werden onderzocht, waardoor een beeld verkregen werd over het zich al dan niet parallel gedragen van de haemagglutinatieremmende en neutraliserende antilichamen, werden met anti-vaccinia-sera en homoloog virus enige proefopstellingen gemaakt. Het bleek niet mogelijk anti-vaccinia-serum partiëel te verzadigen met virusdeeltjes en daarna een soortgelijke proefneming ten opzichte van de resterende antilichamen

in het serum te verrichten, daar de ongebonden virusdeeltjes in hun geheel, of althans de ongebonden elementairlichaampjes en haemagglutinenen op generlei wijze verwijderd konden worden. Immers, de vrije elementairlichaampjes kunnen door centrifugeren met een snelheid van 15.000 omw./min., eventueel nog gevolgd door inactivatie van het serum ten einde de enkele in de bovenstaande vloeistof overgebleven elementairlichaampjes te vernietigen, uit het serum-virus mengsel verwijderd worden; doch de vrije haemagglutinenen kan men niet verwijderen met centrifugeren, zelfs niet op hoger toerental. Evenmin kan men door filtreren de vrije elementairlichaampjes en haemagglutinenen tegelijkertijd verwijderen. De haemagglutinenen treden immers door het Seitz EK-filter, terwijl de elementairlichaampjes op het filter achterblijven. Kippenerythrocysten adsorberen slechts de haemagglutinenen. Tenslotte laat de binding van elementairlichaampjes en antilichamen bij centrifugeren (SABIN, 1935) en de haemagglutinine-antahaemagglutinine-binding bij verhitten (CHU, 1948) gedeeltelijk los.

SAMENVATTING VAN DE RESULTATEN

De vaccinia-HAR-titers van 12 anti-variola-vaccinia-sera correleren duidelijk (lineair) met de titers, volgens de konijnenhuid-reactie bij 11 van deze 12 sera verkregen (zie fig. 2). Uit fig. 2 valt met uitzondering van serum 11 (vergelijk tabel 6 en 7) af te leiden, dat wanneer de HAR-titer ongeveer 64 bereikt, een neutralisatie van vacciniavirus met de konijnenhuid-reactie aantoonbaar wordt, welke des te krachtiger wordt naarmate de HAR-titer stijgt.

De vaccinia-HAR-titers van 14 anti-variola-vaccinia-sera correleren lineair (zie fig. 5), met uitzondering van serum 3 (vergelijk tabel 6 en 9), met de vaccinia-neutralisatie in ovo-titers.

De vaccinia-HAR-titers van 14 anti-variola-vaccinia-sera correleren lineair (zie fig. 3) met en zijn hoger dan de variola-HAR-titers van deze sera.

Er is dus bij de onderzochte anti-variola-vaccinia-sera een lineaire correlatie aan te wijzen tussen de vaccinia-HAR-titers, de vaccinia-neutralisatie in ovo-titers en de titers, verkregen met de konijnenhuid-reactie.

Een lineaire correlatie tussen de vaccinia-neutralisatie in ovo-titers en de variola-neutralisatie in ovo-titers van 8 anti-variola-vaccinia-

sera is niet aantoonbaar (zie fig. 4). De variola-neutralisatie in ovoidtitraties kunnen echter niet alle betrouwbaar geacht worden.

Door middel van de haemagglutinatieremmingsreactie valt (andere onderzoekers constateerden dit reeds) geen antigeen-onderscheid aan te tonen tussen variola- en vacciniavirus, hetgeen volgt uit de lineaire correlatie tussen de variola- respectievelijk vaccinia-HAR-titers van een aantal anti-variola-vaccinia-sera.

Indien vaccinia-antiserum met een suspensie van vaccinia-elementairlichaampjes 1 : 100 en 1 : 1000 verdund (het infectie-verwekkende deel van het vacciniavirus) in aanraking werd gebracht, bleek de haemagglutinatieremmings titer van het serum voor vacciniavirus onveranderd te zijn, terwijl de neutralisatietiter (in ovo bepaald) meer dan 8 maal respectievelijk 4 maal gedaald was (zie tabel 11).

Hoewel tussen de titers, die met de vaccinia-HAR- en -neutralisatiereactie bij een aantal anti-variola-vaccinia-sera werden verkregen, een lineaire correlatie bestaat, zijn de antilichamen, welke voor beide reacties verantwoordelijk zijn, verschillend.

II

NEUTRALISERENDE EN HAEMAGGLUTINATIE- REMMENDE ANTILICHAMEN BIJ INFLUENZA

In tegenstelling tot de virussen van de pokkengroep, is het haemagglutinerend vermogen van het influenzavirus gebonden aan de virusdeeltjes.

HIRST (1942) toonde een lineaire correlatie aan tussen de haemagglutinatieremmingsteters en de neutralisatieteters van influenza-immunsera. Uit latere proeven, waarin geen lineaire correlatie werd gevonden, hebben verschillende onderzoekers (BURNET en BEVERIDGE, 1943; STUART-HARRIS en MILLER, 1947) afgeleid, dat het haemagglutinatieremmend en het neutraliserend vermogen op verschillende componenten van het influenza-immuunserum zouden berusten, zelfs op verschillende antilichamen. FRIEDEWALD (1944) toonde aan, dat absorptie van een influenza-immuunserum met homolog virus een grotere reductie van de neutralisatietiter dan van de haemagglutinatieremmingstiter veroorzaakt. WALKER en HORSFALL (1950) maakten eveneens van deze absorptiemethode gebruik en kwamen tot de zelfde conclusie. Verder vonden zij bij 41 konijnen-immunsera 11 sera met de zelfde haemagglutinatieremmingstiter als 11 andere sera, maar de beide groepen van 11 sera bleken respectievelijk 4- tot 13-voudig verschillende neutralisatie in ovo-teters te hebben. Bij 11 reconvalescenten-sera van mensen werden 3 sera met een dergelijk phenomeen gevonden. Ook toonden zij aan, dat de haemagglutinatieremmingsteters gelijk bleven, indien zij de influenza-immunsera van 8 konijnen na één intraveneuze injectie met besmet allantoïsvocht vergeleken met de groep sera, afgenomen, nadat de zelfde konijnen nog 3 intraperitoneale injecties met besmet allantoïsvocht hadden gekregen. De neutralisatieteters waren in de laatste groep sera daarentegen aanzienlijk gestegen. Toen daarop van absorptiemethoden gebruik werd gemaakt bij de beide genoemde groepen sera, bleken de haemagglutinatieremmende antilichamen bij de laatst afgenomen sera in grotere mate geabsorbeerd

te worden dan de neutraliserende antilichamen. WALKER en HORSFALL namen aldus bij voortgezette immunisatie een andere reactie van de antilichamen waar dan in het begin der immunisatie.

Dezelfde onderzoekers zijn van mening, dat de haemagglutinatieremmingsreactie echter in de praktijk de hoeveelheid antilichamen voldoende aangeeft. Indien men er van uitgaat, dat de immuniteit tegen influenza mede beoordeeld kan worden door de quantiteit der homologe antilichamen in het serum, lijkt het van waarde de opvatting van WALKER en HORSFALL nader te onderzoeken.

MATERIAAL EN TITRATIEMETHODEN

Virus

Stammen: PR₈ (influenza A), FM₁ (influenza A-prime), Lee (influenza B) en twee door ons in 1951 geïsoleerde stammen V (influenza A-prime) en H (influenza B). Beide laatste stammen hadden bij het gebruik nog slechts vijf eipassages doorgemaakt en droegen de formules E₁E₄ respectievelijk E₂E₃. De PR₈-, FM₁- en Lee-virusstammen werden reeds gedurende jaren in ons laboratorium gebruikt.

De virus-suspensies werden bereid door enting van 10⁻³—10⁻⁴ verdund virushoudend allantoïsvocht in de allantoïsholte van 9—12 dagen bebroede kippeneieren. Na incubatie bij 35° C gedurende 48 uur werden deze eieren enige uren tot een nacht bij 4° C gekoeld en het bloedloze allantoïsvocht verzameld. De virus-suspensies werden steeds *vers* bereid. Indien zij enige dagen werden bewaard, werden zij ter voorkoming van uraatneerslagen 1 : 4 verdund (5 ml allantoïsvocht en 2 ml merthiolaatoplossing 1 : 1000 en 13 ml steriele physiologische keukenzoutoplossing). Om het op deze wijze verkregen virus te titreren, werd de micro-methode van MULDER en GOSLINGS (1947) gebruikt. De gedeeltelijke (++) agglutinatie van de kippenerythrocysten bepaalde de eindtiter.

Sera

De sera, waarmee titraties op antilichamen werden verricht, zijn afkomstig van:

- 1e. personen, die met een PR₈-, FM₁- en Lee-virus bevattend vaccin waren gevaccineerd.
- 2e. personen, die in 1951 een infectie met A- of B-influenzavirus doormaakten.
- 3e. fretten, die een infectie met PR₈-, FM₁-, Lee- en met V-influen-

zavirus hadden doorstaan en die 14 dagen na de intranasale besmetting werden verbloed.

4e. „normale” mensen en fretten.

Titratie van influenza-antilichamen door middel van de haemagglutinatie-remmingsreactie

Het serum, in verdunning 1 : 6 gebracht met het ruwe, R.D.E. (= receptor destroying enzyme) bevattende filtraat van agarcultures van *V. Cholerae* ten einde de niet-specifieke haemagglutinatie-remmende substanties (FRANCIS, 1947) te neutraliseren, wordt \pm 18 uur bij een temperatuur van 37° C en vervolgens in een waterbad van 56° C geplaatst. Door deze laatste handeling worden, behalve aspecifieke inhibitoren, ook de werking van het tevoren toegevoegde R.D.E. geneutraliseerd (BURNET en STONE, 1947; VAN DER VEEN en MULDER, 1950). Vervolgens wordt het serum verder tot 1 : 10 verdund met physiologische keukenzoutoplossing en wordt van het 1 : 10 verdunde serum een tweevoudige verdunningsreeks in porceleinen verfbakjes gemaakt, zodanig dat van elke verdunning 4 druppels in een holte van zulk een bakje worden gebracht; de verdunningsvloeistof is physiologische keukenzoutoplossing (PH = 7).

Hieraan worden 2 druppels virus (welke 8 A.E. bevatten) toegevoegd; serum en virus worden gemengd en het mengsel 20—30 min. bij 4° C geplaatst. Daarna worden 2 druppels 2 %-kippenerythrocyten-suspensie toegevoegd, waarna goed gemengd wordt met een glazen staafje, te beginnen bij de hoogste verdunning. Het bakje wordt dan bij 4° C geplaatst en na 30—45 min. wordt de reactie afgelezen. De titer van het serum wordt bepaald door de oorspronkelijke serumverduunning, die nog juist remming van de haemagglutinatie te zien geeft. Bij deze antilichaamtitratie moet zorg worden gedragen, dat zich 4 A.E.virus in de halve eindverduunning bevinden, waarvan men zich verzekert door een voorafgaande titratie van het virus (4 druppels van de hoogste virusverduunning, die nog juist 4 druppels 1 %-kippenerythrocyten-suspensie doen agglutineren, bevatten 1 A.E.).

De haemagglutinerende eigenschap van de gebruikte virusdosis wordt gecontroleerd door deze in één van de holten van het verfbakje te mengen met de 2 %-erythrocyten-suspensie en physiologische keukenzoutoplossing. Verder wordt een serumcontrole ingezet, waaruit moet blijken, dat het serum op zich zelf erythrocyten niet doet agglutineren, terwijl een erythrocytencontrole moet tonen, dat de gebruikte erythrocyten niet auto-agglutinabel zijn.

Titratie van influenza-antilichamen door middel van een neutralisatiereactie „in ovo”

Ten einde zo zuiver mogelijk, zoals in de volgende experimenten de bedoeling is, de haemagglutinatieremmingstiter met de neutralisatietiters van een aantal sera te vergelijken, werd steeds in de hier te beschrijven reactie van dezelfde portie serum gebruik gemaakt als in de haemagglutinatieremmingsreactie, dat wil zeggen hoewel voor de neutralisatiereactie onnodig, werd het serum behandeld met het ruwe filtraat van *V. Cholerae*, zoals op blz. 24 werd beschreven bij de haemagglutinatieremmingsreactie. Met het 1 : 10 verdunde serum, dat na het inactiveren (zie beschrijving haemagglutinatieremmingsreactie) verkregen werd, wordt nu de onderstaande antilichaamtiter verricht.

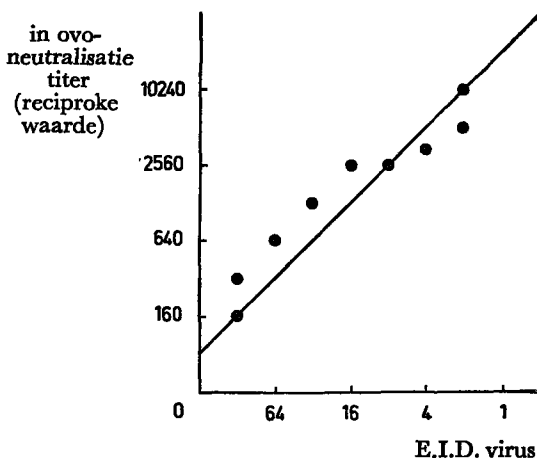
Bij 0,5 ml van een reeks tweevoudige serumverdundingen (geïnactiveerd), te beginnen met 1 : 10 tot ongeveer 1 : 20480, wordt 0,5 ml virus (4—32 E.I.D., zie later) gevoegd. Deze mengsels worden 30—60 min. bij 4° C geplaatst en daarna in de allantoïsholte (0,1 ml) van elk van drie 9—12 dagen bebroede kippeneieren geënt. De eieren worden 48 uur bij 35° C geïncubeerd, vervolgens gekoeld en geoogst en ten slotte met behulp van de haemagglutinatiereactie op influenzavirus onderzocht. Men kan gemakkelijk aflezen, welke verdunding van het serum nog juist *de* hoeveelheid toegediend virus kan neutraliseren. Vrijwel steeds bleken de drie eieren, welke met een zelfde serumverdunding vermengd met virus werden geënt, alle positief (virus bevattend) of negatief (geen virus bevattend) te zijn. Waar dit niet het geval was, bepaalde het overwegende aantal negatieve eieren de neutralisatietiter.

Ter contrôle werden reacties verricht met dezelfde hoeveelheid virus en geïnactiveerd normaal mensenserum. Dit laatste bleek geen influenza-neutraliserende werking te hebben.

Om het juiste aantal E.I.D.virus aan de serumverdundingen toe te voegen, moet aan de in ovo-neutralisatiereactie een virustitratie voorafgaan. Hiervoor wordt een 10-voudige verdunningsreeks, uitgaande van besmet allantoïsvocht, gemaakt. Gelijke delen physiologische keukenzoutoplossing worden toegevoegd (gelijke delen serum worden immers toegevoegd in de neutralisatiereactie) en de mengsels worden 30—60 min. bij 4° C geplaatst, voordat 0,1 ml van elk mengsel in de allantoïsholte van drie 9—12 dagen bebroede eieren wordt geënt.

De hoogste verdunning waarbij na 48 uur bebroeden virusvermenigvuldiging, welke met behulp van de haemagglutinatiereactie wordt bepaald, wordt waargenomen, geeft 1 E.I.D. aan van deze virus-suspensie.

