

# *Verhandelingen*

**De betekenis van de indirecte Haemagglutinatiereactie voor de diagnostiek van Toxoplasmosis**

*Dr. G. L. Smit*

Nederlands  
Instituut  
voor  
Praeventieve  
Geneeskunde



**DE BETEKENIS VAN DE INDIRECTE  
HAEMAGGLUTINATIETEST VOOR DE  
DIAGNOSTIEK VAN TOXOPLASMOSIS**

**DRUK: N.V. DRUKKERIJ V/H BATTLEJEE & TERPSTRA — LEIDEN**

**Uit het Laboratorium voor Microbiologie van het Nederlands Instituut voor  
Praeventieve Geneeskunde en van de Rijksuniversiteit te Leiden.**

LE

Verh.  
54

(2)

VERHANDELING VAN HET  
NEDERLANDS INSTITUUT VOOR PRAEVENTIEVE GENEESKUNDE  
LIV

DE BETEKENIS VAN DE INDIRECTE  
HAEMAGGLUTINATIETREACTIE VOOR DE  
DIAGNOSTIEK VAN TOXOPLASMOSIS

DOOR

Dr. G. L. SMIT

1962

54/61/63

NEDERLANDS INSTITUUT  
VOOR PRAEVENTIEVE GENEESKUNDE  
WASSENARSEWEG 56 - LEIDEN

## INHOUD

Hoofdstuk I	: INLEIDING . . . . .	1
Hoofdstuk II	: LITERATUUROVERZICHT . . . . .	3
Hoofdstuk III	: TECHNIEK VAN DE VERSCHILLENDE REACTIES . . . . .	6
	A. Haemagglutinatiereactie . . . . .	6
	B. Sabin-Feldmanreactie . . . . .	12
	C. Complementbindingsreactie . . . . .	14
Hoofdstuk IV	: VERGELIJKING VAN DE HAEMAGGLUTI- NATIETREACTIE EN DE SABIN-FELDMAN- REACTIE BIJ SERA VAN MENSEN EN HONDEN . . . . .	17
Hoofdstuk V	: HET VERLOOP VAN DE S.F.R., DE H.A.R. EN DE C.B.R. BIJ PATIËNTEN . . . . .	25
Hoofdstuk VI	: DE S.F.R., H.A.R. EN C.B.R. BIJ EXPERI- MENTEEL GEÏNFECTEERDE KONIJNEN . . . . .	40
Hoofdstuk VII	: EXPERIMENTEEL ONDERZOEK . . . . .	48
Hoofdstuk VIII	: BESPREKING VAN DE RESULTATEN . . . . .	54
Samenvatting	. . . . .	60
Summary	. . . . .	62
Literatuur	. . . . .	64

## HOOFDSTUK I.

### INLEIDING

Bij de serologische diagnostiek van toxoplasmosis nemen de kleurproef van Sabin en Feldman (1948) en de complementbindingsreactie (Warren en Sabin, 1942; Warren en Russ, 1948) nog steeds de belangrijkste plaats in.

Nu echter de laatste jaren de belangstelling van de kliniek voor toxoplasmosis toeneemt, hetgeen tot uiting komt in een groeiend aantal aanvragen voor serologisch onderzoek, doet de behoefte aan een eenvoudige reactie zich steeds sterker gevoelen.

De Sabin-Feldmanreactie is als routinereactie vrij moeilijk hanteerbaar. Bovendien blijkt het in de praktijk niet altijd mogelijk over voldoende activatorserum te beschikken.

In 1957 beschreven Jacobs en Lunde een indirecte haemagglutinatiereactie waarvan de uitkomsten zeer goed overeen zouden stemmen met die van de Sabin-Feldmanreactie. Het aantal door deze auteurs onderzochte serummonsters was echter te klein om een conclusie betreffende de waarde van deze reactie toe te laten.

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek had tot doel na te gaan welke betekenis deze haemagglutinatietechniek kan hebben voor de serologische diagnostiek van toxoplasmosis. Om de reproduceerbaarheid van de reactie zo groot mogelijk te maken was het noodzakelijk verschillende wijzigingen in de door Jacobs en Lunde gebruikte techniek aan te brengen.

Van alle serummonsters die in de jaren 1959 en 1960 in ons laboratorium binnenkwamen voor onderzoek op toxoplasmosis werd een haemagglutinatiereactie verricht. De resultaten hiervan werden vergeleken met de uitkomsten van de Sabin-Feldmanproef en de complementbindingsreactie, zoals die in ons laboratorium als routine worden uitgevoerd.

Een aantal patiënten, bij wie de diagnose toxoplasmosis werd bevestigd door isolatie van de parasiet, kon gedurende enige tijd door ons worden gevolgd, waardoor het mogelijk werd een indruk te krijgen van het titerverloop van de verschillende reacties.

Om het gedrag van deze reacties in het allereerste begin van de infectie te kunnen nagaan werden enige konijnen geïnfecteerd met *Toxoplasma Gondii*. Regelmatig werd van deze dieren een serummonster afgenomen en onderzocht met behulp van de Sabin-Feldman-, complementbindings- en haemagglutinatiereactie.

Een aantal sera van normale gezonde personen (donores van een bloedtransfusiedienst en personeel van slachthuizen) en een aantal hondensera werden eveneens met bovengenoemde reacties onderzocht.

Aan de hand van de aldus verkregen gegevens is getracht tot een oordeel omtrent de waarde van de haemagglutinatiereactie te komen.

## HOOFDSTUK II.

### LITERATUUROVERZICHT

In 1947 toonden Keogh, North en Warburton aan dat erythrocyten die gesensibiliseerd waren met extracten van *Haemophilus influenzae* werden geagglutineerd door homologe antisera. Dit type reactie wordt aangeduid als indirect of passief, in tegenstelling tot de directe haemagglutinatieproef, waarbij de erythrocyten worden geagglutineerd door het antigeen.

Deze methode voor het aantonen van antistoffen heeft steeds meer toepassingen gevonden en van een groot aantal bacteriesoorten zijn antigenen bereid waarmee rode bloedlichaampjes van verschillende diersoorten kunnen worden gesensibiliseerd. Deze antigenen blijken hoofdzakelijk te bestaan uit complexe polysacchariden.

In 1956 publiceerde Neter onder de titel „Bacterial hemagglutination and hemolysis” een uitvoerig overzicht van de belangrijkste feiten die tot op dat moment bekend waren over de verschillende soorten haemagglutinatiereacties. Het artikel wordt besloten met een zeer uitgebreide literatuurlijst.

Door het antiserum vóór de toevoeging van de gesensibiliseerde erythrocyten te mengen met antigeen wordt de reactie specifiek geremd. Deze indirecte haemagglutineringsreactie is bijzonder gevoelig en maakt het mogelijk minimale hoeveelheden antigeen op te sporen. Warburton, Keogh en Williams (1949) gebruikten deze methode om in de liquor cerebrospinalis van patiënten met een *Haemophilus meningitis* antigeen van deze bacterie aan te tonen. Een belangrijke beperking van de techniek van Keogh en medewerkers was echter het feit dat alleen polysacchariden door de erythrocyten werden geadsorbeerd.

In 1951 ontdekte Boyden dat het mogelijk was ook proteïnen aan erythrocyten te hechten door deze cellen eerst met een sterk verdunde tannineoplossing te behandelen. Ook hierbij kan de reactie worden geremd door eerst vrij antigeen aan het antiserum toe te voegen.

Door de invoering van deze tanninemethode is het toepassingsgebied van de indirecte haemagglutinatie sterk uitgebreid en het is thans mogelijk op deze wijze bij tal van bacteriële, virale en parasitaire infecties antistoffen aan te tonen.

Doordat de reactie bijzonder gevoelig is en doordat de erythrocyten, zowel met als zonder tannine, in staat zijn zich tegelijkertijd met meer dan één antigeen te verbinden, is grote voorzichtigheid geboden bij de interpretatie van de uitkomsten, vooral wanneer de gebruikte antigenen niet



geheel gezuiverd zijn. Borduas en Grabar (1953) en Stavitsky (1954) hebben de factoren die van invloed zijn op de specificiteit en de gevoeligheid van dit soort reacties uitvoerig bestudeerd.

De tanninetechniek is door verschillende onderzoekers gebruikt voor het aantonen van diphtherie- en tetanus-antitoxinen: Fisher (1952), Stavitsky (1954), Landy, Trapani, Formal en Klugler (1955), Schubert (1958). Ook over de serologische diagnostiek van pest met behulp van deze reactie verschenen enkele publicaties: Silverman (1954), Chen en Meyer (1954), Landy en Trapani (1959). In ons land werd door Beeuwkes, Bijlsma en Mendes de Leon (1957) een haemagglutinatiereactie voor de vroege diagnose van reumatoïde artritis ontwikkeld.

Ook bij enkele virusinfecties bleek het mogelijk met de methode van Boyden antistoffen in patiëntenserum aan te tonen: Benedict en O'Brien (1958): psittacosis; Scott en Felton (1957, 1958, 1961): herpes simplex.

Kagan (1955) bestudeerde de bruikbaarheid van deze techniek bij schistosoma-infecties, terwijl Garabedian, Matossian en Djanian (1957) en Kagan, Norman, Allain en Goodchild (1960) de waarde van de haemagglutinatiereactie voor de serologische diagnostiek van echinococcosis hebben onderzocht.

In 1957, 1958 en 1959 verschenen enige artikelen van Jacobs en Lunde over een indirecte haemagglutinatiereactie voor de diagnostiek van toxoplasmosis. Op deze publicaties zal in de volgende hoofdstukken nog nader worden ingegaan. De door hen beschreven techniek werd ook door andere onderzoekers toegepast: Angelillo en Mandras (1959), Reuss (1961).

De geringe stabiliteit en houdbaarheid van het erythrocyt-antigeen-complex maken dit soort haemagglutinatiereacties echter minder geschikt voor de routinediagnostiek. Men heeft daarom gezocht naar middelen om de stabiliteit van de gesensibiliseerde erythrocyten te vergroten.

Flick (1948) conserveerde rode bloedcellen met formaline en gebruikte deze voor haemagglutinatieprouven met influenzavirus. Cole en Farrell (1955) gebruikten dezelfde conserveringsmethode en behandelden de erythrocyten vervolgens met tetra-azo-benzidine om de cellen geschikt te maken er proteïnen aan te adsorberen. Een groot bezwaar van de methode van Flick was echter dat de formaline-erythrocyten een sterke neiging tot spontane agglutinatie toonden.

In 1956 beschreven Cox en medewerkers een nieuwe techniek om schapeërythrocyten met formaline te behandelen, waarbij geen spontane agglutinatie zou optreden. Sindsdien zijn er nog verschillende andere methoden om erythrocyten met formaline houdbaar te maken in de literatuur verschenen. Sommige onderzoekers (Flick, 1948; McKenna, 1957; Ingraham, 1958; Weinbach, 1958; Csizmas, 1960) gaan uit van een suspensie van gewassen erythrocyten, anderen (Cox, 1956; Feeley, 1958; Fauconnier, 1960) voegen de formaline toe aan het totale bloed. Ook de gebruikte formalineconcentratie, de duur van het conserveringsproces en

de temperatuur waarbij dit plaats vindt vertonen bij de diverse methoden vaak aanzienlijke verschillen.

Weinbach (1958) heeft een aantal eigenschappen van de formaline-erythrocyten bestudeerd. Uit dit onderzoek blijkt dat de houdbaarheid van deze cellen tenminste een jaar bedraagt en dat zij gedurende deze tijd het vermogen behouden polysacchariden en, na voorbehandeling met tannine, ook proteïnen te binden. Bovendien zijn de erythrocyten resistent geworden tegen invloeden die bij verse cellen haemolyse veroorzaken, zoals hypotonische oplossingen, amboceptor, bevroering tot  $-20^{\circ}$  C en verhitting tot  $100^{\circ}$  C. Met antigeen gesensibiliseerde erythrocyten zouden in gelyophiliseerde toestand ook zeer lang houdbaar zijn. Bij mensenerthrocyten worden de bloedgroepantigenen A en B, evenals het rhesusantigeen, door de formalinebehandeling in een serologisch inactieve toestand gebracht of misschien ook geheel vernietigd. Bij schapeerythrocyten daarentegen zouden de thermostabiele F-, M- en S-antigenen niet worden beïnvloed.