Omdat in deze neutralisatieproeven werd gewerkt met zeer kleine hoeveelheden virus, namelijk met 4—32 E.I.D., terwijl HORSFALL et al. (1939) gemiddeld 100—10.000 E.I.D. gebruikten, ligt het voor de hand, dat ten gevolge van dit kleine aantal E.I.D. onbetrouwbare resultaten konden worden verkregen. Het leek ons zeer eenvoudig dit na te gaan. Uit de resultaten van twee proeven met FM₁-virus, waarbij tevoren een E.I.D.-bepaling was gedaan en een herhaling hiervan tijdens de proef, werd fig. 6 opgebouwd. Op de abscis is het aantal E.I.D. van het virus, op de ordinaat zijn de tweevoudige serumverdunningen aangegeven. Het serum, dat in deze beide proeven werd gebruikt, was frettenserum met antilichamen tegen FM₁-virus.



FIGUUR 6 Invloed van het aantal E.I.D.influenzavirus (FM₁) op de in ovo-neutralisatie-titer van een homoloog antiserum

Hieruit kan de conclusie worden getrokken, dat men bij zeer nauwkeurig titreren met kleinere hoeveelheden virus (vanaf 2—4 E.I.D.) neutralisatiereacties kan uitvoeren, welke redelijke resultaten te zien geven. Ook kan men de neutraliserende capaciteiten van verschillende sera vergelijken, van kleinere hoeveelheden virus op bovenstaande wijze gebruikmakend, mits men zich er van overtuigt door E.I.D.-

contrôlebepalingen, tegelijk met de neutralisatiereactie ingezet, met hoeveel E.I.D. men deze laatste verrichtte. Naar aanleiding van het bovenstaande kunnen de neutraliserende titers berekend worden voor een bepaald aantal E.I.D.

Zoals tevoren gemeld, werd in de neutralisatieproef cholerafiltraat gebruikt. De reden hiervoor is de volgende. Wanneer men één deel serum met 6 delen ruw cholerafiltraat \pm 18 uur bij 37° C heeft bewaard en hierna nog een uur heeft verhit bij 56° C, zal dit mengsel misschien niet meer geheel een serumverdunding 1 : 6 zijn door verdamping. Om deze moeilijkheid te elimineren, werd ook in de neutralisatieproef dit mengsel van serum en cholerafiltraat gebruikt, dat \pm 18 uur bij 37° C had gestaan. Bovendien wordt het serum in de neutralisatieproef eveneens geïnactiveerd (GINSBERG en HORSFALL, 1949) en was het verhitten bij 56° C dus geen bezwaar.

TABEL 12

Invloed van cholerafiltraat op de neutraliserende werking van influenza-antiserum

Serum	HAR-titer van serum met chol. filtr.	HAR-titer van serum met NaCl	Neutralisatie-titer van serum met chol. filtr.	Neutralisatie-titer van serum met NaCl
no.15 H-reconvalescentenserum (mens)	1 : 320	1 : 320	1 : 320	1 : 320
no.16 H-reconvalescentenserum (mens)	1 : 320	1 : 320	1 : 640	1 : 640

De mogelijkheid bestond echter, dat het cholerafiltraat nog invloed zou uitoefenen op de neutraliserende antilichamen in het serum en dus werden bij 2 anti-H-sera 2 porties van hetzelfde serum 1:6 verdund met cholerafiltraat respectievelijk met fysiologisch zout. Alle vier mengsels werden aan het bovenbeschreven procedé onderworpen en werden met gelijke hoeveelheid virus (4 E.I.D. H-virus) getitreerd.

Zoals men in tabel 12 ziet, tast het cholerafiltraat de neutraliserende antilichamen in het serum niet aan, hetgeen MULDER et al. (1952) eveneens melden.

SERUM-ONDERZOEK

De sera 1 tot en met 6 werden op de wijze, zoals op blz. 24 is aangegeven, aan de haemagglutinatieremmingsreactie onderworpen met de stammen PR₈ en Lee (zie tabel 13). In de halve virus-eindconcentratie bevinden zich steeds 4 A.E.virus, d.w.z. 4 A.E. (dit is 1 : 160 verdund virus, indien de haemagglutinatietiter van PR₈-virus 1 : 640 bedraagt) zijn door een gelijke hoeveelheid serum 1 (zie tabel 13) 1 : 320 verdund te neutraliseren.

TABEL 13

Haemagglutinatieremmingstiters van influenza-antiseren voor PR₈-en Lee-virus

Serum no.	Serum	Haemaggl. remmingstiters	
		PR ₈ -virus	Lee-virus
1.	Serum na vaccinatie met PR ₈ , FM ₁ - en Lee-stammen	1 : 320	1 : 80
2.	idem	1 : 5120	1 : 80
3.	„	1 : 640	1 : 160
4.	„	1 : 320	1 : 80
5.	„	1 : 320	1 : 40
6.	„	1 : 320	1 : 40

Indien men echter 4 A.E.virus en een gelijke hoeveelheid serum 1, 1 : 320 verdund goed mengt en 30 min. tot een uur op elkaar laat inwerken, blijkt dat dit mengsel, in de allantoïis van een kippenembryo geënt, nog vrij virus bevat. Er treedt nl. een normale virusvermenigvuldiging op, 48 uur later met behulp van de haemagglutinatiereactie volgens HIRST aantoonbaar. Zie tabel 14 en 15.

Verklaring bij tabel 14 en 15: b.v. door serum 2, 1 : 1280 verdund, wordt van een gelijke hoeveelheid virus-suspensie, 4 A.E. bevattend, de haemagglutinatatie geremd; infecteren kan dit mengsel het ei echter wel.

TABEL 14

Serum no.	Serum	Verdunning	PR ₈ -virus	Haemaggl. remming	Virus-vermenigvuld. in ovo
2.	Serum na vaccinatie met PR ₈ -, FM ₁ - en Lee-stammen	1 : 1280 = 4 maal HAR-titer	4 A.E.	pos.	1 : 1280
3.	idem	1 : 320 = 2 maal HAR-titer	4 A.E.	pos.	1 : 640
5.	„	1 : 320 = HAR-titer	4 A.E.	pos.	1 : 640

TABEL 15

Serum no.	Serum	Verdunning	Lee-virus	Haemaggl. remming	Virus-vermenigvuld. in ovo
1.	Serum na vaccinatie met PR ₈ -, FM ₁ - en Lee-stammen	1 : 40 = 2 maal HAR-titer	4 A.E.	pos.	1 : 640
2.	idem	1 : 40 = 2 maal HAR-titer	4 A.E.	pos.	1 : 1280
3.	„	1 : 160 = HAR-titer	4 A.E.	pos.	1 : 1280
4.	„	1 : 40 = 2 maal HAR-titer	4 A.E.	pos.	1 : 640
5.	„	1 : 20 = 2 maal HAR-titer	4 A.E.	pos.	1 : 640
6.	„	1 : 20 = 2 maal HAR-titer	4 A.E.	pos.	1 : 1280

Men heeft in vitro 4 A.E.virus en homologe antilichamen op elkaar laten inwerken, in dusdanige hoeveelheden, dat er niet voldoende virus meer voorhanden was om kippenerythrocyten te doen agglutineren. Echter, dit mengsel, in ovo gebracht, bezat nog infecterend vermogen.

De volgende mogelijkheden bestaan nu:

- a. Het serum heeft het virus gebonden, zodanig dat de agglutinerende eigenschap van het virus verloren ging, maar de infectieuze behouden bleef.
- b. Het serum heeft een andere binding met het virusagglutinine aangegaan dan met het infectieuze deel van het virus, of: de anti-haemagglutininen waren voldoende, de neutraliserende antilichamen onvoldoende in het serum aanwezig.
- c. Het serum heeft niet al het vrije virus gebonden, doch heeft iets overgelaten, minder dan 1 A.E., echter meer dan (of juist) 1 E.I.D.

Bekijken we de onder a. genoemde mogelijkheid nader, dan achten we de kans hiervoor niet zo groot, aangezien alle bewerkingen van influenzavirus (bestralen, verhitten, laten verouderen, formale toevoegen) de infectieuze eigenschap verloren doet gaan, terwijl de agglutinerende eigenschap behouden blijft. Bij de virussen van de Columbia SK-groep echter blijkt bij autolyse van het hersenmateriaal eerst de agglutinerende eigenschap te verdwijnen (DE BAAN et al., 1950). Verhitten en bestralen van dit virus heeft echter dezelfde gevolgen als bij het influenzavirus. Wat de tweede mogelijkheid betreft, zij het volgende opgemerkt. Indien de antilichamen in het serum een binding aangaan met het virusagglutinine, die niet correleert met de binding aan het infectieuze deel, houdt dit nog niet in, dat er geen identiteit bestaat tussen de haemagglutinatieremmende en neutraliserende antilichamen. De zelfde antilichamen kunnen zich verschillend gedragen ten opzichte van één of meer virusdeeltjes, wat de haemagglutinatatie betreft, alswel wat de neutralisatie betreft. Het milieu, waarin de antilichamen zich bevinden, zou b.v. de doorslaggevende factor kunnen zijn. Ter verduidelijking hiervan noemen wij de volgende mogelijkheden. Verschillende sera bevatten een onderling wisselend K-, Na- en Ca-gehalte. Bij de virussen van de Columbia SK-groep bevorderen K-ionen (Na-ionen minder) de haemagglutinatatie (JUNGBLUT en HORVATH, 1952), terwijl Ca-ionen deze remmen (BREMER, 1950). Indien twee of meer sera een verschillend aantal

Ca-ionen en/of K-ionen bevatten, die een invloed, welke niet evenredig is, uitoefenen in de haemagglutinatieremmingsreacties, terwijl deze ionen aan de neutralisatiereacties niets veranderen, zal het duidelijk zijn, dat er geen correlatie kan bestaan tussen de haemagglutinatieremmingstiters en de neutralisatietiters bij deze sera, terwijl de antilichamen identiek zijn. In de haemagglutinatieremmingsreactie is de invloed van de ionen, die zich in het serum of zijn verdunningen bevinden, voor zover men kan verwachten, veel geringer dan de invloed van de ionen in de verdunningsvloeistof, waarmee serum, virus en erythrocyten vermengd worden. Deze verdunningsvloeistof nu is in reacties bij verschillende sera gelijk. Verschillende concentraties ionen in verschillende sera zullen dus wel van gering belang zijn en hun invloed is te verwaarlozen.

Dat bij sera met een positieve Wasserman-reactie of met positieve Widal-reactie de haemagglutinatieremmingstiters relatief hoog zijn (ROKOHL en ZSCHUCKE, 1949), wijst evenzeer op de invloed welke het milieu kan uitoefenen, als de waarneming dat antilichamen zich verschillend kunnen gedragen in het serum van verschillende species. Immers, van de 6 influenza-antilichaam-titratiemethoden, welke in het laboratorium van BURNET sedert 1936 werden beproefd, gaven zelfs niet twee van deze reacties volledig correlerende titers bij mensensera; bij frettersera werd wel een correlatie tussen de verschillende titers gevonden (BURNET, 1946).

Bekijken we thans de mogelijkheid *c.*, dat wil zeggen, men meet de antilichamen van een serum met twee maten virus: i.e. de agglutinatien-eenheid en 2e. de infecterende dosis voor het ei (E.I.D.).

Er is een bepaald aantal verse influenzavirusdeeltjes nodig om één minimum infecterende dosis (M.I.D.) te bereiken (bij eieren E.I.D.). Evenzo is er een bepaald aantal E.I.D. nodig om één agglutinatien-eenheid (A.E.) te vormen. Eenmaal de A.E. voor een verzameling virusdeeltjes bereikt hebbend, blijkt er een lineaire correlatie te bestaan tussen het aantal M.I.D. en A.E. (HIRST, 1942). Ook is er een lineaire correlatie bekend tussen hoeveelheden serum en geneutraliseerd virus in de neutralisatiereactie (HORSFALL, 1939; BURNET, 1943; WALKER en HORSFALL, 1950), evenzo tussen hoeveelheden serum en de haemagglutinatieremming (HIRST, 1942).

Het zou echter heel eenvoudig zijn, wanneer we konden aannemen, dat x antilichamen ax virusdeeltjes hun haemagglutinerende eigenschap kunnen afnemen en bx virusdeeltjes de infectie-verwekkende

eigenschap. Bedenken we, dat uit de straks te beschrijven proeven blijkt, dat 640 maal verdund serum de haemagglutinerende eigenschap kan wegnemen bij 4 A.E. virus (= 160 maal verdund allantoïsvocht), terwijl dezelfde serumverdunding de infectieuze eigenschap kan neutraliseren bij ± 10 E.I.D. (= 160.000 maal verdund allantoïsvocht), dan rijst de vraag hoe het mechanisme van beide remmingen

TABEL 16

Haemagglutinatieremmings- en in ovo-neutralisatietiters (reciproke waarden) van anti-influenza-sera voor PR₈-virus

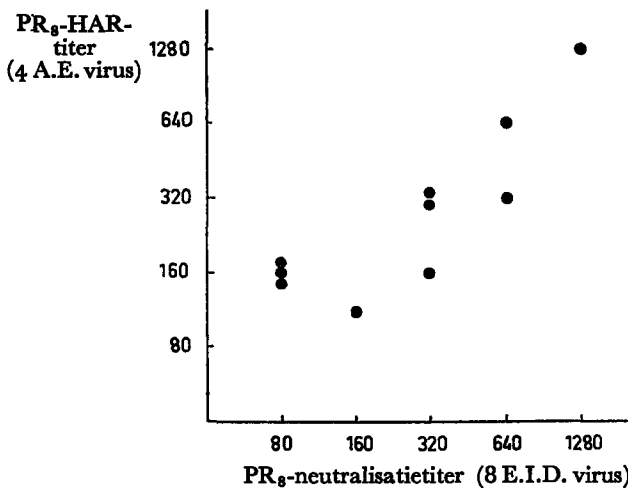
Serum no.	Serum	PR ₈ -HAR-titer	PR ₈ -neutral.titer bij:		
			2 E.I.D.	8 E.I.D.	16 E.I.D.
1.	Serum na vaccinatie met PR ₈ , FM ₁ - en Lee-stammen	160	320	(80)	—
1.	idem	160	—	(320)	160
2.	„	1280	—	(1280)	640
3.	„	640	—	(640)	320
4.	„	160	320	(80)	—
4.	„	80—160	—	(160)	80
5.	„	320	—	320	—
5.	„	160	—	(80)	40
6.	„	320	—	320	—
6.	„	160	—	(320)	160
21.	Normaal serum (mens)	0		0	

De titers, welke tussen haakjes worden vermeld, zijn berekende titers. Zie tekst.

werkt. Immers de factor 1000 in dit geval $\left(\frac{160.000}{160}\right)$ leidt tot merkwaardige voorstellingen. Men bepaalt de E.I.D. van PR₈-virus en vindt, dat men allantoïsvocht 1 : 6.400.000 moet verdunnen, hetgeen overeenkomt met de door HOYLE (1950) gevonden waarden; bepaalt men eveneens van dit allantoïsvocht een agglutinatie-eenheid (1 : 640),

dan is de ene eenheid (A.E.) 10.000 maal zo groot als de andere (E.I.D.). Deze factor 10.000 is van verschillende omstandigheden afhankelijk, b.v. wat de A.E. betreft: de agglutinabiliteit van kippen-erythrocyten door influenzavirus en wat de E.I.D. betreft: de ouderdom van het virus. Immers hoe ouder het virus wordt, hoe kleiner het aantal E.I.D. wordt, terwijl het aantal A.E. vrijwel gelijk blijft!

Men kan nu beide antilichaamtitraties uitvoeren. In de ene titratie gebruikt men 4 A.E.virus in de halve eindverduunning en bepaalt de remmingstiter van de haemagglutinatatie voor een serum. In de andere proef gebruikt men 8 E.I.D. van hetzelfde virus in de eindverduunning en bepaalt de neutralisatietiter voor dit serum. Indien men dezelfde hoeveelheden virus handhaaft bij een reeks sera (zie tabel 16) met antilichamen tegen PR₈-virus, dient men een lineaire correlatie te vinden tussen beide reeksen titers. Men kan deze in beeld brengen (fig. 7).



FIGUUR 7 *Correlatie tussen PR₈-HAR-titers en PR₈- in ovo-neutralisatietiters volgens tabel 16*

Mogelijkheid *c.* geeft aan, dat in de beide genoemde antilichaamtitraties met verschillende hoeveelheden (maten) virus hetzelfde wordt gemeten! Afwijkingen van de rechte lijn bij het in beeld brengen van de titerverhoudingen der sera, kunnen hun oorsprong vinden, behalve in technische onnauwkeurigheden, in het maatverschil. Echter zullen deze afwijkingen slechts zelden op de laatste wijze te verklaren zijn.

Van de sera, genoemd in tabel 16, werden in 3 verschillende proeven (waarbij uit contrôleproeven bleek, dat respectievelijk met 2,8 en

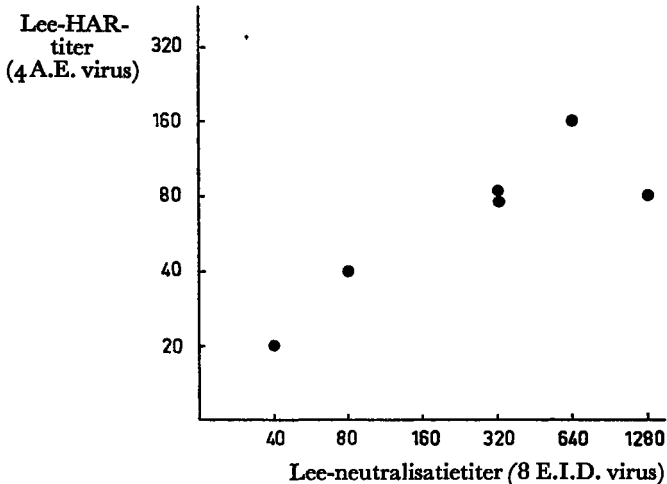
16 E.I.D.virus was gewerkt) de haemagglutinatiemmingstiters (HAR-titers) en de neutralisatietiters bepaald. Volgens de proef op blz. 26 beschreven, kan men de neutralisatietiters berekenen alsof 8 E.I.D. in de neutralisatiereactie werden gebruikt. Deze berekende waarden zijn tussen haakjes vermeld in tabel 16.

In tabel 17 (resp. fig. 8) is hetzelfde, dat tevoren voor PR₈-virus werd beschreven, voor Lee-virus uitgewerkt.

TABEL 17

Haemagglutineremmings- en in ovo-neutralisatietiters (reciproke waarden) van anti-influenza-sera voor Lee-virus

Serum no.	Serum	Lee HAR-titer	Lee-neutral. titer 8 E.I.D.
1.	Serum na vaccinatie met PR ₈ -, FM ₁ - en Lee-stammen	40	80
2.	idem	80	1280
3.	„	160	640
4.	„	80	320
5.	„	20	40
6.	„	80	320



FIGUUR 8 *Correlatie tussen Lee-HAR-titers en Lee- in ovo-neutralisatietiters volgens tabel 17*

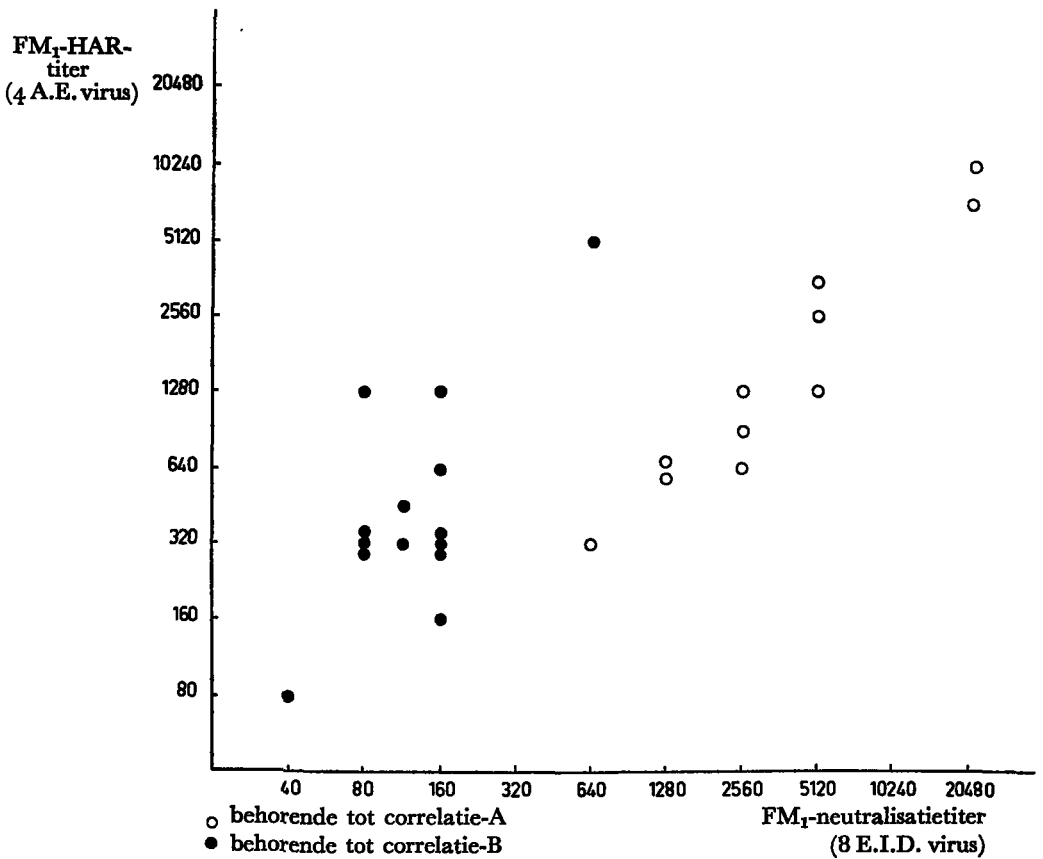
In tabel 18 staan de gegevens vermeld, verkregen uit verschillende titraties van 10 sera met antilichamen tegen influenza A-prime-virus. Van de sera werden op verschillende tijdstippen met verschillende hoeveelheden virus de neutralisatietiters voor FM₁-virus bepaald, evenals de haemagglutinatieremmingstiters. Uit tabel 18 (respectievelijk fig. 9) blijkt echter, dat van 5 sera de verhouding tussen HAR-

TABEL 18

Haemagglutinatieremmings- en in ovo-neutralisatietiters (reciproke waarden) van anti-influenza-sera voor FM₁-virus

Serum no.	Serum	FM ₁ -HAR-titer	FM ₁ -neutral.titer bij:			
			2-4 E.I.D.	8 E.I.D.	16 E.I.D.	32 E.I.D.
11.	A ₁ -reconvalesc.serum (mens)	640	2560	(1280)	—	—
11.	„	1280	—	5120	—	—
11.	„	5120—10240	—	(20480)	—	5120
12.	A ₁ -reconvalesc.serum (mens)	640	2560	(1280)	—	—
12.	„	1280	—	2560	—	—
12.	„	10240	—	(20480)	—	5120
17.	A ₁ -reconvalesc.serum (fret)	640—1280	5120	(2560)	—	—
17.	„	2560—5120	—	5120	—	—
17.	„	320	—	(640)	—	160
7.	A ₁ -reconvalesc.serum (mens)	640	—	(2560)	—	640
8.	A ₁ -reconvalesc.serum (mens)	2560	—	(5120)	—	1280
9.	A ₁ -reconvalesc.serum (mens)	320	—	(80)	40	—
9.	„	320	—	(80)	40	—
18.	V-reconvalesc.serum (fret)	320	—	(80)	40	—
18.	„	320	—	(160)	—	40
18.	„	320	320	(80—160)	—	—
18.	„	320	—	160	—	—
10.	A ₁ -reconvalesc.serum (mens)	80	—	(40)	20	—
10.	„	320	—	(160)	80	—
19.	A ₁ -reconvalesc.serum (fret)	320—640	320	(80—160)	—	—
19.	„	640	—	160	—	—
19.	„	1280	—	(160)	—	40
19.	„	1280	—	(80)	40	—
20.	A ₁ -reconvalesc.serum (fret)	160	—	(160)	80	—
20.	„	5120	—	(640)	—	160

titers en neutralisatietiters uitgedrukt kan worden in correlatie-A (fig. 9), terwijl 5 andere sera op dezelfde wijze de correlatie-B (fig. 9) vormen.



FIGUUR 9

Correlatie tussen FM₁-HAR-titers en FM₁-in ovo-neutralisatietiters volgens tabel 18

In tabel 19 (resp. fig. 10) zijn van enige anti-influenza H-sera de HAR-titers en de neutralisatietiters aangegeven, welke verkregen werden door de sera op antilichamen tegen H-virus te onderzoeken.

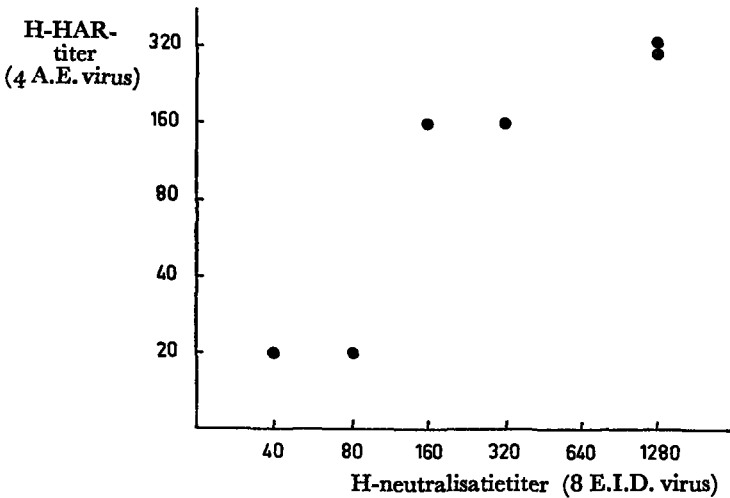
SAMENVATTING VAN DE RESULTATEN

In de figuren 7 tot en met 10 staan van 21 sera, die antilichamen bevatten tegen influenza A- en influenza B-stammen, de verhoudingen van haemagglutinatieremmingstiters en neutralisatietiters afgebeeld. In de HAR-reactie werd met 4 A.E.virus in de halve eindverduunning gewerkt; in de neutralisatiereactie met 8 E.I.D.virus in de eindver-

TABEL 19

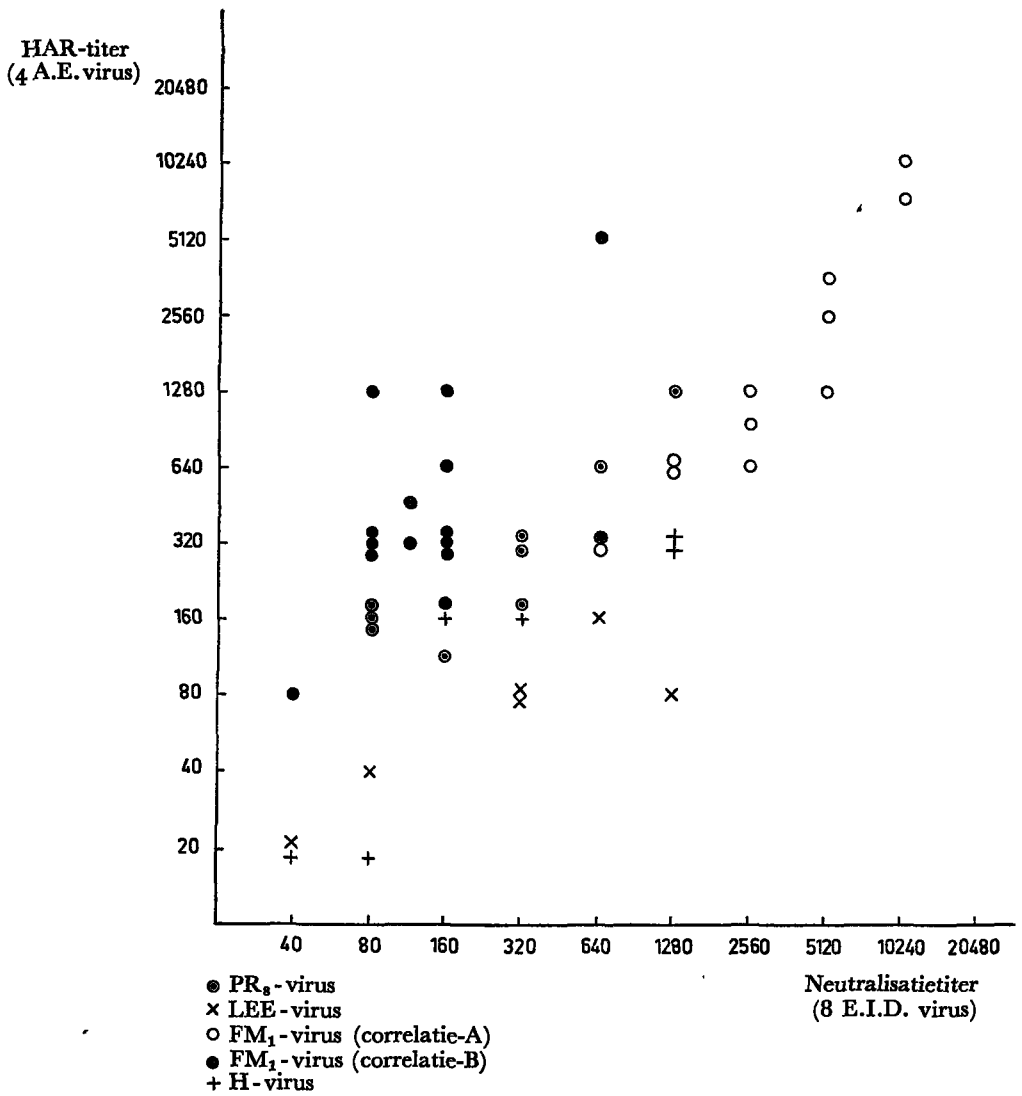
Haemagglutineremmings- en in ovo-neutralisatietiters (reciproke waarden) van anti-influenza-sera voor H-virus

Serum no.	Serum	H-HAR-titer	H-neutral.titer bij:		
			4 E.I.D.	8 E.I.D.	32 E.I.D.
13.	H-reconvalesc.serum (mens)	320	2560	(1280)	—
14.	„	320	2560	(1280)	—
15.	„	160	320	(160)	—
16.	„	160	640	(320)	—
13.	„	20	—	(80)	20
14.	„	20	—	(40)	10



FIGUUR 10 *Correlatie tussen H-HAR-titers en H-in ovo-neutralisatietiters volgens tabel 19*

dunning. Indien men de figuren 7 tot en met 10 op één assenstelsel samenbrengt, ontstaat fig. 11, waarop de lineaire correlatie tussen de HAR- en neutralisatietiters dadelijk in het oog springt. Echter dient opgemerkt te worden, dat van een deel der anti-A-prime-sera de correlatiepunten van deze titers (correlatie-B genoemd) buiten die zône van fig. 11 liggen, waarin de overige sera hun correlatiepunten hebben. Tot deze laatste sera hoort ook het andere deel van de anti-A-prime-sera, waarvan de correlatiepunten van HAR- en neutralisatietiters de zogenaamde correlatie-A vormen.