Enige jaren later echter maakte dezelfde auteur (Weinbach en Moldovan, 1961) melding van het feit dat in enkele gevallen geformaliniseerde mensenerthrocyten die met tannine zijn voorbehandeld worden geagglutineerd door mensenserum. De hiervoor verantwoordelijke factor kan worden vernietigd door het serum gedurende twee uren bij  $56^{\circ}$  C te inactiveren. Ook kan men deze factor verwijderen door het serum te absorberen met tannine-erythrocyten. Bij ons eigen materiaal deed deze storende factor zich slechts bij een zeer gering aantal serummonsters voor. De schrijvers komen tot de hypothese dat deze agglutinatie kan wijzen op de aanwezigheid van hepatitisvirus in het bloed.

Feeley (1958) toonde aan dat formaline-erythrocyten die gesensibiliseerd waren met polysaccharide-antigenen, afkomstig van enterobacteriën, gedurende tenminste 200 dagen in de koelcel kunnen worden bewaard. De resultaten van haemagglutinatieproeven met formaline-erythrocyten blijken zeer goed overeen te stemmen met de uitkomsten die worden verkregen met verse erythrocyten.

### HOOFDSTUK III.

#### TECHNIEK VAN DE VERSCHILLENDE REACTIES

##### A. *Haemagglutinatiereactie*

###### § 1. INLEIDING

De door Lunde en Jacobs (1957) beschreven techniek bleek in de praktijk enige bezwaren te hebben die de reactie voor routinegebruik minder geschikt maakten. Deze auteurs gebruikten, evenals Boyden (1951), voor hun proeven schapeërythrocyten. Dit bracht met zich mee, dat alle sera met schapeërythrocyten („packed cells”) geabsorbeerd moesten worden, hetgeen vooral bij grote aantallen serummonsters nogal tijdrovend is. Bovendien wordt het serum hierbij altijd enigszins verdund.

Tijdens de behandeling van de cellen met tannine en antigeen trad dikwijls enige haemolyse op, die in ongeveer 20% van de gevallen zo'n omvang had, dat de suspensie onbruikbaar bleek en een nieuw monster erythrocyten moest worden genomen. Ook Boyden (1951) en Stavitsky (1954) maken melding van deze haemolyse en uit de literatuur blijkt dat ook anderen met deze moeilijkheid te kampen hadden.

Door gebruik te maken van mensenerythrocyten, bloedgroep O, rhesus negatief, kon het absorberen van de sera achterwege blijven. Deze cellen waren echter nog kwetsbaarder, zodat in  $\pm 35\%$  van de gevallen de celsuspensie onbruikbaar werd ten gevolge van haemolyse. Door de erythrocyten eerst met formaline te conserveren kon dit bezwaar worden opgeheven.

De conserveringsmethode van Flick (1948) bleek in de praktijk onbruikbaar te zijn doordat de cellen spontaan agglutineerden. Ook andere methoden waarbij van gewassen erythrocyten werd uitgegaan voldeden om dezelfde reden niet. Betere resultaten werden verkregen met de methode van Cox (1956), doch ook hier vertoonden de erythrocyten na enige maanden een spontane agglutinatie.

Door de cellen na de formalinebehandeling te wassen en te bewaren in aqua bidestillata in plaats van in physiologische zoutoplossing, kon deze agglutinatie worden voorkomen. Het percentage abnormale celvormen dat tijdens het conserveringsproces ontstaat kon aanzienlijk worden vermindert door de formalineconcentratie te verlagen en de duur van de behandeling te verlengen.

Op deze wijze werd een conserveringsmethode verkregen die althans in onze handen zeer goede resultaten opleverde. De houdbaarheid van

de celsuspensie bedraagt ruim anderhalf jaar. Na deze tijd neemt het vermogen van de cellen om antigenen te adsorberen snel af.

Na de formalinebehandeling worden rhesus positieve erythrocyten niet meer geagglutineerd door anti-rhesus (anti-d) serum, zodat ook gebruik gemaakt kan worden van rhesus positief bloed, bloedgroep O, dat in het algemeen gemakkelijker te verkrijgen is.

Een belangrijk voordeel van het gebruik van geformaliniseerde cellen is dat men gedurende lange tijd kan werken met een celsuspensie van constante samenstelling en concentratie, waardoor de reproduceerbaarheid van de reacties wordt vereenvoudigd.

Salk (1944) toonde aan dat de gevoeligheid van de haemagglutinatie-reactie met influenzavirus afhankelijk is van de hoeveelheid erythrocyten die wordt toegevoegd. Ook bij de door ons gebruikte indirecte reactie blijkt dit het geval te zijn; de beste resultaten werden verkregen met een 2½% erythrocytensuspensie. Een sterkere concentratie (bijv. 3% of 3½%) geeft een lagere serumtiter. Een minder sterk geconcentreerde suspensie geeft weliswaar een hogere titer, doch het aflezen van de reactie wordt dan te zeer bemoeilijkt doordat het patroon te vaag wordt.

Voor de antigeenbereiding werd aanvankelijk de door Lunde en Jacobs (1957) beschreven methode gevolgd. Hierbij worden de parasieten gesuspendeerd in aqua destillata, zodat er lysis optreedt. In de praktijk bleek echter dat de antigeentiter aanzienlijk verhoogd kon worden door deze suspensie enkele malen in te vriezen en te ontdooien.

Uit een onderzoek van Lunde en Jacobs (1959) naar de eigenschappen van het antigeen blijkt dat het in bevroren of gelyophiliseerde toestand maandenlang houdbaar is. Bij kamertemperatuur en ook in de koelcel (+4° C) verliest het zeer spoedig zijn activiteit.

## § 2. FORMALINEBEHANDELING VAN DE ERYTHROCYTEN

Materiaal: steriele Alsever's vloeistof: glucose 2,050 gram  
natriumcitraat 0,800 „  
natriumchloride 0,420 „  
citroenzuur 0,055 „  
aqua destillata ad 100 ml  
pH 6,1

formaline = solutio formaldehydi 34-37 gew. %

NaCl oplossing 1,7%

steriele aqua bidestillata

merthiolaat

50 ml bloed (groep O, rhesus positief of negatief) wordt op aseptische wijze opgevangen in 50 ml Alsever's vloeistof in een flesje van ± 125 ml dat met een rubber kurk of schroefdop kan worden afgesloten. Hieraan

wordt toegevoegd 10 ml van een mengsel, bestaande uit gelijke delen formaline en zoutsolutie 1,7%. Het geheel wordt gedurende 18–20 uur in de broedstoof (37° C) geïncubeerd. Om uitzakken en samenklonteren van de bloedcellen te voorkomen wordt het flesje op een langzaam draaiende rolmachine gelegd. De kleur van het bloed verandert langzamerhand van rood tot donkerbruin.

Na deze incubatieperiode wordt het bloed gecentrifugeerd en na verwijdering van het grijsbruin gekleurde bovenste laagje wordt het sediment driemaal gewassen in een flinke overmaat (400 à 500 ml) aqua bidestillata. Het suspenderen van het sediment, dat een taaie, kleverige consistentie heeft, geschiedt het gemakkelijkst met behulp van een glazen roerstaaf.

Om de formaline die nog in de celsuspensie aanwezig is te verwijderen, worden de erythrocyten gesuspenderd in 500 ml aqua bidestillata en gedurende ongeveer vier weken dagelijks éénmaal gewassen. Zolang er namelijk nog vrij formaldehyde aanwezig is in de celsuspensie is het niet mogelijk de erythrocyten te sensibiliseren.

De aanwezigheid van formaldehyde in het waswater wordt als volgt gecontroleerd (Egriwe, 1937; Feigl, 1947). Aan 1 ml van het waswater wordt in een reageerbuis 1½ ml zwavelzuur 96% en een mespuntje kristallijn chromotroopzuur toegevoegd. De reageerbuis wordt gedurende 10 minuten in een waterbad van 60° C verwarmd. Een violetrose verkleuring wijst op de aanwezigheid van formaldehyde. Een blanco controle met aqua bidestillata is noodzakelijk. Als identificatielimiet van deze methode wordt 0,14  $\gamma$  formaldehyde opgegeven, de concentratielimiet zou 1 : 360.000 bedragen.

Indien deze reactie negatief uitvalt worden de erythrocyten overgebracht in een gecalibreerde centrifugebuis en gedurende 15 minuten op 3000 toeren gecentrifugeerd. Van het sediment wordt een 10% suspensie gemaakt in steriele aqua bidestillata waaraan 0,1<sup>0</sup>/<sub>00</sub> merthiolaat als conservans is toegevoegd. De suspensie wordt in hoeveelheden van 10 ml verdeeld over een aantal flesjes en in de koelcel (+ 4° C) bewaard.

### § 3. ANTIGEENBEREIDING

Het peritoneaalvocht van muizen die vier dagen tevoren intraperitoneaal met toxoplasma zijn geïnfecteerd wordt verzameld in een gewogen centrifugebuis en gedurende 30 minuten op 3000 toeren gecentrifugeerd. Na afpipetteren van de bovenstaande vloeistof wordt de buis opnieuw gewogen en het sediment wordt gesuspenderd in een hoeveelheid aqua bidestillata, gelijk aan 20 maal het gewicht van dit (natte) sediment. De suspensie wordt enkele malen ingevroren (–20° C) en weer ontdooid (+37° C) en daarna nogmaals 30 minuten op 3000 toeren gecentrifugeerd. De bovenstaande heldere, soms iets opalescente vloeistof wordt afgepipetteerd, door toevoeging van een adequate hoeveelheid NaCl isoto-

nisch gemaakt en als antigeen gebruikt. Het antigeen wordt over een aantal kleine buisjes verdeeld en bij  $-20^{\circ}$  C bewaard.

Een controle-antigeen wordt bereid door van een aantal gezonde muizen lever, milt en stukjes peritoneum in een mortier fijn te wrijven en de orgaanbrij vervolgens enige malen met physiologische zoutoplossing te wassen om het bloed zoveel mogelijk te verwijderen. De verdere behandeling geschiedt op dezelfde wijze als bij het toxoplasma-antigeen.

De verdunning waarin het antigeen gebruikt moet worden voor de haemagglutinatiereactie wordt bepaald door een antigeentitratie (zie § 5).

#### § 4. SENSIBILISEREN VAN DE ERYTHROCYTEN

Materiaal: tannine (Merck, May and Baker, Brocades).

buffer pH 7,2 (0,15 M): NaCl	8,014 gram
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,408 „
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,780 „
aqua bidestillata ad	1000 ml
buffer pH 6,4 (0,15 M): NaCl	8,014 gram
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,320 „
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,641 „
aqua bidestillata ad	1000 ml

aqua bidestillata

toxoplasma- en controle-antigeen

formaline-erythrocyten, 10% suspensie in aqua bidestillata

De beide bufferoplossingen en de aqua bidestillata worden met 0,1<sup>0/00</sup> merthiolaat geconserveerd en bij kamertemperatuur bewaard. Van de tannine wordt wekelijks een verse 1% oplossing in aqua bidestillata bereid. Deze oplossing wordt bewaard in de koelkast. Voor het gebruik wordt hieruit een verdunning van 1 : 5000 in buffer pH 7,2 gemaakt.