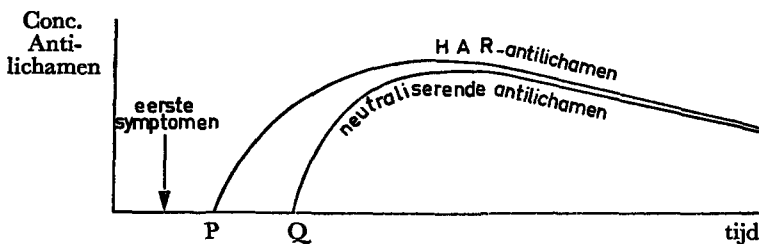


FIGUUR 11

De correlaties-A en -B zijn een aanwijzing, dat er inderdaad afwijkingen bestaan van de „lineaire correlatie tussen HAR- en neutralisatietiters”. Het is evenwel opvallend, dat deze afwijkende sera onderling, wat de telkens genoemde titers betreft, weer een lineair verband tonen.

Indien de HAR-antilichamen identiek zijn met de neutraliserende en de beide antilichaamtiters niet met elkaar overeenkomen, slechts doordat met verschillende hoeveelheden virus wordt getitreerd, is toch een lineaire correlatie te verwachten, zoals blijkt uit de beschreven proeven.

De sera van correlatie-A en van correlatie-B zijn grotendeels afkomstig van personen, die in 1950—'51 aan influenza leden. ISAACS, GLEDHILL en ANDREWES (1952) beschreven twee subtypen van het influenza A-prime-virus van 1947 en 1949, die vanuit Scandinavië (het S-type) en vanuit het Zuidelijk halfrond (het Liverpool-type of L-type) Europa in 1950 zouden zijn binnengedrongen. Het S-virus bleek zeer nauw verwant aan het A-prime-virus, terwijl het L-virus even verschillend van het A-prime-virus bleek te zijn als het A-prime-virus van het A-virus. In ons land werden zowel het S-type als het



FIGUUR 12

Hypothetische voorstelling van haemagglutinerremende en neutraliserende antilichamen, welke op verschillende tijdstippen ontstaan, zich dan parallel handhaven om vervolgens parallel te verdwijnen

L-type geïsoleerd en men kan zich afvragen of soms anti-L-sera respectievelijk anti-S-sera correlatie-A en correlatie-B vormen. Uit de anamnese der sera van tabel 20 volgt, dat correlatie-A wordt gevormd door twee anti-L-sera, één serum, dat uit den Haag, alwaar het L-type hier te lande werd geïsoleerd, en één serum dat uit Sittard afkomstig bleek te zijn, terwijl het vijfde serum een door ons vervaardigd anti-A-prime-serum was. Correlatie-B werd gevormd door anti-S- en anti-A-prime-sera.

Er is dus enige aanleiding om de beide groepen sera in anti-S- of -A-prime-sera en anti-L-sera te onderscheiden. Het L-virus is een veel sterker antigeen met specifiekere werking dan het S-virus, hetgeen zowel in de in ovo-neutralisatiereactie als in de HAR-reactie tot uiting

kwam (ISAACS, GLEDHILL en ANDREWES, 1952). Gesteld nu, dat de werkzaamheid van het L-virus, welke met homolog antiserum groter is dan met heteroloog antiserum, zich meer in de ovo-neutralisatie-reactie dan in de HAR-reactie zou uiten, dan toch kunnen correlatie-A en -B hiermee niet verklaard worden, aangezien de sera alle op FM₁ (A-prime)-antilichamen werden onderzocht en niet op L-antilichamen of op beide.

De afwijkende sera, die correlatie-B vormen in fig. 11, wijzen dus op een andere binding van het serum met het virus-haemagglutinine dan die van het serum met het infectieuze deel van het virus, dat wil zeggen, dat de hypothese van het bestaan van twee soorten antilichamen, haemagglutinatieremmende en neutraliserende, moet worden overwogen.

TABEL 20

Overzicht van het afnemen der anti-A-prima-sera, wat betreft het aantal dagen na het begin der ziekte of na de vaccinatie

Serum no.	Sera correlatie-A	Aantal dagen na begin ziekte of na vaccinatie afgenomen
17.	A ₁ -reconvalesc.serum (fret)	14
11.	A ₁ -reconvalesc.serum (mens)	16
12.	„	10
7.	„	40
8.	„	7
	Sera correlatie-B	
18.	A ₁ -reconvalesc.serum (fret)	14
19.	„	14
20.	„	14
10.	A ₁ -reconvalesc.serum (mens)	14
9.	„	15

Zouden beide soorten antilichamen in het serum op verschillende tijdstippen (P en Q) ontstaan en eenmaal het maximum aantal bereikt hebbend, zich hierop enige tijd handhaven om dan beide tegelijkertijd en evenredig te gaan dalen (zie fig. 12)? Om dit na te gaan, kan men de tijdsduur, gelegen tussen de eerste symptomen en het afnemen van de sera van tabel 18 nader beschouwen.

Wanneer de afwijkende sera b.v. van correlatie-B alle blijken ongeveer op hetzelfde tijdstip na het begin van de ziekte en de sera van correlatie-A in ieder geval eerder zijn afgenomen, dan zou dit de resultaten van de reeds beschreven proeven kunnen uitleggen en leiden tot nieuwe experimenten. Uit tabel 20 volgt echter, dat er geen aanwijzing in die richting bestaat. Tevens volgt uit tabel 20, dat er tussen fretten- en mensen-immuunsera geen verschil in het gedrag van de haemagglutinatieremmende en neutraliserende antilichamen valt te constateren, hetgeen BURNET (1946) wel vermeldt.

En dus kon er geen verklaring gevonden worden voor het gedrag van enige anti-influenza A-prime-sera, dat afwijkend was van de andere anti-A-prime-sera, hoewel er in het algemeen tussen de hoeveelheden haemagglutinatieremmende en neutraliserende antilichamen van influenza-immuunsera voor verschillende stammen, getitreerd tegen hun respectieve stammen, een lineaire correlatie bleek te zijn.

III

NEUTRALISERENDE EN HAEMAGGLUTINATIE- REMMENDE ANTILICHAMEN BIJ INFECTIES MET VIRUSSEN VAN DE COLUMBIA SK-GROEP

JUNGBLUT en HORVATH (1951) vonden, dat 16 % van de sera van poliomyelitis-patiënten de haemagglutinatie door Columbia SK-virus remden. In de contrólereeks van normale sera gaf slechts 2,5 % een haemagglutinatieremming te zien. Normale apensera remmen volgens JUNGBLUT en HORVATH nooit een virushaemagglutinatie en vele mensensera remmen deze slechts gedeeltelijk, echter nooit volledig. Zij noemden een remming, slechts optredende bij een serumverdunding 1 : 10 negatief, tot 1 : 20 dubieus en bij een serumverdunding 1 : 20 of hoger positief. Met het grootste gedeelte der sera, die de Columbia SK-haemagglutinatie remden, werd een neutralisatie-reactie uitgevoerd op muizen. Van de 14 sera, waarbij dit werd gedaan, hadden er 5 een neutralisatie-index tussen 100 en 1000; deze konden als positief worden beschouwd. 9 waren echter negatief. De conclusie van JUNGBLUT en HORVATH is, dat er geen constante relatie bestaat tussen de aantallen haemagglutinatieremmende en neutraliserende antilichamen.

GARD en HELLER (1951) onderzochten een groot aantal (384) sera van patiënten met poliomyelitis en encephalitis op de aanwezigheid van antilichamen tegen de MM-stam, die vrijwel identiek is met de Columbia SK-stam. Zij vonden bij 12,5 % positieve haemagglutinatie-remmingstiter, doch neutraliserende antilichamen konden in de muisbeschuttingsproef niet worden aangetoond. In de contrólereeks van 146 normale sera gaf 0,7 % een haemagglutinatieremming te zien; ook hier ontbraken neutraliserende antilichamen. GARD en HELLER noemden de remming, optredende bij een serumverdunding 1 : 8, reeds positief. Een MM-hyperimmuunkonijnenserum bleek, behalve een hoge haemagglutinatieremmingstiter, tevens een aanzienlijke neutralisatie-index te hebben.

VIVELL c.s. (1952) verrichtten bij 9 sera van poliomyelitis-patiënten muisbeschuttingsproeven en haemagglutinatieremmingsreacties. 5 sera bleken neutraliserende antilichamen voor Columbia SK-virus te hebben en remden de haemagglutinatie van dit virus; één van deze 9 sera gaf in beide reacties dubieuze resultaten en bij 3 sera trad wel haemagglutinatieremming op, terwijl neutraliserende antilichamen ontbraken. HOFMAN en JUNGBLUT (1952) onderzochten 60 sera van 23 poliomyelitis-patiënten en 30 contactpersonen. Van de 23 patiëntensera vertoonde 17,3 % een remming van de haemagglutinatie door Columbia SK-virus, terwijl de sera van de contactpersonen deze niet remden. Neutraliserende antilichamen echter waren bij 8,7 % van de sera der patiënten aan te tonen en bij 16,7 % van de sera der contactpersonen. Bijna alle sera werden echter pas 6 maanden na de infectie afgenomen. KELLER en VIVELL (1952) trekken uit de proeven van HOFMAN en JUNGBLUT de conclusie, dat, hoewel beide soorten antilichamen, neutraliserende en haemagglutinatieremmende in mensensera aanwezig, de laatste buiten een endemie om niet of nauwelijks aantoonbaar zijn.

MATERIAAL EN TITRATIEMETHODEN

Virus

De volgende virusstammen werden gebruikt: Columbia SK, MM, EMC en „High Lansing Schultz”, alle behorende tot de Columbia SK-groep. Verder de Yale SK-stam (type 2 poliomyelitisvirus) en de stammen FA en GD VII van het muizen-encephalitisvirus van THEILER.

Sera

De sera, waarmee de titraties op Columbia SK-antilichamen werden verricht, zijn afkomstig van:

- 1e. poliomyelitis-reconvalescenten.
- 2e. patiënten, die vermoedelijk lijdende waren aan poliomyelitis.
- 3e. konijnen, die geïmmuniseerd waren tegen respectievelijk EMC-, MM-, Columbia SK-, High Lansing Schultz-, Yale SK-, GD VII- en FA-virus.
- 4e. een schaap, dat kort na de geboorte intramusculair besmet was met Columbia SK-virus, doch hierop niet met ziekteverschijnselen reageerde.
- 5e. cynomolgus-ape, die de intramusculaire- of intracerebrale besmetting met Columbia SK-virus hadden overleefd.
- 6e. „normale” mensen, konijnen en apen.

Titratie van Columbia SK-antilichamen door middel van de haemagglutinatieremmingsreactie

Van het geïnactiveerde serum wordt een tweevoudige verdunningsreeks gemaakt, te beginnen met 0,25 ml onverdund serum. De verdunningsvloeistof is steriele physiologische keukenzoutoplossing ($P_H = 7$). Bij ieder buisje wordt een gelijke hoeveelheid (0,25 ml) virus-suspensie gevoegd, die 8 A.E.virus bevat. Dit mengsel wordt 30 min. in een waterbad met een temperatuur van $37^\circ C$ geplaatst, waarna 0,5 ml schapenerythrocyten-suspensie 0,25 % wordt toegevoegd. De buizen worden in de koelkast geplaatst na nogmaals goed te zijn geschud. Na 3—4 uur worden de resultaten afgelezen.

De titer van het serum wordt aangegeven door tweemaal de oorspronkelijke verdunning in afwijking van DE BAAN (1950). Naast iedere haemagglutinatieremmingsreactie wordt een serum-, virus- en erythrocytencontrôle verricht, zoals bij de pokken-haemagglutinatieremmingsreactie is aangegeven (zie blz. 4).

De virus-suspensie, die wordt toegevoegd, wordt tevoren de zelfde dag op agglutinerend vermogen beproefd. Als virus-suspensies worden de hersenen van muizen gebruikt, die door voortgezette aethernarcose worden gedood, zodra duidelijke paralyse van de achterpoten na een intracerebrale enting met Columbia SK-virus is opgetreden. Deze muizenhersenen worden in een steriele mortier fijngewreven, waarna steriele physiologische keukenzoutoplossing wordt toegevoegd tot een 5 %-suspensie is verkregen. Deze wordt vervolgens 20—30 min. gecentrifugeerd met een snelheid van 3000 omw./min. Van de zorgvuldig afgepipetteerde steriele bovenstaande vloeistof wordt een tweevoudige verdunningsreeks gemaakt. Ieder buisje van de reeks bevat 0,5 ml virus-suspensie. Bij elk buisje wordt 0,5 ml schapenerythrocyten-suspensie 0,25 % gevoegd, nadat het virus 30 min. in een waterbad van $37^\circ C$ heeft gestaan. De buizen worden krachtig geschud en bij een temperatuur van $4^\circ C$ geplaatst. Na 3—4 uur wordt de haemagglutinatiereactie afgelezen.

Het is mogelijk, dat de eerste buizen een haemagglutinatie te zien geven als gevolg van de aanwezigheid van heterophile agglutinen in de sera (reactie van PAUL en BUNNELL). De heterophile antilichamen geven bij konijnen geen hogere titer dan 1 : 32; bij apen is dit eveneens het geval. Bij uitzondering werd éénmaal een titer van 1 : 256 aangetroffen.

Het aantal A.E. Columbia SK-virus beïnvloeden evenredig de titer van het serum in deze haemagglutinatieremmingsreactie, zoals getoond wordt in fig. 13. Door middel van voorafgaande virustitratie werden Columbia SK-virus-suspensies bereid, die respectievelijk 1, 2, 4, 8, 16 A.E.virus bevatten. Van het serum worden de verdunningen aangegeven, zoals zij waren voordat de erythrocyten-suspensie werd toegevoegd.

FIGUUR 13

Invloed van het aantal A.E. Columbia SK-virus op de haemagglutinatieremmingstiter van een homoloog antiserum

Columbia SK-virus A.E.	Serumverdunningen Columbia SK-reconvalesc.serum (aap)										
	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	1/8192	1/16384	1/32768
0	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
4	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
8	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
16	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+

+ = haemagglutinatie
- = geen haemagglutinatie

Titratie van Columbia SK-antilichamen door middel van de neutralisatiereactie bij muizen (muisbeschuttingsproef)

Van verse muizenhersenen, met Columbia SK-virus besmet, wordt een 20 %-suspensie bereid. Hiervan wordt een 10-voudige verdunningsreeks met steriele physiologische keukenzoutoplossing (PH = 7) gemaakt. Op deze wijze krijgt men een reeks verdunningen van $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{50}$, $\frac{1}{500}$, etc. Elke buis bevat 3 ml vloeistof. Van deze verdunningen wordt 1,5 ml uit elke buis in een andere rij buizen gepipetteerd, zodat men twee gelijke reeksen buizen met virusverdunningen $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{50}$, $\frac{1}{500}$, etc. verkrijgt, waarvan iedere buis 1,5 ml bevat. Bij de ene reeks wordt telkens 1,5 ml van het geïnactiveerde te onderzoeken serum (1 : 10 verdund) gepipetteerd, terwijl bij de andere reeks buizen een ge-

inactiveerd contrôleserum (1 : 10 verdund) wordt gevoegd. De eindverduunningen van het virus zijn nu 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} etc. geworden. De buizen, die nu elk 3 ml bevatten, worden krachtig geschud en vervolgens 60 min. bij een temperatuur van 4° C geplaatst. Telkens 4 muizen worden daarop intraperitoneaal (0,5 ml) met elke verduunning besmet! Het contrôleserum is konijnen-, apen- of mensenserum, al naar gelang het te onderzoeken serum van konijnen, apen of mensen afkomstig is. Echter bleken normale konijnen-, apen- of mensensera geen onderlinge verschillen aan te geven bij de virus-titraties en eenzelfde LD_{50} -titer (de verduunning, welke nog juist de dood van 50 % van de gebruikte proefdieren veroorzaakt) op te leveren, als wanneer men physiologische keukenzoutoplossing gebruikt in plaats van de normale sera.

De LD_{50} -titer en de neutralisatie-index worden bepaald volgens de methode van REED en MUENCH (1938). Bij deze proefnemingen werd zorg gedragen, dat steeds muizen van ± 10 gr werden gebruikt. Zij bleven gedurende 10 dagen na de besmetting onder contrôle. Muizen, welke binnen 48 uur na de enting stierven, werden buiten beschouwing gelaten.

SERUM-ONDERZOEK

De sera werden op de aanwezigheid van Columbia SK-antilichamen getitreerd volgens de haemagglutineringsreactie (HAR) en volgens de neutralisatiereactie (muisbeschuttingsproef).

Van Dr C. W. JUNGBLUT werden de gegevens van de neutralisatiereacties ontvangen, welke hij bij muizen verrichtte met 5 mensensera. Tabel 21 geeft de neutralisatie-indices aan, berekend volgens REED en MUENCH (1938). De sera waren niet geïnactiveerd. Volgens JUNGBLUT (1950) verandert de neutralisatie-index door het inactiveren niet. De viruscontrôles werden met normale apensera verricht. Bij deze neutralisatiereacties van JUNGBLUT werden de virus-serum mengsels langer bij 4° C geïncubeerd (één nacht in plaats van 60 min.) en de muizen met 0,2 ml in plaats van met 0,5 ml intraperitoneaal besmet.

Tabel 22 geeft de logarithmen van de neutralisatie-indices en de HAR-titers weer, welke van de sera 6 tot en met 22 op gelijke tijdstippen werden bepaald. Tabel 22, in figuur gebracht, laat fig. 15 zien. Fig. 14 geeft hetzelfde aan bij de sera 1 tot en met 5 (tabel 21).

TABEL 21

Neutralisatie-indices (in log) en haemagglutinatieremmingstiters (reciproke waarden) van poliomyelitis-reconvalescentensera voor Columbia SK-virus

Serum no.	Serum	Log.neutral.-index	HAR-titer
1.	Poliomyelitis-reconvalesc.serum (mens)	4,52	128
2.	„	4,50	0
3.	„	2,75	0
4.	„	4,00	0
5.	„	3,20	0

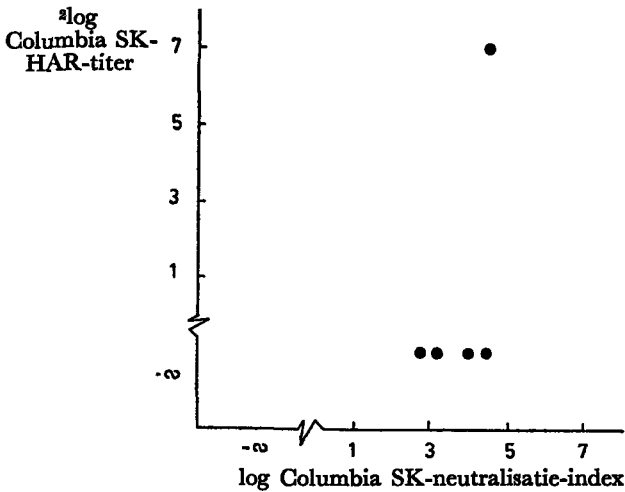
Naar analogie van de proefneming, welke WALKER en HORSFALL (1950) met influenzavirus verrichtten, werd een Cynomolgus-aap één intramusculaire inspuiting gegeven, die 1 ml Columbia SK-virus-suspensie 20 % bevatte. Na 3 weken werd hartpunctie bij deze aap gedaan, die intussen een voorbijgaande paralyse van één van beide

TABEL 22

Neutralisatie-indices (in log) en haemagglutinatieremmingstiters (reciproke waarden) van homologe en heterologe antisera voor Columbia SK-virus

Serum no.	Serum	Log.neutral.-index	HAR-titer
6.	Poliomyelitis?-reconvalesc.serum (mens)	2,00	0
7.	„	5,02	0
8.	„	5,16	0
9.	Columbia SK-hyperimmuunserum (konijn)	5,54	1024
10.	E.M.C.-hyperimmuunserum (konijn)	9,74	4096
11.	MM-hyperimmuunserum (konijn)	7,00	256
12.	Yale SK-hyperimmuunserum (konijn)	0	0
13.	GD VII-hyperimmuunserum (konijn)	5,68	0
14.	FA-hyperimmuunserum (konijn)	4,32	8
15.	High Lansing Schultz-hyperimmuunserum (konijn)	10,00	4096
16.	Columbia SK-reconvalesc.serum (schaap)	4,93	4
17.	Yale SK-reconvalesc.serum (aap)	3,5	0
18.	Columbia SK-reconvalesc.serum (aap)	9,68	4096
19.	„	7,24	2048
20.	„	8,72	16384
21.	„	7,10	4096
22.	„	6,26	256

achterpoten had gehad. Het bloedserum, dat op deze wijze was afgenomen, werd serum 19 genoemd. Vervolgens werd de zelfde aap nog 3 zulke intramusculaire inspuitingen toegediend met driemaal 2 weken tussenruimte en tenslotte werd 3 weken na de laatste inspuiting hartpunctie verricht. Dit bloedserum werd serum 20 genoemd. Een zelfde behandeling van een konijn, dat WALKER en HORSFALL 4 maal influenzavirus inspoten, gaf het op blz. 22 beschreven resultaat, dat de HAR-titer van het serum na één inspuiting en van het serum na 4 inspuitingen geen verschil vertoonden, terwijl duidelijk bleek,



FIGUUR 14

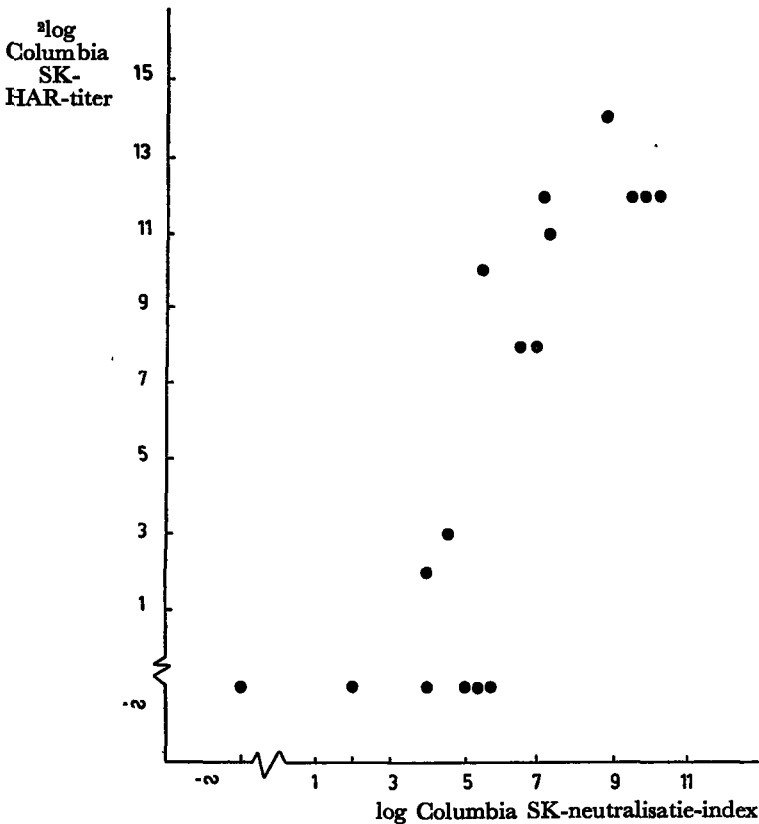
Correlatie tussen neutralisatie-indices en HAR-titers voor Columbia SK-virus volgens tabel 21

dat de neutralisatietiter van het tweede serum 6 maal hoger was dan van het eerste serum.

Ook bij serum 19 en 20 werden HAR-titers en neutralisatie-indices bepaald. De HAR-titer van serum 20 was 8 maal hoger dan die van serum 19, terwijl de neutralisatietiter van serum 20 ongeveer 40 maal hoger bleek te zijn dan die van serum 19. Deze bepalingen werden nogmaals nauwkeurig herhaald, waarbij ongeveer gelijke resultaten werden verkregen. Met serum 20 werd bovendien een proefneming gedaan, welke hieronder wordt beschreven.

Eén (portie A) van twee porties van 1 ml serum (20) werd gemengd met 1 ml van een Columbia SK-virus-suspensie (geïnfecteerde muizenherse-
nen 10^{-5} verdund) en de andere (portie B) met physiologische keuken-

zoutoplossing ($P_H = 7$). Deze mengsels werden geschud en 60 min. bij een temperatuur van $37^\circ C$ geïncubeerd en vervolgens werd bij beide mengsels 2 ml schapenerythrocyten-suspensie 2 % toegevoegd, teneinde eventueel vrij virus te adsorberen. Beide mengsels werden na krachtig schudden een nacht bij $4^\circ C$ geplaatst. De volgende dag



FIGUUR 15

Correlatie tussen neutralisatie-indices en HAR-titers voor Columbia SK-virus volgens tabel 22

werd de bovenstaande vloeistof afgepipetteerd en op deze wijze werden twee porties serum 1 : 4 verdund verkregen, waarvan portie A in aanraking was geweest met virusdeeltjes; portie B niet. In serum A bleek bij enting op muizen geen virus meer aantoonbaar te zijn; evenmin deed het serum schapenerythrocyten agglutineren.

Beide porties serum werden aan de haemagglutinatieremmings-

reactie onderworpen. De HAR-titers waren gelijk. Misschien werden door het virus geen (of niet voldoende) antilichamen gebonden om verschil in de haemagglutinatieremmingsreactie aan te geven. De remmingstiter bedroeg in beide reacties 1 : 16384, ook bij herhaling van de gehele proef.

Met dezelfde porties steriel serum werden eveneensmuisbeschuttingsproeven verricht. Van de ene portie serum A, degene die met virus in aanraking was geweest, bedroeg de logarithme van de neutralisatie-index 1,83; van het contrôleserum 3,67 of meer. De muisbeschuttingsproeven werden op de tevoren beschreven wijze uitgevoerd, slechts werd de hoeveelheid waarmee de muizen besmet werden, gereduceerd tot 0,1 ml intraperitoneaal, waardoor de waarden niet vergelijkbaar zijn met de vorige neutralisatie-index-bepalingen van serum 20.

Het serum dus, waarvan de antilichamen gebonden zijn of zijn geweest aan virusdeeltjes (de eventuele vrije virusdeeltjes werden geadsorbeerd aan schapenerythrocyten) geeft geen andere haemagglutinatieremmingstiter, terwijl de neutralisatie-index wel gewijzigd wordt en wel ongeveer honderdvoudig.

SAMENVATTING VAN DE RESULTATEN

Zoals fig. 15 laat zien, bestaat er enig verband (een lineaire correlatie?) tussen de HAR-titers en de neutralisatie-indices van 17 sera, welke op antilichamen tegen Columbia SK-virus werden onderzocht. Men kan zeggen, dat indien de logarithme van de neutralisatie-index ongeveer de waarde 6 of meer bereikt een HAR-titer van enig belang te zien is, welke stijgt naarmate de neutralisatie-index een hogere waarde bereikt.

Een logarithme van de neutralisatie-index, welke ongeveer de waarde van 5 of minder heeft, gaat gepaard met een zeer lage of geen HAR-titer. De HAR-titer 1 : 10 wordt door JUNGBLUT en HORVATH (1951) negatief genoemd en dit is het geval bij serum 16 en 14.

Fig. 14 toont oppervlakkig gezien overeenstemming met fig. 15, in zoverre dat 4 sera een logarithme van de neutralisatie-index onder de waarde 5 bezitten en geen HAR-titer hebben. Van één serum (serum 1) echter, dat een HAR-titer hoewel niet hoog dan toch van enig belang heeft, bereikt de logarithme van de neutralisatie-index niet de waarde van 6 of hoger. Doch de neutralisatiereacties werden met andere hoeveelheden virus uitgevoerd (zoals nauwkeurig werd

beschreven) en men kan de uitkomsten van deze proeven dan ook niet op dezelfde wijze interpreteren.

Van een Cynomolgus-aap, die 4 intramusculaire inspuitingen kreeg met Columbia SK-virus, werd na de eerste inspuiting serum afgenomen, evenals nadat alle inspuitingen gegeven waren. Van beide porties serum werd een HAR-titer en een neutralisatie-index bepaald. De HAR-titer van het tweede serum bleek 8-voudig gestegen, terwijl de neutralisatie-index 40-voudig gestegen bleek te zijn. Al is het niet overeenkomstig stijgen van beide titers geen absoluut bewijs, het geeft een aanwijzing, dat er geen lineaire correlatie bestaat tussen de HAR-titer en de neutralisatie-index.

Tenslotte werd een antiserum gedeeltelijk verzaadigd met virus. De eventueel aanwezige vrije virusdeeltjes, die niet door het antiserum werden gebonden, bleken uit naderhand verrichte viruscontrôles aan de schapenerythrocyten die nog werden toegevoegd, geadsorbeerd te zijn. Op deze wijze werd een antiserum verkregen, dat een HAR-titer bezat, welke ongewijzigd bleek in vergelijking met de oorspronkelijke HAR-titer, terwijl de neutralisatie-index ongeveer 100-voudig was teruggelopen. Deze HAR-titers en de neutralisatie-indices werden bepaald van het partiëel verzaadigde serum en van het contrôleserum, dat eveneens aan de beschreven handelingen werd onderworpen.

Uit het feit, dat de HAR-titer en de neutralisatietiter niet overeenkomstig daalden na partiëele verzaadiging van het antiserum met virus, kan men besluiten dat een lineaire correlatie tussen deze titers ontbreekt.

IV

BESCHOUWINGEN

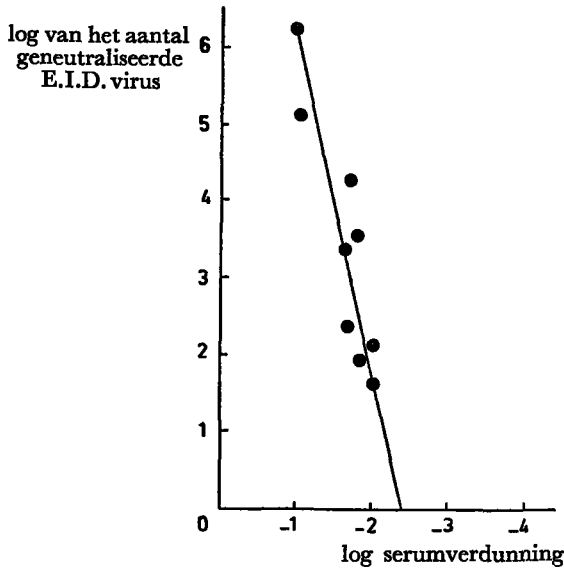
Alvorens de resultaten van de onderzoeken aan een bespreking te onderwerpen, volgen hier enige opmerkingen over de betrouwbaarheid van de gebruikte titratiemethoden en over het vergelijken van de daarmee verkregen antilichaamtiteren.

BURNET (1943) bemerkte, dat indien hij van een reeks in ovo-neutralisatiereacties, waarbij achtereenvolgens verschillende hoeveelheden influenza A-virus telkens met wisselende homologe serumhoeveelheden werden samengebracht, graphisch de logaritmen der neutralisatietiters weergaf, een beeld ontstond, zoals fig. 16 aangeeft.