Gelijke volumina formaline-erythrocyten (10%) en tannine, verdund 1 : 5000, worden gemengd en gedurende 15 minuten in een waterbad van 37° C geïncubeerd. Daarna wordt dit mengsel 5 minuten op 1000 à 1500 toeren gecentrifugeerd en het sediment wordt eenmaal gewassen met twee volumina buffer pH 7,2. Vervolgens wordt er weer een 10% suspensie van gemaakt in buffer pH 7,2. Deze tannine-erythrocyten kunnen gedurende maximaal twee weken in de koelcel worden bewaard.

Eén volumen van deze tannine-erythrocyten wordt gecentrifugeerd (5 minuten op 1000 à 1500 toeren) en de cellen worden gesuspendeerd in twee volumina buffer pH 6,4. Hieraan worden toegevoegd twee volumina antigeen, verdund in buffer pH 6,4. Deze verdunning wordt bepaald door de titer van het antigeen. Dit mengsel blijft gedurende 30 minuten onder af en toe schudden bij kamertemperatuur staan. Na afcentrifugeren (5 minuten op 1000 à 1500 toeren) wordt het sediment eenmaal gewassen

in vier volumina aqua bidestillata en vervolgens weer gesuspendeerd in aqua bidestillata, zodanig dat een 2½% antigeen-erythrocytensuspensie wordt verkregen. Deze antigeen-erythrocyten worden direct voor de proef gebruikt.

Op dezelfde wijze wordt een hoeveelheid erythrocyten gesensibiliseerd met controle-antigeen.

#### § 5. ANTIGEENTITRATIE

Op dezelfde wijze als voor de gewone haemagglutinatieproef gebeurt wordt een aantal monsters van de 10% tannine-erythrocytensuspensie gesensibiliseerd met antigeen in verdunningen van respectievelijk 1 : 2½, 1 : 5, 1 : 7½, 1 : 10, 1 : 12½, 1 : 15, 1 : 17½ en 1 : 20.

Op de in de volgende paragraaf beschreven wijze worden een bekend positief serum met een titer van 1024 of 2048 en een bekend negatief serum met elk van deze monsters volledig uitgetitreerd. Als titer van het antigeen wordt de hoogste verdunning genomen die met het positieve serum een titer van 1024, respectievelijk 2048 geeft.

Een te lage antigeenconcentratie geeft lagere serumtiters, een te hoge concentratie leidt tot aspecifieke reacties. Ook de controles en het negatieve serum geven dan een positief patroon te zien. Een enkele maal gelukt het niet, met een bepaald antigeenmonster de gewenste serumtiter te bereiken. Opvoeren van de antigeenconcentratie geeft dan weer aanleiding tot aspecifieke resultaten. Dit blijkt het geval te zijn bij antigenen die bereid zijn van peritoneaalvocht dat slechts een gering percentage toxoplasma's en veel muizecellen bevat.

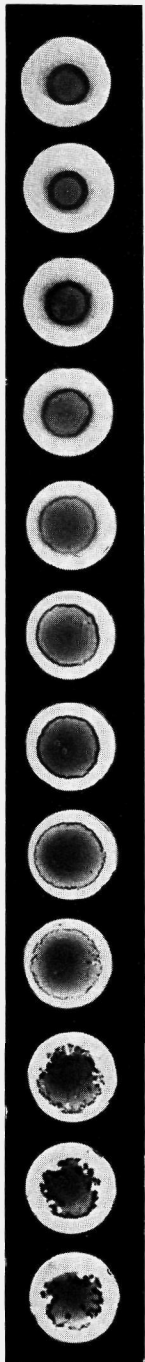
Als titer van het controle-antigeen wordt genomen de laagste verdunning die nog geen aspecifieke reacties geeft.

#### § 6. UITVOERING VAN DE HAEMAGGLUTINATIEREACTIE

De reactie wordt uitgevoerd in perspex platen waarin holten zijn geboord met een diameter van 12 mm, een diepte van 15 mm en een ronde (concave) bodem. De oppervlakte van deze holten moet goed glad gepolijst zijn en de kromtestraal van de bodem mag niet te groot zijn.

De serumverdunningen worden gemaakt in physiologische zoutoplossing met 1% „normaal” konijneserum, waaronder hier wordt verstaan serum waarvan de Sabin-Feldman-, complementbindings- en haemagglutinatie-reactie negatief zijn. Erythrocyten die met tannine zijn behandeld agglutineren namelijk in gewone physiologische zoutoplossing. Het konijneserum wordt zo spoedig mogelijk na het afnemen ingevroren en bij -20° C bewaard. Vlak voor het gebruik wordt het ontdooid en gedurende 30 minuten bij 56° C geïnactiveerd. Bij bewaren in de koelcel (+4° C) gaat het vermogen de spontane agglutinatie te verhinderen snel verloren.

4 +    4 +    4 +    3 +    3 +    3 +    3 +    2 +    2 +    1 +    —



Afbeelding 1

Haemagglutinatiëpatroon bij een positief serum.  
Beginverduunning 1 : 32. Titer 8192 (9e buisje van links).



De patiëntensera worden eveneens bij  $-20^{\circ}$  C bewaard en voor het gebruik geïnactiveerd. Van deze sera worden tweevoudige verdunningsreeksen gemaakt in hoeveelheden van 0,5 ml. Aan elk buisje wordt 0,05 ml (1 druppel) van de  $2\frac{1}{2}\%$  antigeen-erythrocytensuspensie toegevoegd en het geheel wordt goed gemengd door de platen gedurende een minuut te schudden.

Bij elke proef worden de volgende controles verricht:

Serumcontroles:

laagste serumverdunding + 1 dr. controle-antigeen-erythrocyten

laagste serumverdunding + 1 dr. tannine-erythrocyten ( $2\frac{1}{2}\%$ )

Erythrocytencontroles:

0,5 ml verdunningsmedium + 1 dr. formaline-erythrocyten ( $2\frac{1}{2}\%$ )

0,5 ml verdunningsmedium + 1 dr. tannine-erythrocyten ( $2\frac{1}{2}\%$ )

0,5 ml verdunningsmedium + 1 dr. antigeen-erythrocyten ( $2\frac{1}{2}\%$ )

0,5 ml verdunningsmedium + 1 dr. controle-antigeen-erythrocyten  
( $2\frac{1}{2}\%$ )

Bovendien worden bij elke proef een bekend positief serum en een negatief serum volledig mee uitgetitreerd.

Nadat de platen  $2\frac{1}{2}$  uur bij kamertemperatuur hebben gestaan wordt de reactie afgelezen volgens het agglutinatiëpatroon dat zich op de bodem van de buisjes heeft gevormd. Dit kan gebeuren met behulp van een schuin geplaatste spiegel of door de platen op een witte ondergrond te zetten.

Het agglutinatiëpatroon wordt als volgt beoordeeld (zie afbeelding 1):

4+: uniforme laag over de gehele bodem met naar binnen gevouwen randen.

3+: uniforme laag over de gehele bodem.

2+: uniforme laag in het centrum met aan de rand een wijde, onscherp begrensde ring.

1+: ringstructuur kleiner doch met onscherpe rand.

— : scherp begrensde nauwe ring.

Het 4+ patroon wordt niet altijd gevormd, ook niet wanneer het serum toch sterk positief is.

De reciproke waarde van de hoogste serumverdunding die een 2+ patroon geeft wordt als titer van het serum aangenomen. De toegevoegde hoeveelheid erythrocytensuspensie wordt hierbij verwaarloosd. Bij deze wijze van aflezen is de reproduceerbaarheid van de reactie zeer goed. De schommeling in titer bedraagt niet meer dan één verdunning. Wanneer men het haemagglutinatië-eindpunt als titer aanneemt, zijn deze schommelingen veel groter. Waarschijnlijk komt dit doordat factoren als verdunningsfouten, gladheid van de bodem van de buisjes en variaties in het aantal toegevoegde erythrocyten de sterkste invloed hebben in die buisjes waarin slechts een geringe agglutinatië aanwezig is.

## § 7. HAEMAGGLUTINATIEREMMINGSREACTIE

Als controle op de specificiteit van een positieve haemagglutinatiereactie bij sera met een negatieve Sabin-Feldmanproef wordt gebruik gemaakt van een remmingsreactie die als volgt wordt uitgevoerd. Van het te onderzoeken serum worden drie verdunningsreeksen gemaakt. Aan deze reeksen wordt per buisje respectievelijk één druppel (0,05 ml) 1 : 25 verdund toxoplasma-antigeen, één druppel onverdund controle-antigeen en één druppel physiologische zoutoplossing toegevoegd. Nadat de buisjes een half uur bij kamertemperatuur hebben gestaan, wordt aan elk buisje één druppel antigeen-erythrocytensuspensie toegevoegd. Het aflezen geschiedt op dezelfde wijze als bij de haemagglutinatiereactie.

Een alleen in de eerste reeks optredende titerdaling van tenminste vier verdunningen wordt beschouwd als een aanwijzing voor de specificiteit van de haemagglutinatiereactie.

### B. *Sabin-Feldmanreactie*

#### § 1. INLEIDING

Van de serummonsters die in ons laboratorium binnenkomen voor diagnostisch onderzoek op toxoplasmosis wordt een Sabin-Feldmanreactie uitgevoerd in de verdunningen 1 : 64 en 1 : 128. Sera waarvan de titer 128 of hoger blijkt te zijn worden daarna volledig uitgetitreerd. Sera met een titer lager dan 64 worden voor klinisch diagnostische doeleinden als negatief beschouwd, tenzij de complementbindingsreactie positief is. In dat geval wordt ook van de lagere serumverdunningen een Sabin-Feldmanproef verricht.

Deze werkwijze is wetenschappelijk weliswaar niet fraai doch heeft het voordeel, dat de beschikbare hoeveelheid activatorserum zo economisch mogelijk wordt gebruikt. Bovendien is het op deze manier mogelijk in redelijk korte tijd een groot aantal serummonsters te verwerken. Een aantal positieve sera met een titer lager dan 64 wordt zo uiteraard als negatief beschouwd. De kans dat zich hierbij serummonsters bevinden uit het allereerste begin van de infectie, waarbij de complementbindingsreactie nog niet positief is, is echter uitermate klein. Voor de diagnostiek van acute of althans recente toxoplasma-infecties is deze methode dan ook wel verantwoord te achten. Bij een epidemiologisch onderzoek, waarbij ook lage Sabin-Feldman titers van belang zijn, kan deze werkwijze niet worden gevolgd.

Het maken van de serumverdunningen, het toevoegen van activator, antigeen en methyleenblauwoplossing gebeurt met pasteurse pipetten die alle op dezelfde dikte zijn afgesneden. Bij het maken van de verdunningsreeks wordt voor elk buisje een nieuwe pipet gebruikt. De nauwkeurigheid die hiermede bereikt wordt blijkt in de praktijk voldoende te zijn. De resultaten zijn binnen nauwe grenzen (1 buisje) reproduceerbaar.

De reactie wordt uitgevoerd in glazen buisjes met een lengte van 7 cm en een diameter van  $\pm 7$  mm. De buisjes worden na gebruik weggegooid.

## § 2. MATERIAAL

**Patiëntenserum.** Dit wordt na ontvangst bewaard bij  $-20^{\circ}$  C. Voor het gebruik in de Sabin-Feldmanproef wordt het gedurende 30 minuten bij  $56^{\circ}$  C geïnactiveerd.

**Activatorserum.** Dit wordt onmiddellijk na het afnemen in kleine porties verdeeld en ingevroren ( $-20^{\circ}$  C). In deze toestand blijven de activerende eigenschappen tenminste drie maanden bewaard. Daarna wordt het serum opnieuw gecontroleerd. Vlak voor het gebruik wordt het snel ontdooid. Een eventueel restant wordt niet meer gebruikt. Het negatief zijn van het serum wordt gecontroleerd door middel van een Sabin-Feldmanproef met een bekende activator. In de verdunning 1 : 4 mag niet meer dan 7–12% van de extracellulair gelegen toxoplasma's ongekleurd zijn. De activerende eigenschappen worden gecontroleerd door het serum als activator te gebruiken in een Sabin-Feldmanproef met twee bekende positieve sera met titers van respectievelijk 64 en 512.