Voor andere anti-influenza A-sera bleken lijnen te kunnen worden afgeleid, welke steeds parallel liepen aan de lijn op fig. 16. Dat deze evenwijdige lijnen een steile helling vertoonden, merkte BURNET tevens op. Het lineaire quantitative verband tussen virus en antilichamen in de in ovo-neutralisatiereactie, zoals uit het bovenstaande is af te leiden, werd HORSFALL (1939) bij muizenproeven reeds duidelijk.

WALKER en HORSFALL (1950) leidden uit soortgelijke in ovo-neutralisatiereacties bij anti-influenza A- en anti-influenza B-sera grafieken af, welke overeenkwamen met die van BURNET. De reeds genoemde steile helling der lijnen, welke enigszins minder steil blijkt te worden, wanneer men de virus-serum mengsels langere tijd op elkaar laat inwerken (BURNET, 1943; WALKER en HORSFALL, 1950), geeft aan, dat een 10-voudige verandering van de in ovo-neutralisatietiter van een serum een 500.000-voudige verandering teweegbrengt van het in ovo geneutraliseerde aantal E.I.D. Anders gezegd geeft deze helling aan, dat anti-influenza-serum onevenredig snel zijn vermogen verliest influenzavirus te neutraliseren, wanneer het verdund wordt. Dit is niet het geval bij anti-vacciniasera. SALAMAN (1937) en PARKER (1939) namen met behulp van de konijnenhuidreactie waar, dat anti-vaccinia-sera bij verdunnen relatief meer virusdeeltjes kunnen neutra-

liseren. Hoewel ook in konijnenhuidreacties waarbij de serumhoeveelheid constant gehouden wordt en de virushoeveelheden worden gewisseld, geen evenredigheid tussen serum- en virushoeveelheid bestaat, maar het geneutraliseerde virus een functie is van de aan het mengsel toegevoegde hoeveelheid virus, trok PARKER (1939) uit zijn waarnemingen de conclusie, dat de methode met een constante hoeveelheid virus en wisselende hoeveelheden serum uit den boze was om het neutraliserend vermogen van anti-vaccinia-sera te bepalen.



FIGUUR 16 *Verband tussen de hoeveelheden geneutraliseerd virus en de respectieve hoeveelheden homolog antiserum bij influenzavirus*

WALKER en HORSFALL (1950) geven echter bij anti-influenza-sera juist de voorkeur aan (in ovo-)neutralisatiereacties met constante hoeveelheid virus en wisselende hoeveelheden serum. De reden hiervan is, dat de neutralisatiereactie in ovo met constante hoeveelheid serum en wisselende hoeveelheden virus aanzienlijk onbetrouwbaarder bleek te zijn. Want wanneer in de laatste reactie de virus-serum mengsels, waarvan dus slechts de virushoeveelheden verschilden, elk op 6 eieren werden geënt, troffen WALKER en HORSFALL na het bebroeden bij enige reeksen eieren zowel „positieve” (virus bevattende) als „negatieve” (geen virus bevattende) allantoïsvochten aan en konden zij daarom geen nauwkeurige neutralisatietiter bepalen. Tevens volgt,

aldus WALKER en HORSFALL, behalve uit de steile helling van de lijn op fig. 16 ook uit de onbetrouwbaarheid van de methode der wisselende hoeveelheden virus met constante serumhoeveelheid in de in ovo-neutralisatiereactie, dat men de influenza-antilichaamtiters, verkregen met in ovo-neutralisatiereacties, waarin enerzijds van wisselende hoeveelheden virus, anderzijds van wisselende hoeveelheden serum gebruik werd gemaakt, niet met elkaar mag vergelijken.

Neutralisatiereacties, waarvan STERNBERG reeds in 1892, vele jaren voordat zij in de bacteriologie werden toegepast, het principe vastlegde voor de titratie van vaccinia-antilichamen, blijken niet ideaal te zijn. Immers infectieus materiaal tezamen gebracht met homolog antiserum op een gevoelige gastheer, zou de laatste tot indicator van de werkzaamheid van het mengsel kunnen maken, indien tevens beantwoord werd aan de volgende eisen:

- a. Eén M.I.D. van het infectieus materiaal veroorzaakt *of* een ziekte, waarbij de dieren snel dood gaan *of* een direct optredende laesie. Immers, indien b.v. 10 dagen verlopen tussen de enting van het mengsel en het aflezen van het resultaat, vindt niet alleen virusvermenigvuldiging plaats maar ook antilichamvorming (RIVERS, 1948). Deze eis is meer van belang b.v. bij muisbeschuttingsproeven dan bij neutralisatiereacties in ovo, aangezien hier antilichamvorming vrijwel onbekend is.
- b. De mogelijkheid tot het bereiden van een standaard-M.I.D.
- c. Een standaard-gevoeligheid van de gastheer.

In de haemagglutinatieremmingsreacties, die in de voorafgaande hoofdstukken besproken werden voor het bepalen van antilichamen in antisera tegen variola-vaccinia-, influenza- en Columbia SK-virus, was sprake van constante virushoeveelheden (een bepaald aantal A.E.-virus) en wisselende hoeveelheden serum om de respectieve haemagglutinatieremmingstiters te bepalen. In deze haemagglutinatieremmingsreacties corresponderen de gebruikte hoeveelheden virus en de serumhoeveelheden, nodig om deze te remmen, recht evenredig met elkaar (zie blz. 5, blz. 45 en HIRST, 1942) en deze reacties zouden een beter indicator kunnen zijn van de werkzaamheid van verschillende serum-virus mengsels dan de complexe in vivo-reacties, wanneer men aanneemt dat in beide soorten reacties, in vitro en in vivo verricht, dezelfde antilichamen betrokken worden of indien de factor in het antiserum, welke de haemagglutinatie remt, parallel loopt met de neutraliserende antilichamen (HIRST, 1942).

Men zou zich kunnen voorstellen, dat het aanbeveling zou verdienen zowel in de genoemde in vivo- als in de in vitro-reacties, waarvan men bij een reeks sera de verschillende uitkomsten wil vergelijken, de methode van een constante virushoeveelheid en wisselende hoeveelheden serum of vice versa toe te passen, dat wil zeggen, dat alle neutralisatiereacties in onze proefnemingen volgens de eerste methode moeten worden verricht, gelijk aan de haemagglutinatieremmingsreacties.

Om de antilichamen tegen vacciniavirus te titreren werden drie methoden beschreven, een neutralisatiereactie in ovo, de konijnenhuidreactie (methode van GROTH) en de haemagglutinatieremmingsreactie. Terwijl in twee van deze reacties de methode der wisselende hoeveelheden serum met constante virushoeveelheid werd gebruikt, pasten wij in de derde, de konijnenhuidreactie, wisselende hoeveelheden virus met constante serumhoeveelheid toe.

Naast het feit, dat er bezwaren zouden kunnen zijn tegen het vergelijken van antilichaamtiters, verkregen met reacties waarvan het serum-virus mengsel-principe verschillend is, omdat het aantal onzekerheden met nog één vermeerderd wordt, heeft de konijnenhuidreactie volgens ANDREWES (1929) het bezwaar, dat de uitkomsten onoverkomelijk sterk variëren. Dit zou zowel door de variabiliteit van de konijnen wat betreft de weerstand tegen een vaccinia-infectie (men kan slechts het gewicht, leeftijd en geslacht der konijnen steeds gelijk nemen) als door passieve immunisatie tijdens de reactie verklaard kunnen worden. Terwijl volgens SABIN (1935) en SMITH (1930) de konijnenhuidreactie een geschikte, zij het een grove methode, is om van verschillende anti-vaccinia-sera de neutralisatietiter te bepalen, zouden volgens PARKER en RIVERS (1936) slechts van *die* sera de antilichaamgehalten vergeleken kunnen worden, waarvan de titraties op hetzelfde konijn worden uitgevoerd. GISPEN (1953) toont aan, dat indien wisselende hoeveelheden virus, elk gemengd met een constante serumhoeveelheid, geënt worden op de konijnenrug en in eieren, het serum \pm 100 maal groter neutraliserend vermogen heeft in het milieu van de konijnenhuid dan in dat van de bebroede eieren. Er was in de proeven voor gezorgd, dat de M.I.D. voor het konijn grofweg gelijk was aan de E.I.D. En dus concludeert GISPEN, dat de konijnenhuidreactie aanzienlijk minder gevoelig is dan de in ovo-neutralisatiereactie en niet een ware indicator voor de activiteit van de virusserum mengsels. De proefnemingen van GISPEN zouden ons inziens een

deugdelijk bezwaar tegen de quantitative waarde van de konijnen-huidreactie in vergelijking met de in ovo-neutralisatiereactie vormen, indien hij niet tevens vermeldde, dat het parallel titreren van verschillende porties van dezelfde virus-suspensie een 100-voudige variatie van titers levert.

Om de influenza-antilichamen in het serum te titreren werden de in ovo-neutralisatiereactie en de haemagglutinatieremmingsreactie beschreven. In beide reacties werden de hoeveelheden serum gewisseld, terwijl de hoeveelheid virus constant bleef. Zowel bij vaccinia- als bij influenza-immuunsera bleken de waarnemingen van SALAMAN en PARKER (zie blz. 52) respectievelijk BURNET, WALKER en HORSFALL (zie blz. 52) niet overeen te komen met onze eigen resultaten op blz. 10 en 26 beschreven. Bij vaccinia-immuunsera zowel als bij influenza-immuunsera konden wij namelijk afleiden, dat de titers van het serum evenredig veranderden naarmate men in de in ovo-neutralisatiereactie het aantal E.I.D.virus wijzigde. Echter ook in de haemagglutinatieremmingsreactie bij variola-vaccinia- evenals bij influenza-immuunsera worden de titers van het serum evenredig gewijzigd naarmate men in deze reacties het aantal A.E. van het homologe virus wisselt. Het bezwaar, dat eventueel zou kunnen rijzen tegen het gebruik van wisselende hoeveelheden serum en een constante virushoeveelheid in de haemagglutinatieremmingsreactie en vice versa in de in ovo-neutralisatiereactie bij een vergelijkend onderzoek naar vaccinia- of influenza-antilichamen (in onze proeven komt dit slechts bij vaccinia ter sprake), valt met de juist beschreven waarnemingen weg.

In hoofdstuk III werden twee antilichaam-titratiemethoden van Columbia SK-immuunsera met homologe virus beschreven, waarvan de muisbeschuttingsproef uitgevoerd werd met wisselende hoeveelheden virus en een constante serumhoeveelheid, de haemagglutinatieremmingsreactie daarentegen met wisselende hoeveelheden serum en een constante virushoeveelheid.

GARD en HELLER (1951) en JUNGEBLUT en HORVATH (1951) gebruikten deze haemagglutinatieremmingsreactie en deze neutralisatiereactie om bij een aantal anti-poliomyelitis-sera vergelijkend (niet quantitatief weliswaar) het Columbia SK-antilichaamgehalte na te gaan zonder acht te slaan op het wisselend virus-constant serum (of omgekeerd) -principe.

De neutralisatietiters (-indices) werden in de muisbeschuttings-

proeven volgens de methode van REED en MUENCH (1938) berekend, aangezien aan MORGAN (1947) en BELL (1948) bij verschillende paralleltitraties op muizen van Lansingvirus (poliomyelitisvirus type 2) en antiserum bleek, dat de titers met deze methode bepaald een bijzonder geringe variatie vertoonden. Bij muisbeschuttingsproeven met Lansingvirus en antiserum vonden REID, CLARK en RHODES (1952) echter een veel grotere variatie onder de titers, eveneens volgens de methode van REED en MUENCH berekend, dan MORGAN en BELL. Om deze zo gering mogelijk te doen zijn, raden zij aan die titraties, waarvan men de uitkomsten wil vergelijken, tegelijkertijd te verrichten. Zij geven op grond van vergelijkende proeven bovendien aan de methode van KÄRBER (1939), een rekenkundig wat eenvoudiger methode dan die van REED en MUENCH, de voorkeur om de titers van de muisbeschuttingsproeven te berekenen.

Daar de haemagglutinatieremmingsreactie dient als antilichaam-indicator ten opzichte van het haemagglutinerende antigeen en de neutralisatiereactie als antilichaam-indicator ten opzichte van het virulente virusdeeltje, ligt het voor de hand de antigene structuur van de drie behandelde virusgroepen in verband met het haemagglutinerend en infecterend vermogen te beschouwen.

Over de antigene structuur van het variola-vacciniavirus is veel bekend. Behalve de elementairlichaampjes van PASCHEN vallen er nog verscheidene andere antigenen te onderkennen, het nucleoproteïne-antigeen (NP), dat voor de immuniteit onbelangrijk wordt geacht (SMADDEL, RIVERS en HOAGLAND, 1942), het LS-antigeen-complex (CRAIGIE, 1934), dat door filtratie of centrifugatie van de virusdeeltjes kan worden gescheiden en het haemagglutinine (NAGLER, 1944; NORTH, 1944), dat tezamen met het LS-antigeen-complex door centrifugatie van het virusdeeltje wordt gescheiden (BURNET en STONE, 1946). Het haemagglutinine behoort volgens CHU (1948) niet tot het LS-complex.

Van het virusdeeltje wordt het LS-antigeen-complex, dat niet infectieus is, betrokken in de agglutinatie-, precipitatie- en de complementbindingsreactie en het haemagglutinine in de haemagglutinatie-remmingsreactie. Immunosera met het LS-antigeen-complex en het haemagglutinine vermengd, laten de neutraliserende antilichamen onveranderd. De pathogeniteit van het virus is immers gebonden aan de elementairlichaampjes (CRAIGIE, 1932). Dat er verscheidene anti-

lichamen aantoonbaar zijn, zoals CRAIGIE en WISHART (1936), SALAMAN (1937), LEVADITI en REINIÉ (1939), LEVADITI et al. (1940) en CHU (1948) meedeelden, hoeft geen verwondering te wekken, sedert zoveel verschillende antigenen, betrokken in verschillende antilichaam-titratiemethoden, bekend zijn. De genoemde onderzoekers vinden veelal geen correlatie tussen de hoeveelheden van deze verschillende soorten antilichamen.

Terwijl eveneens bij influenza menig onderzoeker verschillende soorten antilichamen noemt, welke in quantiteit niet met elkaar correleren, is bij suspensies van dit virus niet, zoals bij variola-vaccinia-virus-suspensies b.v. door centrifugatie een portie af te scheiden, welke het totale haemagglutinerend vermogen van de virus-suspensie bezit, terwijl het infecterend vermogen achterblijft. Wel onderscheidt men bij centrifugeren enige fracties (HOYLE en FAIRBROTHER, 1937), n.l. de 600 S-component en de 30 S-component. Later voegden HENLE en WIENER (1944) hier nog de < 30 S-component aan toe. De 600 S-component bevat, behalve het ziekmakend, eveneens het haemagglutinerend vermogen. Ook heeft het nog een specifiek complementbindend antigeen (WIENER, HENLE en HENLE, 1946). De 30 S-component, ook wel het oplosbare antigeen genoemd, is niet infectieus. Alle drie componenten gezamenlijk worden in de, vòòr 1946 reeds bekende, complementbindingsreactie betrokken.

In 1948 toonde HOYLE die de vermenigvuldiging in het bevruchte kippenei bestudeerde aan, dat de virusdeeltjes de chorio-allantoïis binnengaan, daar desintegreren in oplosbare antigenen, die zich ter plaatse vermenigvuldigen en na enkele uren complementbindend evenals haemagglutinerend vermogen bezitten, nog vòòrdat zij infectieus zijn (HENLE, 1949). Deze oplosbare antigenen integreren vervolgens tot de infectieuze virusdeeltjes, waarbij oplosbare, complementbindende en haemagglutinerende antigenen door een lipoïd laagje omhuld zijn. Hierdoor wordt aangetoond, dat bij volwassen influenzavirus het haemagglutinerend vermogen niet te scheiden is van het infecterend vermogen. Slechts in voorstadia van virusdeeltjes (GARD en VON MAGNUS, 1946) werd door HOYLE (1950) aangetoond, dat hoeveelheden haemagglutinenen en aantallen E.I.D. niet steeds parallel gaan; in de virusdeeltjes en virus-suspensies was dit wel het geval.