**Methyleenblauwoplossing.** 2 gram methyleenblauw (Geigy) wordt opgelost in 100 ml absolute alcohol.

**Alkalische soda-boraxbuffer.** Deze bestaat uit:

973 ml van een 0,53%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  oplossing in aqua destillata +  
27 ml van een 1,91%  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ aq.}$  oplossing in aqua destillata.  
pH = 11.

Vlak voor het toevoegen in de proef worden de methyleenblauwoplossing en de buffer gemengd in een verhouding van 3 : 10.

**Antigeen.** Dit is peritoneaalvocht van drie dagen tevoren met toxoplasma intraperitoneaal geïnfecteerde muizen. Het wordt geogst door de muizen met chloroform te doden en het peritoneaalvocht met een pasteurse pipet op te zuigen. Het antigeen wordt zodanig verdund dat er onder het microscoop (vergroting 1000  $\times$ ) niet meer dan vijf toxoplasma's per gezichtsveld zijn. Het wordt in de koelcel bewaard totdat het in de proef wordt toegevoegd.

## § 3. UITVOERING VAN DE SABIN-FELDMANREACTIE

Van het patiëntenserum wordt een tweevoudige verdunningsreeks gemaakt. Van de te onderzoeken verdunningen worden 2 druppels overgebracht in een nieuw buisje en hieraan worden toegevoegd 4 druppels activator en 2 druppels antigeen. De eindverdunning van het serum wordt hierdoor viermaal zo hoog.

De buisjes worden enige minuten krachtig geschud en vervolgens gedurende een uur in een waterbad van  $37^{\circ}$  C geïncubeerd. Daarna worden ze weer geschud en aan elk buisje worden 4 druppels van het methyleen-

blauw-buffermengsel toegevoegd. De buisjes worden in de koelkast bewaard totdat de reactie wordt afgelezen. Het beste kan dit geschieden 1-3 uur na het toevoegen van de kleurstofbuffer, doch het aflezen kan zelfs nog na een week plaats vinden.

Bij elke proef worden de volgende controles verricht.

- a. Bekend positief serum (liefst 1 : 32 pos., 1 : 64 plus/minus, 1 : 128 neg.).
- b. Activatorcontrole: 2 druppels NaCl oplossing in plaats van serum.
- c. Antigeencontrole: 6 druppels NaCl oplossing in plaats van activator en serum.

Vóór het aflezen worden de proefbuisjes gedurende vijf minuten in een waterbad van 37° C verwarmd en daarna goed geschud. Uit elk buisje wordt één druppel overgebracht op een objectglas en met een dekglasje bedekt. Onder het microscoop met olieïmmersie (vergroting  $\pm 1000 \times$ ) worden 100 vrijliggende extracellulaire parasieten geteld en de percentages ongekleurde en gekleurde exemplaren worden genoteerd. Als titer wordt beschouwd de reciproke waarde van de eindverduunning van het serum (dus na toevoeging van activator en antigeen) waarbij 50% van de toxoplasma's ongekleurd is. Blijkt de titer 128 of hoger te zijn dan wordt het serum uitgetitreerd.

### C. Complementbindingsreactie

#### § 1. INLEIDING

De reactie wordt uitgevoerd in perspex platen waarin holten zijn geboord met een diameter van 12 mm, een diepte van 15 mm en een vlakke bodem. Het aflezen van de reactie geschiedt met behulp van een schuin geplaatste spiegel. Van alle te onderzoeken sera wordt eerst een kwalitatieve reactie uitgevoerd. De positieve sera worden daarna uitgetitreerd.

#### § 2. MATERIAAL

**P a t i ë n t e n s e r u m.** Dit wordt na ontvangst bij -20° C bewaard en voor het gebruik 30 minuten bij 56° C geïnactiveerd.

**C o m p l e m e n t.** Hiervoor wordt caviaserum gebruikt dat direct na het afnemen in kleine porties verdeeld en ingevroren (-20° C) wordt. Daar bij cavia's veel latente toxoplasma-infecties voorkomen, wordt dit serum eerst door middel van een Sabin-Feldmanproef gecontroleerd op de aanwezigheid van toxoplasma-antistoffen. Voor elke proef wordt een complementtitratie verricht om de sterkte van het complement te bepalen.

**A n t i g e e n.** Dit wordt op dezelfde wijze bereid als voor de haemagglutinatiereactie. Voor het gebruik wordt een antigeentitratie verricht om de optimale verduunning van het antigeen vast te stellen.

**S c h a p e ë r y t h r o c y t e n.** Schapebloed wordt op de gebruikelijke

aseptische wijze opgevangen in een gelijk volumen steriele Alsever's vloeistof. Voor het gebruik wordt het gedurende tenminste drie etmalen in de koelcel bewaard. Voor het bereiden van het haemolytisch systeem worden de erythrocyten driemaal met physiologische zoutoplossing gewassen. Daarna worden de erythrocyten gedurende 10 minuten op 3000 toeren gecentrifugeerd in een gecalibreerde buis en van het sediment wordt een 2% suspensie in NaCl oplossing gemaakt.

**A m b o c e p t o r.** Hiervoor wordt de haemolytische amboceptor ten opzichte van schapeërythrocyten (Rijks Instituut voor de Volksgezondheid) gebruikt. De sterkte van de amboceptor wordt door middel van een titratie bepaald.

### § 3. AMBOCEPTORTITRATIE

Van de amboceptor worden de volgende verdunningen gemaakt: 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 2000 enz. tot en met 1 : 10.000, in hoeveelheden van 0,25 ml. Aan ieder buisje wordt toegevoegd 0,25 ml complement, verdund 1 : 10, 0,5 ml physiologische zoutoplossing en 0,25 ml van de 2% erythrocytensuspensie. De perspex plaat wordt gedurende een half uur in een waterbad van 37° C geplaatst en daarna wordt de titratie afgelezen. Het laatste buisje waarin nog volledige haemolyse is opgetreden bevat één minimum haemolytische dosis (1 M.H.D.). In de hoofdproef worden 5 M.H.D. per buisje gebruikt. Voor de bereiding van het haemolytisch systeem wordt de 2% schapeërythrocytensuspensie gemengd met een gelijk volumen amboceptor die zodanig is verdund, dat 0,25 ml 5 M.H.D. bevat. Voor het toevoegen in de proef wordt het haemolytisch systeem een half uur bij kamertemperatuur geïncubeerd, zodat de erythrocyten door de haemolysinen gesensibiliseerd kunnen worden.

### § 4. COMPLEMENTTITRATIE

De volgende complementverdunningen worden gemaakt: 1 : 25, 1 : 30, 1 : 35 enz. tot en met 1 : 125, in hoeveelheden van 0,25 ml. Hieraan wordt toegevoegd 0,25 ml physiologische zoutsolutie en 0,25 ml antigeen in de verdunning die ook in de hoofdproef wordt gebruikt. Nadat de plaat gedurende 15 minuten in een waterbad van 37° C heeft gestaan wordt aan elk buisje 0,5 ml van het haemolytisch systeem toegevoegd. Vervolgens wordt de plaat nogmaals een half uur bij 37° C geplaatst en direct daarna wordt de titratie afgelezen. Het laatste buisje dat nog volledige haemolyse vertoont bevat één eenheid (1 E) complement. Voor de hoofdproef wordt een complementverdunning gebruikt die 2 E per 0,25 ml bevat.

### § 5. ANTIGEENTITRATIE

Het antigeen wordt getitreerd ten opzichte van twee bekende positieve standaardsera, één met hoge en één met lage titer. Als controles worden

een bekend negatief serum en physiologische zoutoplossing gebruikt. Van deze sera worden acht tweevoudige verdunningsreeksen gemaakt in hoeveelheden van 0,25 ml. Aan de eerste reeks wordt toegevoegd 0,25 ml antigeen, verdund 1 : 4, aan de tweede reeks 0,25 ml antigeen, verdund 1 : 8, enz. Voor de laatste reeks wordt een antigeenverdunding van 1 : 512 gebruikt.

Vervolgens wordt bij alle buisjes 0,25 ml complement (2 E) gepipetteerd. Nadat de plaat 18 uur in de koelkast heeft gestaan, wordt deze gedurende vijf minuten in een waterbad van 37° C verwarmd. Daarna wordt aan elk buisje 0,5 ml van het haemolytisch systeem toegevoegd. Vervolgens wordt de plaat weer een half uur in het waterbad geplaatst, waarna de reactie wordt afgelezen. Hierbij wordt de laagste antigeenconcentratie bepaald die nog juist de hoogste serumtiter geeft. Voor de hoofdproef wordt het antigeen in een viermaal zo hoge concentratie gebruikt.

Bij elke titratie wordt tevens een serumcontrole (laagste verdunning) en een haemolytisch systeemcontrole gedaan.

## § 6. UITVOERING VAN DE COMPLEMENTBINDINGSREACTIE

Van de patiëntensera worden tweevoudige verdunningsreeksen gemaakt in hoeveelheden van 0,25 ml, met een beginverdunding van 1 : 2. Aan elk buisje wordt 0,25 ml antigeen en 0,25 ml complement toegevoegd. Daarna blijven de platen gedurende 18 uur in de koelkast staan. Vervolgens wordt, nadat de platen enkele minuten in een waterbad zijn verwarmd, per buisje 0,5 ml van het haemolytisch systeem bij gepipetteerd en worden de platen nogmaals een half uur in een waterbad van 37° C geïncubeerd. Direct daarna wordt de reactie afgelezen.

Bij elke proef worden een bekend positief en een bekend negatief serum uitgetitreerd. Bovendien worden nog de volgende controles verricht:

- a. serumcontrole: 0,25 ml serum, verdund 1 : 2, + 0,25 ml NaCl + 0,25 ml complement.
- b. antigeencontrole: 0,5 ml NaCl + 0,25 ml antigeen.
- c. haemolytisch systeemcontrole: 0,75 ml NaCl.

Als titer van het serum wordt beschouwd de reciproke waarde van de hoogste verdunning, vóór de toevoeging van complement, antigeen en haemolytisch systeem, waarbij 50% haemolyse wordt gevonden. Meer dan 50% haemolyse wordt als negatief beschouwd.

## HOOFDSTUK IV.

### VERGELIJKING VAN DE HAEMAGGLUTINATIETREACTIE EN DE SABIN-FELDMANREACTIE BIJ SERA VAN MENSEN EN HONDEN

#### § 1. INLEIDING

Met behulp van de haemagglutinatiereactie (H.A.R.) en de Sabin-Feldmanreactie (S.F.R.) werden drie groepen sera onderzocht. De eerste groep omvatte 1947 sera, afkomstig van patiënten bij wie de diagnose toxoplasmosis werd overwogen. Een verdeling van dit materiaal, gebaseerd op de klinische verschijnselen of op de leeftijd van de patiënten, kon niet worden gemaakt, doordat in de meeste gevallen de hiervoor noodzakelijke gegevens ontbraken. De tweede groep bestond uit 326 sera van gezonde volwassenen (donores van een bloedtransfusiedienst en personeel van slachthuizen). De derde groep, die 251 sera omvatte, was afkomstig van honden bij wie toxoplasmosis werd vermoed en van honden die als huisdier werden gehouden in gezinnen waar gevallen van toxoplasmosis waren vastgesteld.

Voor de S.F.R. werd gebruik gemaakt van de uitkomsten van het routine-laboratorium. Voor de sera van de eerste en van de derde groep bedroeg de laagste onderzochte verdunning 1 : 32. \*) Bij de sera van de tweede groep werd, in verband met een epidemiologisch onderzoek, een beginverdunning van 1 : 4 gebruikt. Bij de H.A.R. werd van dezelfde verdunningen uitgegaan als bij de S.F.R.