Volgens de antigene structuur van het virusdeeltje, ligt het bij influenza minder dan bij variola of vaccinia voor de hand, dat de

antilichaamtiters met de haemagglutinatieremmingsreactie en met de neutralisatiereactie verkregen, niet correleren.

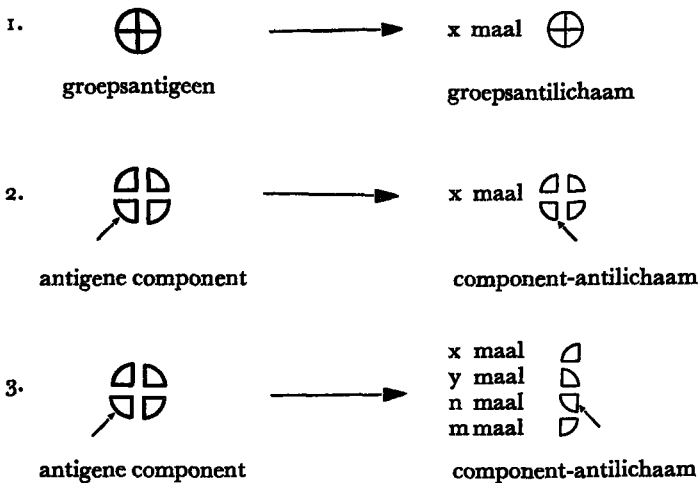
Over de antigene structuur van het Columbia SK-virus is bekend, dat het tot een groep van virussen met een homogene, van de poliomyelitisgroep afwijkende, antigene structuur behoort.

Men kan zich voorstellen, dat het virusdeeltje, bestaande uit verschillende antigenen, op drie verschillende wijzen antilichamen doet ontstaan:

1. Virusdeeltjes kunnen als groepsantigenen een kleiner aantal, een gelijk aantal of een groter aantal groepsantilichamen opwekken.
2. De antigene componenten van een virusdeeltje kunnen ieder een „component-antilichaam” doen ontstaan, waarbij de verhouding tussen de aantallen van antigene componenten en hun respectieve component-antilichamen evenzeer wisselend kan zijn als bij 1, echter met de kans, dat er van de verschillende component-antilichamen een even groot aantal wordt gevormd, of
3. dat deze aantallen onderling verschillen.

Fig. 17 brengt deze drie wijzen, waarop virusdeeltjes antilichamen kunnen doen ontstaan, in beeld.

Indien de antilichaamproductie verloopt volgens 2, is het onwaarschijnlijk, dat twee of meer titratiemethoden welke twee of meer ver-



FIGUUR 17

schillende antilichamen meten, van elkaar afwijkende uitkomsten zouden geven. Immers evenals verschillende eenheden virus (A.E. en E.I.D.) bij het titreren van één soort antilichamen gebruikt verschillende uitkomsten geven, terwijl in verhouding tot deze eenheden virus de uitkomsten relatief overeenkomen, evenzo moet men zich voorstellen, dat component-antilichamen relatief dezelfde uitkomsten geven met twee of meer titratiemethoden, wanneer de virusdeeltjes, oorspronkelijk aanwezige zowel als nakomeling-schap, steeds op dezelfde wijze uit hun verschillende componenten zijn opgebouwd.

Slechts indien twee of meer organismen een verschillende antilichaamproductie zouden hebben (zie fig. 17 ten 3e) voor de verschillende antigene componenten, of indien een organisme een wisselende antilichaamproductie voor antigene componenten heeft, is het mogelijk tussen de hoeveelheid haemagglutinatieremmende en neutraliserende antilichamen geen lineaire correlatie te vinden. BURNET en FENNER (1949) noemen met nadruk het verschijnsel, dat de antilichamen in porties sera op enkele tijdstippen tijdens het immunisatieproces afgenomen, kwalitatief verschillen.

Een wisselende antilichaamproductie in een organisme kan echter behalve aan de antilichaamvormers, welke evenals de kwaliteit van de antilichamen ook de quantiteit kunnen doen wisselen, nog zijn oorzaak vinden in het antigeen, d.w.z. er kunnen van het virus tijdens de vermenigvuldiging in het organisme varianten (misschien zelfs mutanten) ontstaan, waardoor de kwaliteit der antilichamen wijzigingen ondergaat. De haemagglutinerende eigenschap b.v. van het virus kan verzwakt of zelfs verloren gegaan zijn bij een variant en het gevolg zal zijn een discorrelatie tussen de hoeveelheid neutraliserende en haemagglutinatieremmende antilichamen in het immuunserum.

Indien de component-antilichamen op verschillende tijdstippen ontstaan, hun maximum aantal bereiken en verdwijnen, zoals op blz. 40 reeds werd verondersteld, kan men eveneens een discorrelatie tussen de uitkomsten, met verschillende titratiemethoden verkregen, bij het titreren van deze component-antilichamen verwachten.

V

SAMENVATTING EN CONCLUSIES

Van een aantal serum-monsters van patiënten lijdende aan of van dieren geïmmuniseerd tegen variola, vaccinia, influenza, poliomyelitis of de Columbia SK-infectie werden de haemagglutinatieremmings-titers en de neutralisatietiters bepaald. De laatsten op verschillende wijzen: neutralisatiereacties in ovo werden verricht met variola-, vaccinia- en influenzavirus; neutralisatiereacties op muizen (muisbeschuttingsproeven) met Columbia SK-virus. Bovendien werden nog konijnenhuidreacties (methode van GROTH) met vacciniavirus verricht.

In de variola-, vaccinia-, influenza- en Columbia SK-haemagglutinatieremmingsreacties werd van een constante hoeveelheid virus en wisselende hoeveelheden serum gebruik gemaakt, evenals in de variola-, vaccinia- en influenza-neutralisatiereacties, uitgezonderd de konijnenhuidreacties. De laatsten werden evenals de muisbeschuttingsproeven met constante serum- en wisselende virushoeveelheid verricht.

De lineaire correlatie tussen de vaccinia-HAR-titers en de vaccinia-neutralisatietiters, de laatsten met behulp van twee verschillende titratiemethoden verkregen, van een aantal variola-vaccinia-sera, maakt aannemelijk dat de haemagglutinatieremmende en neutraliserende antilichamen in vaccinia-immunsera *of* identiek zijn *of* in gelijke mate en op hetzelfde tijdstip gevormd worden. Uit verzaadigingsproeven van anti-vaccinia-serum met verschillende verdunningen van een suspensie van vaccinia-elementairlichaampjes valt echter af te leiden, dat haemagglutinatieremmende en neutraliserende antilichamen tegen vacciniavirus niet identiek zijn, aangezien de neutralisatietiter van het partiëel verzaadigde serum aanzienlijk was gedaald in vergelijking met de oorspronkelijke titer van het serum, terwijl de HAR-titer ongewijzigd bleek te zijn. Voor variolavirus viel dit bij dezelfde sera niet af te leiden, aangezien de verrichte variola-neutralisatiereacties in ovo niet geheel betrouwbaar geacht mochten worden.

Wel valt een lineaire correlatie aan te tonen tussen variola-HAR-titers en vaccinia-HAR-titers van deze sera, hetgeen de overeenkomst tussen het variola-haemagglutinine en het vaccinia-haemagglutinine, zoals op dezelfde wijze reeds eerder werd geconstateerd, bewijst. HAR-titers met vacciniavirus bepaald, zijn echter steeds hoger dan die met variolavirus bepaald. Daar bekend is (COLLIER en MEIJER, 1950), dat vacciniavirus een krachtiger antigeen is dan variolavirus, hoeft dit geen verwondering te wekken.

Alhoewel bij de anti-influenza-sera in het algemeen tussen de HAR-titers en de neutralisatietiters, voor een speciale stam bepaald, eveneens een lineaire correlatie werd gevonden, gedroegen de immuunsera gericht tegen de A-prime-stam zich afwijkend. Merkwaardig was, dat deze 10 sera in twee groepen van elk 5 sera gescheiden konden worden, die ieder onderling een lineaire correlatie vertoonden tussen de HAR-titers en de neutralisatietiters, wanneer men de respectieve titratie-reacties met FM₁-virus uitvoerde. Dat er enige aanleiding bleek te zijn de ene groep anti-A-prime-sera als gericht tegen het ene subtype (Scandinavisch type) en de andere groep tegen het andere subtype (Liverpool-type) van het virus verantwoordelijk voor de influenza-epidemie in 1950—'51 te beschouwen, is van geen belang aangezien de sera op FM₁-antilichamen (en niet op Liverpool-virus-antilichamen) werden getitreerd. Het tevoren beschreven verschijnsel bij de anti-influenza A-prime-sera kan op een andere binding van het serum met het virus-haemagglutinine dan die van het serum met het infectieuze deel van het virus wijzen, dat wil zeggen de hypothese, dat twee soorten antilichamen zouden bestaan, moet worden overwogen. Het verschil tussen het gedrag van de beide groepen A-prime-immuunsera kon niet worden verklaard uit het verschil in het aantal dagen tussen de besmetting en het afnemen der sera, noch uit het verschil in species van mens en fret, waarvan de sera afkomstig waren.

Hoewel bij de sera, die op antilichamen tegen Columbia SK-virus werden onderzocht een hoge HAR-titer met een hoge neutralisatietiter en een lage of geen HAR-titer met een lage of geen neutralisatietiter gepaard ging, kan men toch geen lineaire correlatie tussen beide titers waarnemen. Want van een Cynomolgus-aap, die 4 intramusculaire injecties met Columbia SK-virus had gekregen, werd na de eerste en nadat alle injecties gegeven waren serum afgenomen; toen daarop de

HAR-titers en de neutralisatietiters van beide porties serum werden bepaald, bleek de HAR-titer van het laatst afgenomen serum niet overeenkomstig de neutralisatietiter te zijn gestegen. Mede uit het feit, dat de HAR-titer en de neutralisatietiter niet overeenkomstig daalden na partiële verzaadiging van een antiserum met virus, moet besloten worden dat de correlatie tussen de aantallen haemagglutinatieremmende en neutraliserende antilichamen niet lineair is. Uit de resultaten van de titraties bleek niet, dat er enige grond bestaat aan te nemen, dat de species van de sera welke afkomstig waren van mens, aap, schaap en konijn, in verband gebracht kan worden met het gedrag der beide soorten antilichamen, evenmin als het feit of hyperimmuun- dan wel reconvalescentenserum onderzocht werd.

Samenvattend kan men zeggen, dat bij vacciniavirus (en vermoedelijk ook bij variolavirus) de haemagglutinatieremmende en neutraliserende antilichamen niet identiek zijn, terwijl een lineaire correlatie tussen beide titers er op duidt, dat de antilichamen in evenredige mate gevormd worden. De enkele duidelijke afwijking in de reeks uitkomsten bij de verschillende antilichaam-titraties kan niet verklaard worden door technische onnauwkeurigheden of door de verschillende hoeveelheden virus, waarmee in de titratie-reacties werd getitreerd.

Bij verschillende stammen van het influenzavirus zouden de haemagglutinatieremmende en neutraliserende antilichamen op grond van de respectieve antilichaamtitraties identiek genoemd mogen worden of in gelijke mate en op hetzelfde tijdstip gevormd, indien niet een vijftal A-prime-antiserum alle op dezelfde wijze afwijkende uitkomsten vertoonden. Verklaringen voor deze afwijkende uitkomsten kunnen zijn:

- 1e. Het milieu, waarin de antilichamen zich bevinden, verschilt bij verschillende individuen van dezelfde of van verschillende species: b.v. doordat de ionen, die de haemagglutinatie van het virus bevorderen respectievelijk remmen (zie blz. 31) verschillen, of doordat wisselende hoeveelheden heterologe agglutinen aanwezig zijn.
- 2e. Ten gevolge van een evolutie van het virus tijdens de vermenigvuldiging in het organisme worden kwalitatief verschillende antilichamen door varianten van het virus en door het oorspronkelijke virus zelf opgewekt.

- 3e. Een quantitatief ongelijke vorming van „component-antilichamen” voor de afzonderlijke antigene componenten treedt op in verschillende individuen of in hetzelfde individu bij twee opeenvolgende besmettingen.
- 4e. „Component-antilichamen” ontstaan op verschillende tijdstippen, bereiken tegelijkertijd hun maximum hoeveelheid en verdwijnen vervolgens weer (zie blz. 40).

De eerste verklaring is onwaarschijnlijk (zie blz. 31 en blz. 40); de tweede verklaring door dezelfde wijze, waarop enige A-prime-antisera van de overige A-prime-antisera afweken, eveneens. Ook voor de laatste verklaring kon geen grond gevonden worden.

Bij influenza moet dus evenals bij variola-vaccinia het bestaan van twee soorten antilichamen, haemagglutineremmende en neutraliserende, worden overwogen, terwijl hier de antigene componenten welke haemagglutinerend en neutraliserend vermogen bevatten, in vitro niet te scheiden zijn.

Bij Columbia SK-infecties kunnen volgens de proefnemingen de haemagglutineremmende en neutraliserende antilichamen niet identiek zijn, tenzij hier wisselende aantallen ionen of heterologe agglutininen in de verschillende sera bij het titreren een sterker invloed hebben dan bij vaccinia- of influenzavirus. GARD en HELLER (1951) noemden de Columbia SK-HAR-reactie uitermate gevoelig voor de samenstelling van het gebruikte medium, terwijl zij aan de species van de sera ook een invloed toeschreven. De inhibitor van het Columbia SK-haemagglutinine zou geen specifiek antilichaam zijn, maar een substantie welke in de circulatie optreedt bij afwijkingen aan het centrale zenuwstelsel. Het Columbia SK-haemagglutinine, dat volgens BREMER (1951) een speciale ontstekingsfactor van het centrale zenuwstelsel zou zijn [volgens HALLAUER (1951) identiek met het infectieuze agens], werd tot nu toe dan ook slechts in zenuwweefsel gevonden, terwijl in het amnion- of allantoïsvocht van het bebroede kippenei, dat een voldoende concentratie virus bevatte, geen haemagglutinine aantoonbaar bleek te zijn (VERLINDE, WALLER-FETTER en DE BAAN, 1951). Bij variola-vaccinia is haemagglutinine aanwezig waar virusdeeltjes aantoonbaar zijn (huid, lymfhe, eivliezen), bij influenza eveneens (long, trachea, keelspoelsel, eivocht), doch het Columbia SK-haemagglutinine is niet alléén aan het virusdeeltje gebonden. Dat er twee soorten „component-antilichamen” zouden bestaan, welke op verschillende tijdstippen komen en gaan, kon door HOFMAN en

JUNGBLUT (1952) niet worden aangetoond. Het feit, dat bij voortzetting van de immunisatie de antilichaamproductie quantitatief verschillend bleek te zijn van de antilichaamproductie na de eerste besmetting, zou op ongelijke antilichaamvorming voor verschillende antigene componenten kunnen wijzen.

Het gebrek aan correlatie tussen de mate van remming der haemagglutinatatie en het vermogen groei van het virus tegen te gaan, wijst duidelijk op de complexe verhouding van virus en cel.

Ten slotte kan uit de verrichte titraties en proefnemingen afgeleid worden, dat de haemagglutinatieremmende en neutraliserende antilichamen bij variola-vaccinia, influenza en Columbia SK-infecties niet identiek zijn en dat de haemagglutinatieremmings- en neutralisatietiters van de respectieve homologe antisera een voldoende lineaire correlatie vertonen, dat men in de practijk aan de haemagglutinatieremmingstiter relatief een even grote waarde mag toekennen als aan de neutralisatietiter.