In alle gevallen waarin een positieve H.A.R. werd gevonden, terwijl de S.F.R. negatief was, werd de specificiteit van de H.A.R. getoetst door middel van een remmingsproef. Bij alle op deze wijze onderzochte sera werd in de eerste reeks een titerdaling van tenminste vijf verdunningen waargenomen, terwijl in de controlereeksen de reactie niet werd beïnvloed. Dit maakt het waarschijnlijk dat ook bij deze sera de positieve H.A.R. werd veroorzaakt door specifieke toxoplasma-antistoffen.

Bij alle sera van de eerste en derde groep waarvan de uitkomsten van de H.A.R. en de S.F.R. kwalitatief niet met elkaar overeenstemden werd het onderzoek herhaald met een beginverdunning van 1 : 4. De resultaten hiervan worden vermeld in de desbetreffende paragrafen.

Bij een aantal mensensera werd agglutinatie waargenomen in de serum-

\*) In de jaren 1959 en 1960 werd voor de S.F.R. uitgegaan van een beginverdunning van 1 : 32. Tegenwoordig bedraagt de laagste verdunning 1 : 64.

controle met tannine-erythrocyten. In deze gevallen werd de H.A.R. herhaald nadat het serum gedurende een half uur bij kamertemperatuur was geabsorbeerd met een gelijk volumen tannine-erythrocyten („packed cells”). Van de hondensera moest ongeveer 15% worden geabsorbeerd om specifieke reacties uit te schakelen.

## § 2. SERA VAN PATIËNTEN

S.F.R.	995	5	39	91	131	163	150	136	106	66	22	16	22	5	totaal 1947
32.768								1					1		2
16.384	1					1			1					1	4
8.192				1	1	2	1	4		2			1	1	13
4.096	2			2		2	3	5	13	7	3	1	6	2	46
2.048				1	3	1	10	4	8	2	4	7			40
1.024			1	3	3	3	7	5	17	8	5	5	5	1	63
512	1		1	3	6	20	18	21	14	11	3	2		1	101
256	3		5	7	16	27	15	26	19	15	3	2	2		140
128	9	2	6	29	42	65	68	43	27	14	3				308
64	45	1	17	37	51	36	28	17	6	3	1	1			243
32	13	2	8	8	11	5	4	5	1						57
<32	921		1	2			4	2							930
	<32	32	64	128	256	512	1.024	2.048	4.096	8.192	16.384	32.768	65.536	131.072	H.A.R.

TABEL I.

Resultaten van de S.F.R. en de H.A.R. bij sera van patiënten.

De resultaten van de H.A.R. en de S.F.R. van deze 1947 sera worden weergegeven in tabel I. Opvallend is de sterke spreiding van de H.A.-titers die bij een bepaalde S.F.-titer worden gevonden. In enkele gevallen bedraagt deze zelfs 14 verdunningen. Bij de S.F.R. wordt een zeer duidelijke piek aangetroffen van 243 en 308 sera met titers van respectievelijk 64 en 128. Ook bij de H.A.R. komt een dergelijke top voor, doch deze is veel minder uitgesproken en omvat het gebied met titers van 256 tot en met 4096. Van een duidelijke kwantitatieve correlatie tussen beide reacties is dan ook geen sprake.

Van de 9 sera die met de H.A.R. positief en met de S.F.R. negatief waren bleek bij nader onderzoek de S.F.R. in 7 gevallen toch positief te zijn. Bij 5 sera werd een titer van 8 en bij 2 sera een titer van 16 gevonden. De H.A.-titers van de twee overige sera bedroegen respectievelijk 64 en 1024.

74 sera waren positief met de S.F.R., doch negatief met de H.A.R.



Twee van deze sera bleken een H.A.-titer te hebben van 16. De S.F.-titers van deze sera waren respectievelijk 64 en 128. Bij 30 sera werd in de eerste twee of drie buisjes een 1+ agglutinatie waargenomen die kon worden geremd door toevoeging van toxoplasma-antigeen. Hiermede voldeden deze sera echter niet aan het criterium voor het aflezen van de titer (2+ patroon) en zij werden daarom als negatief beschouwd. Bij 6 van deze 74 sera was ook de C.B.R. positief. In twee van deze gevallen werd de diagnose toxoplasmosis bevestigd door isolatie van de parasiet. Op de factoren die mogelijk verantwoordelijk zijn voor het negatieve resultaat van de H.A.R. bij deze sera wordt in hoofdstuk VII nader ingegaan.

### § 3. SERA VAN GEZONDE VOLWASSENEN

Tabel II geeft een overzicht van de uitkomsten van de H.A.R. en de S.F.R. bij deze sera. Van alle sera waarbij de H.A.R. en de S.F.R. negatief waren was ook de C.B.R. negatief. Opmerkelijk is het grote aantal sera met S.F.-titers van 4, 8 of 16, dat met de H.A.R. negatief gevonden werd. Bij iets minder dan de helft van deze sera werd met de H.A.R. in de eerste twee of drie buisjes een 1+ patroon waargenomen. In geen enkel geval echter werd een 2+ patroon bereikt. Deze sera werden als negatief geregistreerd.

S.F.R.	171	3	10	19	37	30	23	11	15	3	2	2	totaal		
													326		
4.096									1				1		
2.048												1	1		
1.024							1		1				2		
512						2			1		1		4		
256	1					5	1	2	2	1	1	1	14		
128			1	1	1	3	4	2	5	2			19		
64	3		3	8	19	14	11	7	2				67		
32	3		3	6	10	16	5	6	2				51		
16	18												18		
8	28												28		
4	53				1								54		
<4	65					1			1				67		
	<4	4	8	16	32	64	128	256	512	1.024	2.048	4.096	8.192	16.384	H.A.R.

TABEL II.

Resultaten van de S.F.R. en de H.A.R. bij sera van gezonde volwassenen.

Het percentage sera met een hoge S.F.-titer (> 256) is in deze groep aanzienlijk kleiner dan in de patiëntengroep. Bij deze groep bedraagt dit

percentage 2,45, bij de patiëntengroep 13,80. Ook voor de H.A.R. blijkt dit het geval te zijn: 2,14% van de sera met een titer hoger dan 2048 in deze groep, tegenover 12,1% in de patiëntengroep. Bovendien liggen de hoogste met beide reacties gevonden titers in de groep van gezonden 3 à 4 verdunningen lager dan in de patiëntengroep.

Ook hier is er, bij eenzelfde S.F.-titer, een grote spreiding van de H.A.-titers. In kwantitatief opzicht stemmen de resultaten van beide reacties slechts zeer weinig met elkaar overeen.

#### § 4. SERA VAN HONDEN

De uitkomsten van de H.A.R. en de S.F.R. bij deze sera zijn samengevat in tabel III. 57 sera (22,71%) waren alleen met de S.F.R. positief. Herhaling van de H.A.R., met een beginverdunning van 1 : 4, leverde de volgende resultaten op. Bij twee sera met een S.F.-titer van 128 werd een H.A.-titer van 16 gevonden, 9 sera gaven in de eerste buisjes een 1+ reactie. De overige 46 sera waren ook in de laagste verdunning volkomen negatief. Hiervan was in 8 gevallen ook de C.B.R. positief. Het serum dat aanvankelijk alleen met de H.A.R. positief was bleek bij nader onderzoek een S.F.-titer van 16 te hebben.

S.F.R.	176	6	17	9	15	11	8	4	5	totaal
8.192								1	1	2
4.096								1		1
2.048							1			1
1.024			1				1	1		3
512	2				2	3	2			9
256	13		1	4	4	1			1	24
128	25	3	8	3	5	5	4	1	3	57
64	13	3	6	2	3	1				28
32	4		1		1					6
<32	119					1				120
	<32	32	64	128	256	512	1.024	2.048	4.096	H.A.R.

TABEL III.

Resultaten van de S.F.R. en de H.A.R. bij sera van honden.

Ook bij deze groep blijkt een grote spreiding van de H.A.-titers te bestaan. Bij de S.F.R. wordt een duidelijke top gevonden van 57 sera met een titer van 128. Een dergelijke top is bij de H.A.R. nauwelijks te be-

speuren. Ook hier is er geen kwantitatieve correlatie tussen de uitkomsten van de beide reacties.

### § 5. VERGELIJKING VAN DE RESULTATEN BIJ DE DRIE GROEPEN

Om vergelijking met de beide andere groepen mogelijk te maken werden in de groep van gezonden alle sera met titers lager dan 32 onder één hoofd samengevat. De kwalitatieve uitkomsten van de drie groepen zijn weergegeven in tabel IV.

Titer van de	Patiënten	Gezonden	Honden	Patiënten + Gezonden
H.A.R. $\geq 32$ S.F.R. $\geq 32$	943 (48,44%)	149 (45,70%)	74 (29,48%)	1092 (48,04%)
H.A.R. $< 32$ S.F.R. $< 32$	921 (47,30%)	164 (50,30%)	119 (47,41%)	1085 (47,73%)
H.A.R. $< 32$ S.F.R. $\geq 32$	74 ( 3,80%)	10 ( 3,08%)	57 (22,71%)	84 ( 3,70%)
H.A.R. $\geq 32$ S.F.R. $< 32$	9 ( 0,46%)	3 ( 0,92%)	1 ( 0,40%)	12 ( 0,53%)
Totaal	1947 ( 100 %)	326 ( 100 %)	251 ( 100% )	2273 ( 100% )

TABEL IV.

Samenvatting van de kwalitatieve uitkomsten van de H.A.R. en de S.F.R.

Uitgaande van een laagste verdunning van 1 : 32 wordt bij de drie groepen in respectievelijk 95,74% (1864 sera), 96% (313 sera) en 76,89% (193 sera) van het aantal onderzochte sera een kwalitatieve overeenstemming tussen de uitkomsten van beide reacties gevonden. Bij een beginverdunning van 1 : 4 voor beide reacties is in de groep van gezonden de overeenstemming aanmerkelijk slechter, namelijk 66,87% (218 sera).

Opmerkelijk is het geringe verschil in percentage sera met een S.F.-titer  $\geq 32$  tussen de patiëntengroep (52,24%) en de groep van gezonden (48,78%). Statistisch blijkt dit verschil verre van significant te zijn ( $\chi^2$ -toets,  $0,20 < P < 0,30$ ). Dit lijkt in strijd met de verwachting. Gemeten naar de leeftijd zijn beide groepen echter niet vergelijkbaar. In de patiëntengroep komt een groot percentage jonge individuen (kinderen en adolescenten) voor, terwijl de groep van gezonden uit volwassenen bestaat. Het is bekend dat bij de lagere leeftijdsgroepen het percentage negatieve Sabin-Feldmanreacties groter is dan bij de hogere leeftijdsgroepen. Het is mogelijk dat hierin de oorzaak moet worden gezocht van bovengenoemde insignificantie. De reeds in § 3 genoemde verschillen in percentages sera

met hoge S.F.- en H.A.-titers in beide groepen zijn echter in hoge mate significant ( $\chi^2$ -toets,  $P \ll 0,001$ ).

Overigens komen de kwalitatieve resultaten van deze beide groepen bijzonder goed met elkaar overeen. Statistisch blijken de kleine verschillen die er zijn verre van significant te zijn ( $\chi^2$ -toets,  $0,7 > P > 0,5$ ). Hierdoor kunnen beide groepen geacht worden afkomstig te zijn uit dezelfde populatie, zodat het geoorloofd is de uitkomsten van deze groepen samen te voegen (laatste kolom van tabel IV) en te vergelijken met de bij honden verkregen resultaten.

De verschillen tussen de uitkomsten van de H.A.R. bij honden en die bij mensen zijn in hoge mate significant ( $\chi^2$ -toets \*),  $P \ll \ll 0,001$ ). Daarentegen bestaat er een zeer goede overeenstemming in de resultaten van de S.F.R. bij deze beide groepen. Van de hondensera heeft 52,19% een S.F.-titer  $\geq 32$ . Bij de mensensera bedraagt dit percentage 51,74. De discrepantie wordt geheel veroorzaakt door het verschillende gedrag van de H.A.R. bij deze twee groepen. Het percentage sera waarbij de S.F.R. een positieve, de H.A.R. echter een negatieve uitkomst oplevert is bij honden aanzienlijk groter dan bij mensen.

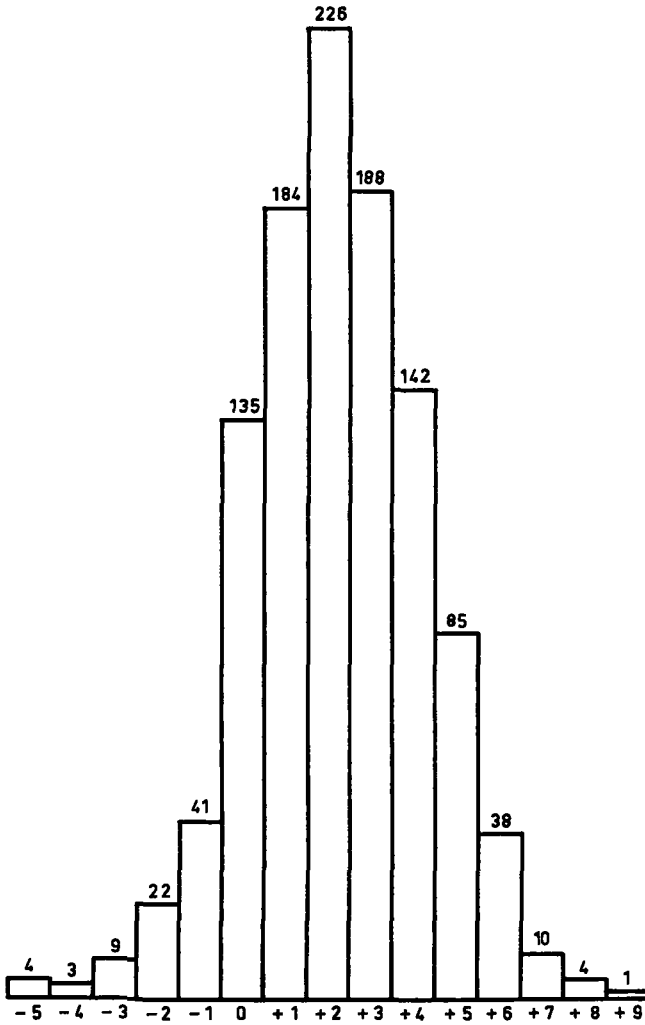
Sera van	Patiënten	Gezonden	Honden	Patiënten + Gezonden
H.A.-titer < S.F.-titer	70 ( 7,42%)	9 ( 6,04%)	26 (35,1%)	79 ( 7,23%)
H.A.-titer = S.F.-titer	115 (12,19%)	20 (13,42%)	17 (23,0%)	135 (12,36%)
H.A.-titer > S.F.-titer	758 (80,39%)	120 (80,54%)	31 (41,9%)	878 (80,41%)
Totaal aantal sera	943 ( 100 %)	149 ( 100 %)	74 (100 %)	1092 ( 100 %)

TABEL V.

Verhouding van de H.A.-titers ten opzichte van de S.F.-titers bij sera die met beide reacties positief waren.

Tabel V geeft een overzicht van de onderlinge verhouding van de titers van de H.A.R. en van de S.F.R. bij die sera die met beide reacties positief ( $\geq 32$ ) waren. De exacte hoogte van de titers werd hierbij buiten beschouwing gelaten. Ook hier bestaat weer een duidelijk significante overeenstemming tussen de patiëntengroep en de groep van gezonden. ( $\chi^2$ -toets,  $0,7 < P < 0,8$ ), zodat ook in dit opzicht deze groepen kunnen worden beschouwd als steekproeven uit dezelfde populatie. De verschillen tussen hondensera en mensensera zijn zeer duidelijk significant ( $\chi^2$ -toets,  $P \ll 0,001$ ), ondanks het relatief kleine aantal waarnemingen in de

\*) In het algemeen kan de  $\chi^2$ -toets beter niet worden gebruikt indien er verwachtingen kleiner dan 5 voorkomen. In dit geval echter is het verschil tussen waargenomen en verwachte frequenties zo klein dat de waarde van  $\chi^2$  er nauwelijks door wordt beïnvloed, zodat hier de toepassing van deze toets toch verantwoord is.



Figuur 1

Verhouding tussen de H.A.- en S.F.-titers bij 1092 mensensera waarvan beide reacties positief ( $\geq 32$ ) waren.

Abscis: aantal verdunningen, dat de H.A.-titer hoger, resp. lager is dan de S.F.-titer.  
 Boven de kolommen: aantal sera waarbij de op de abscis vermelde relatie is waargenomen.

groep van de hondensera. Vergeleken met de S.F.-titers zijn de H.A.-titers bij honden aanzienlijk lager dan bij mensen.

Figuur 1 geeft een exacter beeld van de wijze waarop de titers van de H.A.R. zich in kwantitatief opzicht verhouden tot die van de S.F.R. In deze figuur zijn de uitkomsten verwerkt van de 1092 mensensera waarvan zowel de S.F.R. als de H.A.R. positief ( $\geq 32$ ) waren. De getallen langs de horizontale as geven het aantal verdunningen weer dat de H.A.-titer lager, respectievelijk hoger, is dan de S.F.-titer. De getallen boven de kolommen corresponderen met het aantal sera waarbij de op de abscis vermelde relatie werd waargenomen.

Wanneer de toppen van deze kolommen door een vloeiende lijn met elkaar worden verbonden ontstaat een kromme die, vergeleken met de kromme bij een normale verdeling, iets te spits en vooral in het onderste gedeelte niet symmetrisch is. De afwijkingen blijken echter zo klein te zijn dat deze pseudo-normale verdeling toch op bevredigende wijze kan worden gekarakteriseerd door het gemiddelde en de standaarddeviatie. Waarschijnlijk zou de overeenkomst met een normale verdeling nog beter zijn wanneer de reacties met groter nauwkeurigheid worden uitgevoerd, onder andere door gebruik te maken van een tweede verdunningsreeks, waarmee de tussenliggende waarden van de titers kunnen worden bepaald.

Het gemiddelde is hier  $+2$  (berekende waarde  $+2,19$ ), de standaarddeviatie (S) bedraagt eveneens 2. Wanneer dus zowel de H.A.R. als de S.F.R. positief ( $\geq 32$ ) zijn zullen de titers van de H.A.R. gemiddeld twee verdunningen hoger zijn dan die van de S.F.R., met een standaarddeviatie van 2. Bij een geheel normale verdeling zou 67% van de H.A.-titers liggen in het gebied van 0 tot en met  $+4$  (= gemiddelde  $\pm$  S), terwijl 95% van deze titers zou liggen in het interval van  $-2$  tot en met  $+6$  (= gemiddelde  $\pm$  2 S). Tengevolge van de te grote spitsheid van de kromme bedragen deze percentages hier respectievelijk 80 en 97.

Het aantal hondensera met positieve H.A.R. en S.F.R. was te klein om een eventueel kwantitatief verband tussen de titers van deze reacties te kunnen nagaan.

## HOOFDSTUK V.

### HET VERLOOP VAN DE S.F.R., DE H.A.R. EN DE C.B.R. BIJ PATIENTEN

Bij een aantal patiënten kon het verloop van de serologische reacties gedurende enige tijd worden gevolgd. Voorzover de beschikbare hoeveelheid serum dit toeliet, werden alle van eenzelfde patiënt afkomstige serummonsters gelijktijdig onderzocht. Het allereerste beginstadium van de ziekte ontrok zich uiteraard aan de waarneming. De figuren 2a tot en met 2o geven een beeld van de resultaten van dit onderzoek.

Patiënt A (fig. 2a): een 23-jarige vrouw met afebrile lymphoglandulaire toxoplasmosis. Uit een geëxstirpeerde lymphklier werd toxoplasma geïsoleerd. Gedurende de eerste vijf maanden was de H.A.-titer iets lager dan de S.F.-titer. Daarna trad een sterke stijging op van de H.A.- en C.B.-titer, terwijl de titer van de S.F.R. op hetzelfde niveau bleef.

Patiënt B (fig. 2b): een twee dagen oude baby met hydrocephalus, microphthalmus en intracerebrale verkalkingen. Vier dagen na de geboorte werd uit het bloed toxoplasma geïsoleerd. Het eerste, twee dagen na de geboorte afgenomen, serummonster was negatief met de H.A.R. Het tweede monster, dat zeven dagen later werd afgenomen, had een H.A.-titer van 512. De mogelijke oorzaken van dit negatieve resultaat van de H.A.R. worden in hoofdstuk VII besproken. Ook bij dit patiëntje lag de H.A.-titer de eerste maanden op een lager niveau dan de S.F.-titer, om daarna te stijgen. De toxoplasmareacties van de moeder waren: H.A.R. 4096, S.F.R. 4096, C.B.R. 16.

Patiënt C (fig. 2c): een 8-jarig meisje met verworven toxoplasmosis. De diagnose werd bevestigd door isolatie van de parasiet uit een oksellymphklier. Ook hier zijn de H.A.-titers de eerste maanden iets lager dan de S.F.-titers. Daarna is het omgekeerde het geval.

Patiënt D (fig. 2d): een 6-jarige jongen met hepatitis en een groot lymphoom in de hals waaruit toxoplasma werd geïsoleerd. Bij deze patiënt waren de titers van de H.A.R. gedurende de gehele waarnemingsperiode aanzienlijk hoger dan die van de S.F.R.

Patiënt E (fig. 2e): een 10-jarige jongen met verworven glandulaire toxoplasmosis. Uit een geëxstirpeerde lymphklier werd toxoplasma gekweekt. Opmerkelijk zijn de lage C.B.- en H.A.-titers die bij deze jongen werden gevonden. Deze beide reacties waren na respectievelijk 7 en 14 maanden negatief, terwijl de S.F.R. nog steeds positief was.

Patiënt F (fig. 2f): een 8-jarig meisje met tuberculose en toxoplasmosis

acquisita. De parasiet werd uit een lymfklier geïsoleerd. De stijging van de H.A.-titer in de eerste drie weken gaat vergezeld van een daling van de S.F.- en C.B.-titers.

Patiënt G (fig. 2g): een 9 maanden oude baby met congenitale toxoplasmosis. In het linker oog bevond zich een chorioretinitis-litteken. In oksels en liezen waren kleine lymfomen. Er werd geen poging gedaan de parasiet te isoleren. De H.A.-, S.F.- en C.B.-titers van het kind lagen gedurende meer dan twee jaar op hetzelfde niveau. De toxoplasma-reacties van de moeder waren: H.A.R. 512, S.F.R. 1024, C.B.R. 16.

Patiënt H (fig. 2h): een 7-jarige jongen met verworven glandulaire toxoplasmosis. Lymfklierexstirpatie werd niet verricht. Vooral gedurende het eerste jaar waren de H.A.-titers bij dit patiëntje hoger dan de S.F.-titers.

Patiënt I (fig. 2i): een 15 maanden oud meisje dat vanaf de zesde week na de geboorte aan epileptiforme aanvallen leed. Op de röntgenfoto werden intracerebrale kalkhaarden gevonden. De sterk positieve toxoplasma-reacties van de moeder (H.A.R. 8192, S.F.R. 1024, C.B.R. 16) maakten de diagnose congenitale toxoplasmosis waarschijnlijk.

Patiënt J (fig. 2j): een 7-jarige jongen met vergrote lever, hepatitis en multipale lymfomen. De reactie van Paul en Bunnell was negatief. Drie maanden na het eerste onderzoek werd een lymfklier verwijderd. Hieruit werd echter geen toxoplasma gekweekt. In de eerste drie maanden trad een sterke stijging van de H.A.- en C.B.-titers op, terwijl de S.F.-titer constant bleef.