SUMMARY

Haemagglutination-inhibition titres and neutralization titres were determined of a number of sera of patients suffering from or of animals immunized against variola, vaccinia, influenza, poliomyelitis or the Columbia SK infection. The neutralization tests were carried out in fertile hen's eggs with variola, vaccinia and influenza virus; in mice (mouse-protection tests) with Columbia SK virus. In addition rabbit-skin tests by the GROTH method were carried out with vaccinia virus.

In the variola, vaccinia, influenza and Columbia SK haemagglutination-inhibition tests constant quantities of virus and varying quantities of serum were used as in the variola, vaccinia and influenza neutralization tests excepting the rabbit-skin tests. The latter were carried out as the mouse-protection tests with a constant amount of serum and a varying amount of virus.

The linear correlation between the vaccinia haemagglutination-inhibition titres and the vaccinia neutralization titres, the latter being obtained by two different titration methods, of a number of variola-vaccinia sera, renders acceptable that the haemagglutination-inhibiting and the neutralizing antibodies in vaccinia immune sera are either identical or produced in the same amounts and at the same time. But from absorption tests of a vaccinia immune serum with different dilutions of a vaccinia elementary body suspension can be inferred that vaccinia haemagglutination-inhibiting and neutralizing antibodies are not identical, since the neutralization titre of the partially absorbed serum compared with the original serum titre was obviously decreased whereas the haemagglutination-inhibition titre was unaltered. This could not be concluded for variola virus, because of unreliable variola neutralization tests.

A linear correlation between variola and vaccinia haemagglutination-inhibition titres of these sera could be shown, which proves the correspondance between the variola and vaccinia haemagglutinin as shown before. The vaccinia haemagglutination-inhibition titres are

always higher than the variola haemagglutination-inhibition titres. This is not surprising, since vaccinia virus is a stronger antigen (COLLIER and MEIJER, 1950) than variola virus.

Although as a rule a linear correlation between haemagglutination-inhibition and neutralization titres of influenza immune sera determined with a special strain of influenza virus was also found, the influenza A-prime immune sera behaved differently. A remarkable fact was that these 10 sera could be divided into two groups of 5 sera each and each group showing a linear correlation between haemagglutination-inhibition and neutralization titres when titrated for influenza FM₁ antibodies. Of no importance is that a reason appeared to be present to consider the one group of A-prime immune sera as caused by one subtype (Scandinavian type) and the other group of the sera as caused by the other subtype (Liverpool type) of the virus responsible for the influenza epidemic of 1950—'51, since both groups of sera were titrated for FM₁ antibodies.

The phenomenon of the influenza A-prime immune sera as described before could point to an union between serum and virus haemagglutinin different from the union between serum and the infecting part of the virus, which means that the hypothesis must be considered that two kinds of antibodies exist. The difference between the behaviour of the two groups A-prime immune sera cannot be explained by the time that elapsed from the infection to their several obtainment, neither by the difference in species of man and ferret.

Though in the sera titrated for Columbia SK antibodies a high haemagglutination-inhibition titre was attended with a high neutralization titre and a low or no haemagglutination-inhibition titre with a low or no neutralization titre, a linear correlation between the two titres could not be observed. This was illustrated by an experiment, in which serum was obtained from a *Cynomolgus* monkey having received 4 intramuscular injections of Columbia SK virus after the first and the fourth injection. When the two titres were determined from the last obtained serum the haemagglutination-inhibition titre did not appear to have increased in proportion to the neutralization titre. From a second experiment, in which the haemagglutination-inhibition and the neutralization titre did not decrease to the same extent after partial absorption of an antiserum with virus, it must also be concluded

that no linear correlation exists between the amounts of haemagglutination-inhibiting and neutralizing antibodies. There is no reason to consider from the titration results that the different species of the sera which were obtained from man, monkey, sheep and rabbit could be connected with the behaviour of the two kinds of antibodies, nor with the fact that hyperimmune and convalescent serum was examined.

Summarising, one can say that vaccinia (and probably variola) haemagglutination-inhibiting and neutralizing antibodies are not identical, while a linear correlation between both titres indicates that the antibodies are produced in proportionately the same amounts. A single deviation in the two different series of titres cannot be explained by technical inaccuracies or by the different amounts of virus with which titration was carried out in the two titration tests.

One could consider influenza haemagglutination-inhibiting and neutralizing antibodies identical or produced in the same amounts and at the same time if not 5 influenza A-prime immune sera did show deviating results. Explanations for these deviations might be:

1. A different milieu in which the antibodies are.
2. An evolution of the virus during the multiplication in the organism, which induces qualitative distinct antibodies.
3. A quantitative unequal „component antibody” production by distinct antigen components in different individuals or in the same individual during two successive infections.
4. A production of „component antibodies” at different moments.

The first explanation seems improbable (p. 31 and p. 40); also the second explanation, because of the same way, in which 5 influenza A-prime immune sera deviated from the other A-prime immune sera. An indication for the last explanation could not be found.

With influenza as with variola or vaccinia the existence of two kinds of antibodies, haemagglutination-inhibiting and neutralizing, must be considered, while with influenza the antigen components which contain haemagglutinating and neutralizing power, cannot be divided in vitro unlike the antigen components of variola and vaccinia virus. According to the experiments, the haemagglutination-inhibiting and neutralizing antibodies with Columbia SK infections cannot be identical, unless varying amounts of ions or heterologous agglutinins in the sera have a stronger influence on the results of titration tests with Columbia SK virus than they have in influenza or vaccinia

titration tests. GARD and HELLER (1951) called the Columbia SK haemagglutination-inhibition tests highly sensible to the composition of the medium used and attributed importance to the species of the sera. The inhibitor of the Columbia SK haemagglutinin would not be a specific antibody, but a substance which appears in the circulation in the case of lesions of the central nervous system. The Columbia SK haemagglutinin, which according to BREMER (1951) is a factor of inflammatory processes in the central nervous system, but according to HALLAUER (1951) identical with the infecting agent, was found until now only in nervous tissue, while in amniotic or allantoic fluid of the chick embryo, which contained a sufficient concentration of virus, no haemagglutinin could be shown (VERLINDE, WALLER-FETTER and DE BAAN, 1951). With variola or vaccinia haemagglutinin is present where virus particles are demonstrable (skin, lymph and egg membranes), also with influenza (lung, trachea, throat washing and egg fluid), but the Columbia SK haemagglutinin does not attach itself to the virus particle alone. The existence of two kinds of „component antibodies” which arise and disappear at different times, could not be shown by HOFMAN and JUNGBLUT (1952). The fact that after prolonged immunization the production of antibodies appeared to be quantitatively unequal to the production of antibodies after the first infection, would indicate an unequal production of antibodies for distinct antigen components.

The lack of correlation between the degree of inhibition of the haemagglutination and the power to inhibit the multiplication of the virus, shows clearly the complex relation between virus and cells.

From the titration tests and experiments carried out can be deduced that with variola, vaccinia, influenza or Columbia SK infections the haemagglutination-inhibiting and neutralizing antibodies are not identical, and that the haemagglutination-inhibition and neutralization titres of the respective homologous antisera show a sufficiently linear correlation to entitle one to credit, for practical purposes, the haemagglutination-inhibition titre relatively equal to the neutralization titre.

LITERATUUR

- ANDREWES, C. H.: *J. Path. Bact.*, 32, 265, 1929.
 DE BAAN, P.: *Verhand. Inst. Praev. Geneesk. XVII*, 1950.
 DE BAAN, P., VERLINDE, J. D. en WALLER-FETTER, P.: *Ant. van Leeuwenhoek*, 17, 119, 1950.
 BELL, E. J.: *Am. J. Hyg.*, 48, 381, 1948.
 BLATTNER, R. J., HEYS, F. M. en GOLLUP, S. W.: *J. Imm.*, 46, 207, 1943.
 BREMER, A.: *C. R. Soc. Biol., Paris*, 144, 1436, 1950.
 BREMER, A.: *Ann. Inst. Pasteur*, 80, 40, 1951.
 BURNET, F. M.: *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sc.*, 21, 231, 1943.
 BURNET, F. M.: *Virus as Organism*, Harv. Univ. Press, 1946, blz. 116.
 BURNET, F. M. en BEVERIDGE, W. I. B.: *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sc.*, 21, 71, 1943.
 BURNET, F. M. en FENNER, E.: *The production of antibodies*, Macmillan and Comp. Ltd., London, 1949.
 BURNET, F. M. en LUSH, O.: *J. Path. Bact.*, 48, 275, 1939.
 BURNET, F. M. en STONE, J. D.: *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sc.*, 24, 1, 1946.
 BURNET, F. M. en STONE, J. D.: *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sc.*, 25, 227, 1947.
 CHU, C. M.: *J. Hyg. Camb.*, 46, 42 en 49, 1948.
 CLARK, E. en NAGLER, F. P. O.: *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sc.*, 21, 103, 1943.
 COLLIER, W. A.: *Doc. Neerl. Ind. Morb. Trop.*, 1, 81, 1949.
 COLLIER, W. A.: *Doc. Neerl. Ind. Morb. Trop.*, 3, 163, 1951.
 COLLIER, W. A. en MEIJER, F. H.: *Ant. van Leeuwenhoek*, 16, 331, 1950.
 COLLIER, W. A. en VAN THIEL, W. J.: *Med. Milit. Tijdschr.*, 2, 97, 1949.
 CRAIGIE, J.: *Brit. J. Exp. Path.*, 13, 259, 1932.
 CRAIGIE, J.: *J. Bact.*, 27, 77, 1934.
 CRAIGIE, J. en WISHART, F. O.: *J. Exp. Med.*, 64, 803 en 809, 1936.
 DOWNIE, A. W.: *Lancet*, 1, 419, 1951.
 DOWNIE, A. W. en DUMBELL, K. R.: *J. Path. Bact.*, 59, 189, 1947.
 FRANCIS, TH.: *J. Exp. Med.*, 85, 1, 1947.
 FRIEDEWALD, W. F.: *J. Exp. Med.*, 79, 633, 1944.
 GARD, S. en HELLER, L.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 76, 68, 1951.
 GARD, S. en VON MAGNUS, P.: *Ark. Kemi, Min. Geol.* 24 B, no. 8, 1, 1946.
 GINSBERG, H. S. en HORSFALL, F. L.: *J. Exp. Med.*, 90, 475, 1949.
 GISPEN, R.: *Ant. van Leeuwenhoek*, 19, 149, 1953.
 HAAGEN, H. en CRODEL, B.: *Zbl. Bakt. Abt. I*, 145, 249, 1939—'40.
 HALLAUER, C.: *Arch. Ges. Virusforsch.*, 4, 224, 1951.
 HENLE, W.: *J. Exp. Med.*, 90, 1 en 13, 1949.
 HENLE, W. en WIENER, M.: *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)*, 57, 176, 1944.
 HIRST, G. K.: *J. Exp. Med.*, 75, 49, 1942.
 HOFMAN, B. en JUNGEBLUT, C. W.: *Klin. Wochenschr.*, 43/44, 1013, 1952.
 HORSFALL Jr., F. L.: *J. Exp. Med.*, 70, 209, 1939.
 HORVATH, B. en JUNGEBLUT, C. W.: *J. Imm.*, 68, 627, 1952.
 HOYLE, L.: *Brit. J. Exp. Path.*, 30, 123, 1948.

- HOYLE, L.: *J. Hyg.*, 48, 277, 1950.
- HOYLE, L. en FAIRBROTHER, R. W.: *J. Hyg.*, 37, 512, 1937.
- IRWIN, J. O. en CHEESEMAN, E. A.: *J. Hyg.*, 39, 574, 1939.
- ISAACS, A., GLEDHILL, A. W. en ANDREWES, C. H.: *Bull. World Hlth Org.*, 6, 287, 1952.
- JUNGEBLUT, C. W.: *Arch. Pediat.*, 67, 519, 1950.
- JUNGEBLUT, C. W. en HORVATH, B.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 77, 672 1951.
- KELLER, W. en VIVELL, O.: *Klin. Wochenschr.*, 43/44, 1015, 1952.
- KEOGH, E. V.: *J. Path. Bact.*, 43, 441, 1936.
- LÉPINE, P., WIELGOSZ, G. en REINIÉ, L.: *Ann. Inst. Pasteur*, 81, 77, 1951.
- LEVADITI, C. en REINIÉ, L.: *C. R. Soc. Biol., Paris*, 131, 916, 1939.
- LEVADITI, C. et al.: *Ann. Inst. Pasteur*, 64, 466, 1940.
- MAGRASSI, F. en MURATORI, F.: *Bolletins de Istorio, Sieroterap., Milanese*, 16, 588, 1937.
- MCCARTHY, K. en DOWNIE, A. W.: *Lancet*, 1, 257, 1953.
- MORGAN, I. M.: *Am. J. Hyg.*, 45, 372, 1947.
- MULDER, J. en GOSLINGS, W. R. O.: *N. T. Geneesk.*, 91, 3058, 1947.
- MULDER, J., DE NOOYER, I. en BRANS, L. M.: *Ant. van Leeuwenhoek*, 18, 128, 1952.
- NAGLER, F. P. O.: *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sc.*, 22, 29, 1944.
- NORTH, E. A.: *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sc.*, 22, 105, 1944.
- PARKER, R. F.: *J. Imm.*, 36, 147, 1939.
- PARKER, R. F. en RIVERS, TH. M.: *J. Exp. Med.*, 63, 69, 1936.
- REED, L. J. en MUENCH, H.: *Am. J. Hyg.*, 27, 493, 1938.
- REID, D. B. W., CLARK, E. M. en RHODES, A. J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 81, 118, 1952.
- ROKOHL, U. en ZSCHUCKE, J. ITZEHEL: *Zentralbl. Bakt. Paras. Inf. Krankh. Hyg.*, 154, 87, 1949.
- RIVERS, TH. M.: *Viral and Rickettsial infections of man*, 1948.
- SABIN, A. B.: *Brit. J. Exp. Path.*, 16, 70, 1935.
- SALAMAN, M. H.: *Brit. J. Exp. Path.*, 18, 245, 1937.
- SHAFFER, M. F. en ENDERS, J. F.: *J. Imm.*, 37, 383, 1939.
- SMADDEL, J. E., RIVERS, TH. M. en HOAGLAND, C. L.: *Arch. Path.*, 34, 275, 1942.
- SMITH, W.: *J. Path. Bact.*, 33, 273, 1930.
- STERNBERG, G. M.: *Trans. Assn. Am. Phys.*, 7, 68, 1892.
- STONE, J. D.: *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sc.*, 24, 191, 1946.
- STONE, J. D. en BURNET, F. M.: *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sc.*, 24, 9, 1946.
- STUART-HARRIS, C. H. en MILLER, M. H.: *Brit. J. Exp. Path.*, 28, 394, 1947.
- VAN DER VEEN, J. en MULDER, J.: *Onderz. Inst. Praev. Geneesk. VI*, 1950.
- VERLINDE, J. D., WALLER-FETTER, P. en DE BAAN, P.: *Ant. van Leeuwenhoek*, 17, 183, 1951.
- VIVELL, O., SCHMITT, E. en GERSTNER, A.: *Zeitschr. Imm. Forsch. Exp. Ther.*, 109, 274, 1950.
- WALKER, D. L. en HORSFALL Jr., F. L.: *J. Exp. Med.*, 91, 65, 1950.
- WIENER, M., HENLE, W. en HENLE, G.: *J. Exp. Med.*, 83, 259, 1946.