Patiënt K (fig. 2k): een 8-jarig meisje dat voor de tweede maal in korte tijd een hepatitis doormaakte. Lever en milt waren niet vergroot. De reactie van Paul en Bunnell was negatief. De bij het eerste onderzoek gevonden S.F.-titer van 128, samen met een negatieve C.B.R., wees niet duidelijk op een actief proces. Drie maanden later echter werd een S.F.-titer van 1024 en een C.B.-titer van 4 gevonden. De C.B.R. was na korte tijd weer negatief. De H.A.-titers bleven gedurende de gehele waarnemingsperiode op eenzelfde niveau.

Patiënt L (fig. 2l): een 4-jarig meisje met verworven glandulaire toxoplasmosis. Een poging tot isolatie van de parasiet uit een lymfklier bleef zonder resultaat.

Patiënt M (fig. 2m): een 10-jarige jongen die aan convulsies leed. In beide oksels werden kleine lymfomen gevonden. In de eerste maanden was er een sterke stijging van H.A.-titer die niet werd weerspiegeld in het verloop van de beide andere reacties. Na ongeveer negen maanden was de C.B.R. negatief.

Patiënt N (fig. 2n): een 10-jarige jongen met koorts, lymfomen en vergrote lever en milt. Bij het eerste onderzoek waren zowel de toxoplasma-reacties als de reactie van Paul en Bunnell sterk positief. De titer van laatstgenoemde reactie bedroeg, na absorptie van het serum met cavianier-



cellen, 1024. Twee en een halve maand later was deze reactie negatief. Gedurende deze periode trad ook een sterke daling van de S.F.-titer op die niet werd gevolgd door de H.A.R. Het tijdsverloop van bijna negen maanden tussen het derde en vierde serumonderzoek is eigenlijk te groot om een betrouwbaar beeld van het verloop van de titers te geven.

Patiënt O (fig. 2o): een 12-jarige jongen met algemene malaise en koorts. Gedurende meer dan twee jaar werden bij deze patiënt constante, vrij lage S.F.-titers gevonden. Ook de titers van de beide andere reacties handhaafden zich gedurende deze periode op hetzelfde niveau.

Alle patiënten bij wie lymphklierexstirpatie werd verricht werden, onmiddellijk in aansluiting aan deze ingreep, een maand lang met sulfa behandeld. Een duidelijke invloed van deze therapie op het verloop van de serologische reacties werd niet waargenomen. Patiëntje B werd met sulfa, daraprim en prednison behandeld.

In de meeste gevallen werden met de H.A.R. hogere titers gevonden dan met de S.F.R. Soms echter was het omgekeerde het geval. Ook bij eenzelfde patiënt werd enkele malen een wijziging in de onderlinge verhouding van deze titers in de loop van de ziekte waargenomen.

Door dit onderzoek kon geen beeld worden verkregen van het titerverloop van de verschillende reacties in het allereerste begin van de ziekte. Dit zal bij de mens in het algemeen slechts mogelijk zijn in gevallen van laboratoriuminfecties, die echter zelden voorkomen. Met uitzondering van patiënt E was bij alle patiënten de periode waarover het onderzoek zich uitstrekke te kort om een negatief worden van de reacties te kunnen waarnemen.

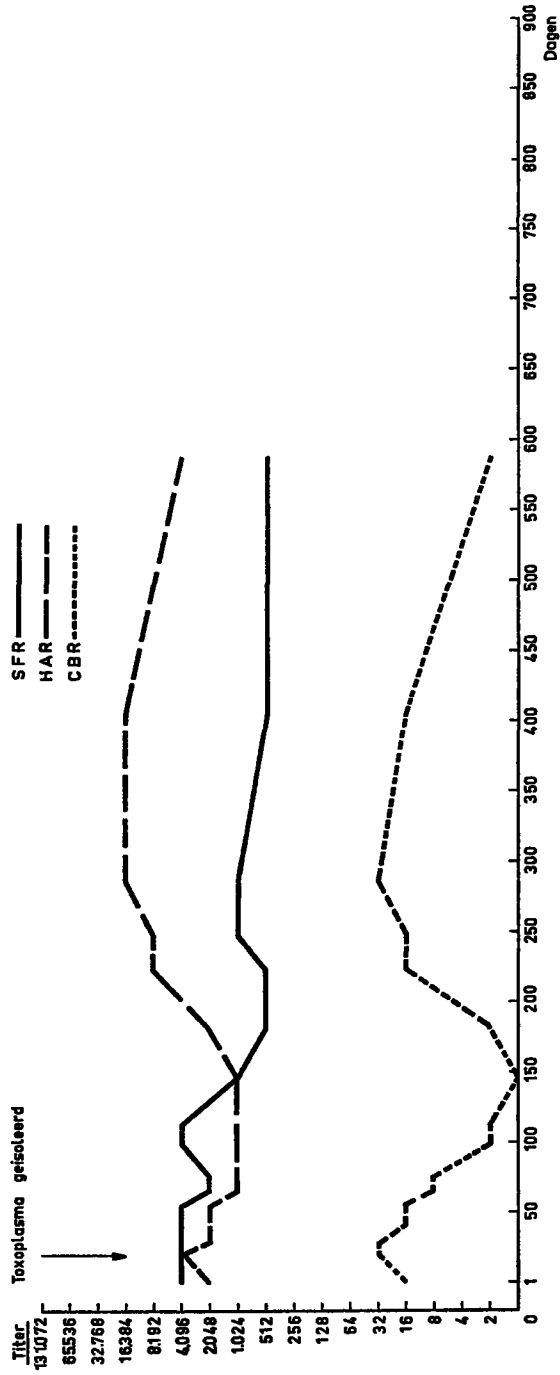


Fig. 2a. Patient A:  
23-jarige vrouw met afebrile lymphoglandulaire toxoplasmosis.

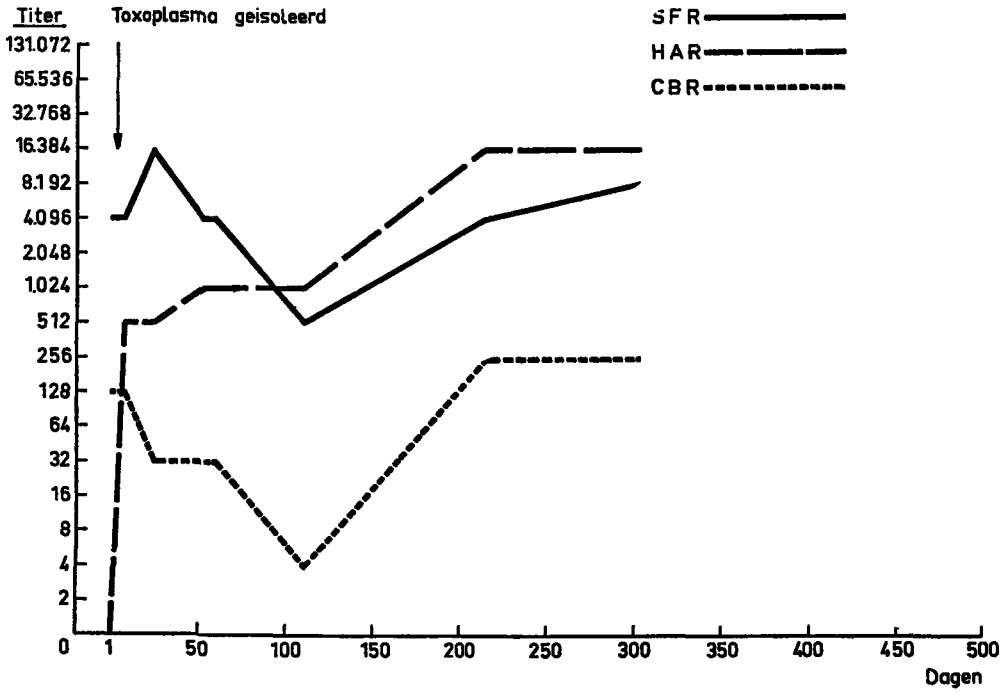


Fig. 2b. Patiënt B:  
 2 dagen oude baby met congenitale toxoplasmosis  
 (hydrocephalus, microphthalmus, intracerebrale verkalkingen).



Fig. 2c. Patiënt C:  
8-jarig meisje met verworven toxoplasmosis.

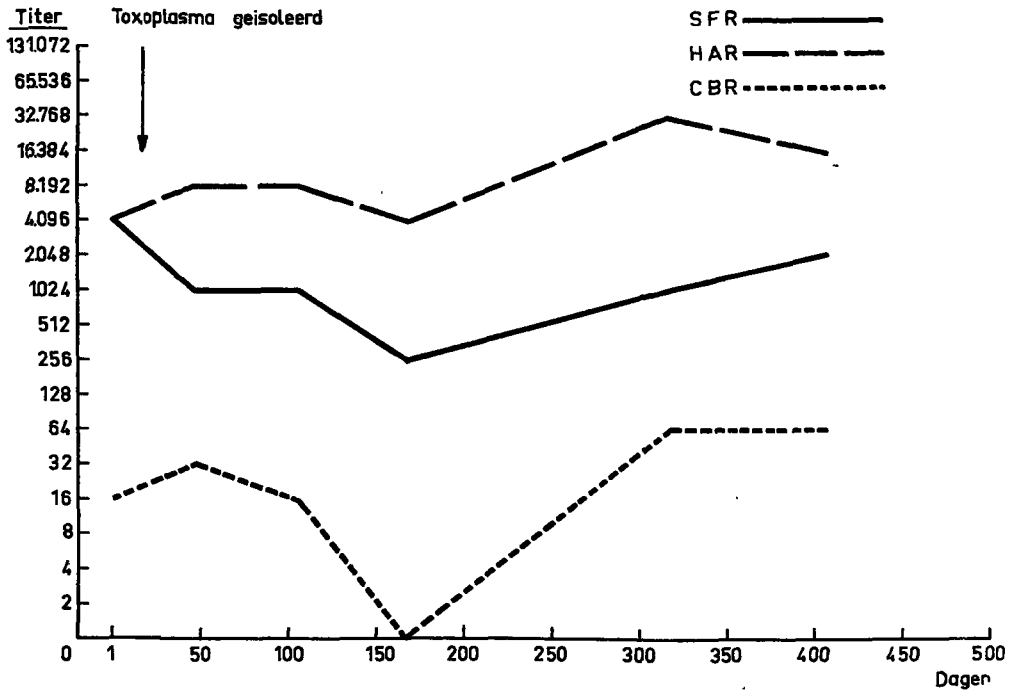


Fig. 2d. Patiënt D:  
6-jarige jongen met verworven toxoplasmosis.

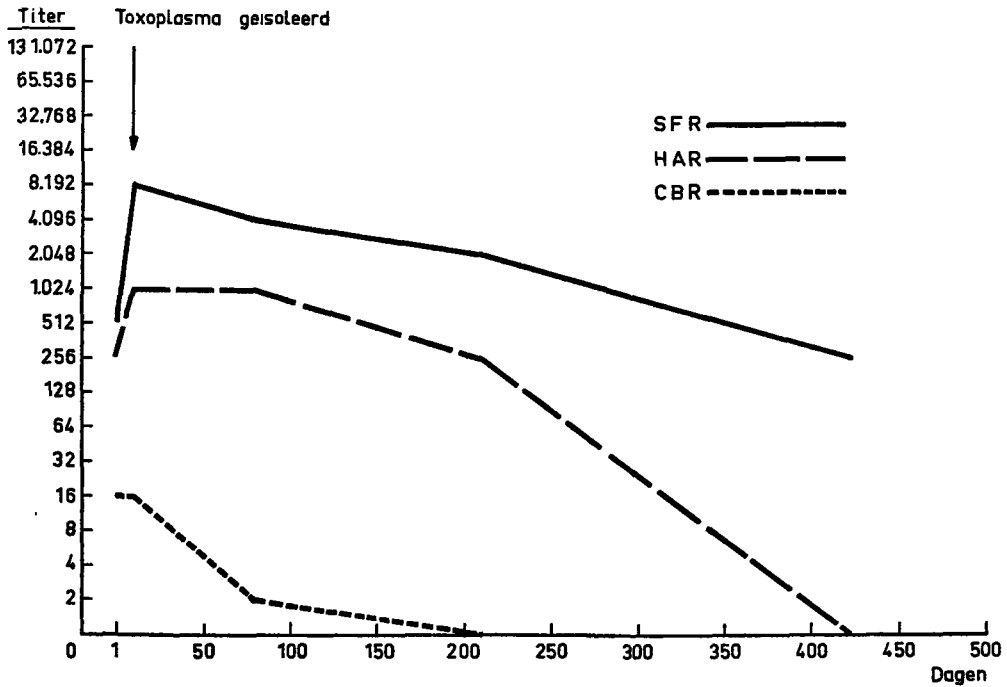


Fig. 2e. Patiënt E:  
10-jarige jongen met verworven toxoplasmosis.

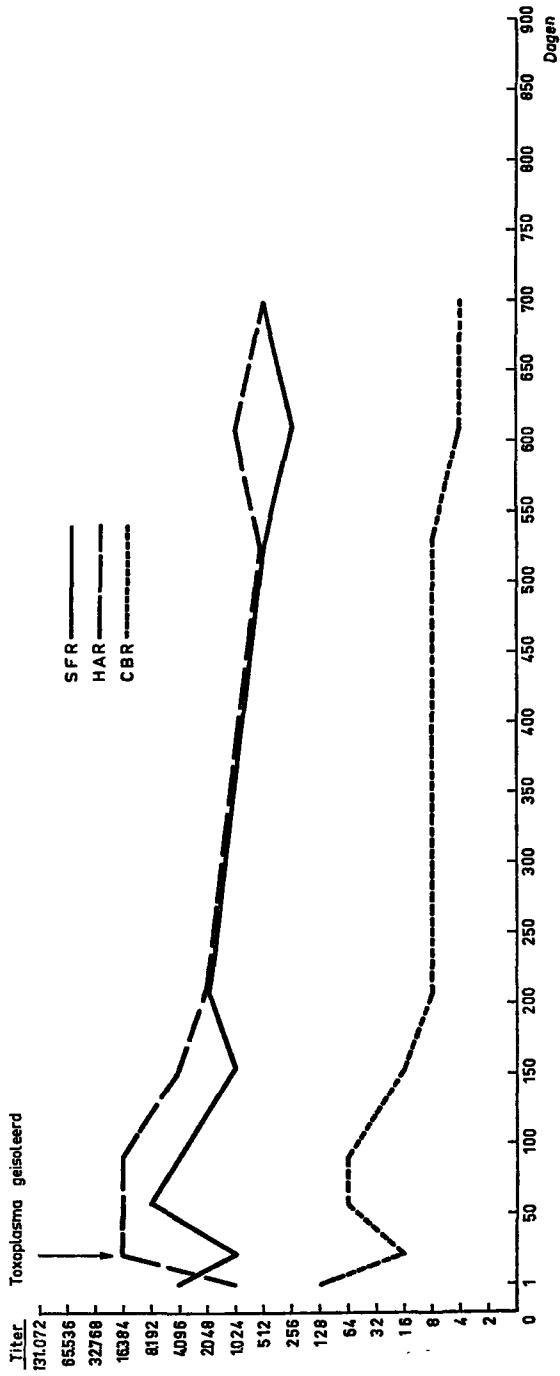


Fig. 2f. Patiënt F:  
8-jarig meisje met tuberculose en verworven toxoplasmosis.

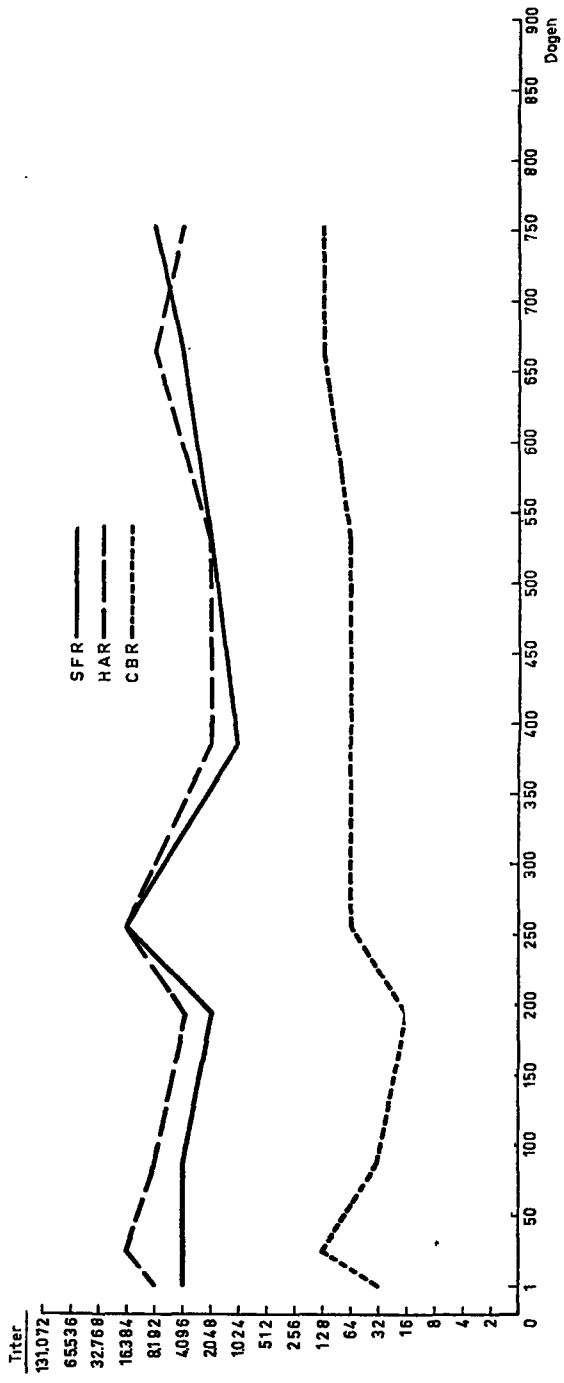


Fig. 2g. Patiënt G:  
 9 maanden oude baby met congenitale toxoplasmosis (chorioretinitis-litteken O.S.).

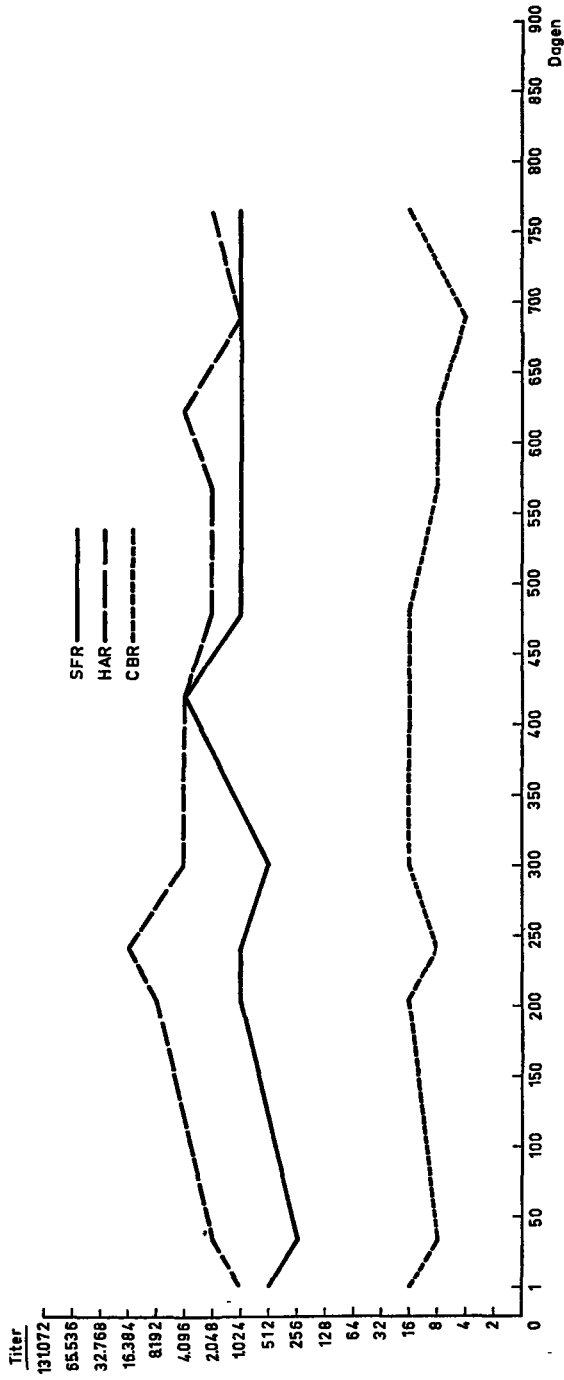


Fig. 2h. Patient H:  
7-jarige jongen met verworven glandulaire toxoplasmosis.



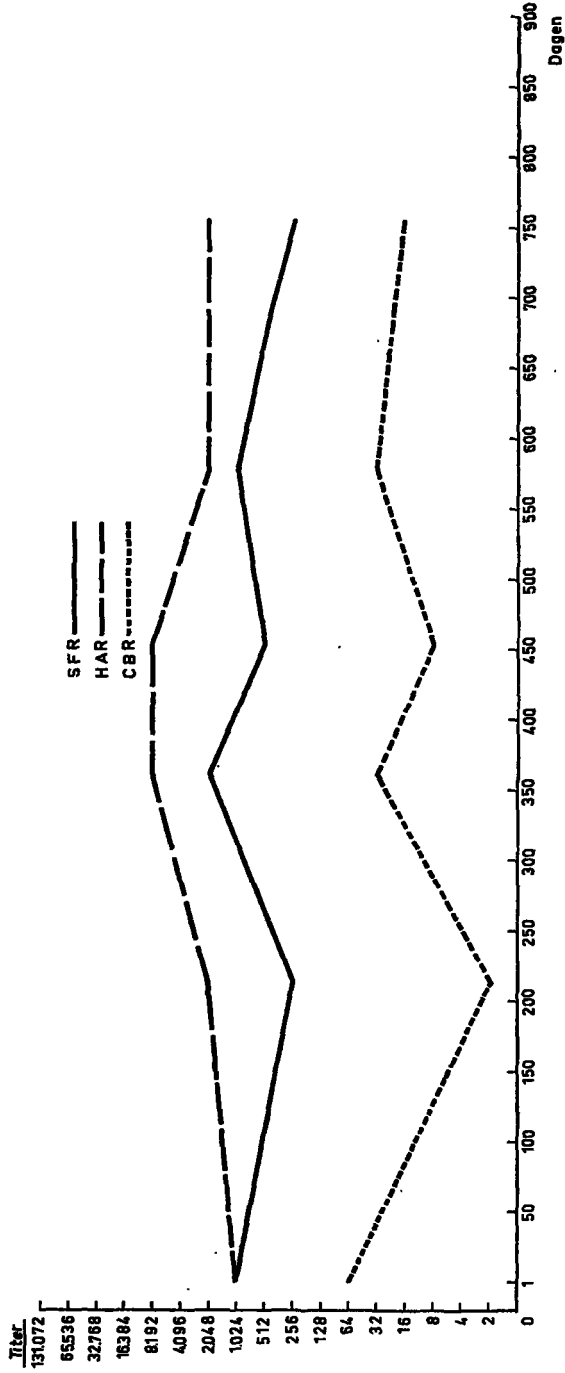


Fig. 2i. Patiënt I:  
 15 maanden oud meisje. Intracerebrale kalkhaarden.  
 Vanaf 6e week na de geboorte epileptiforme aanvallen.

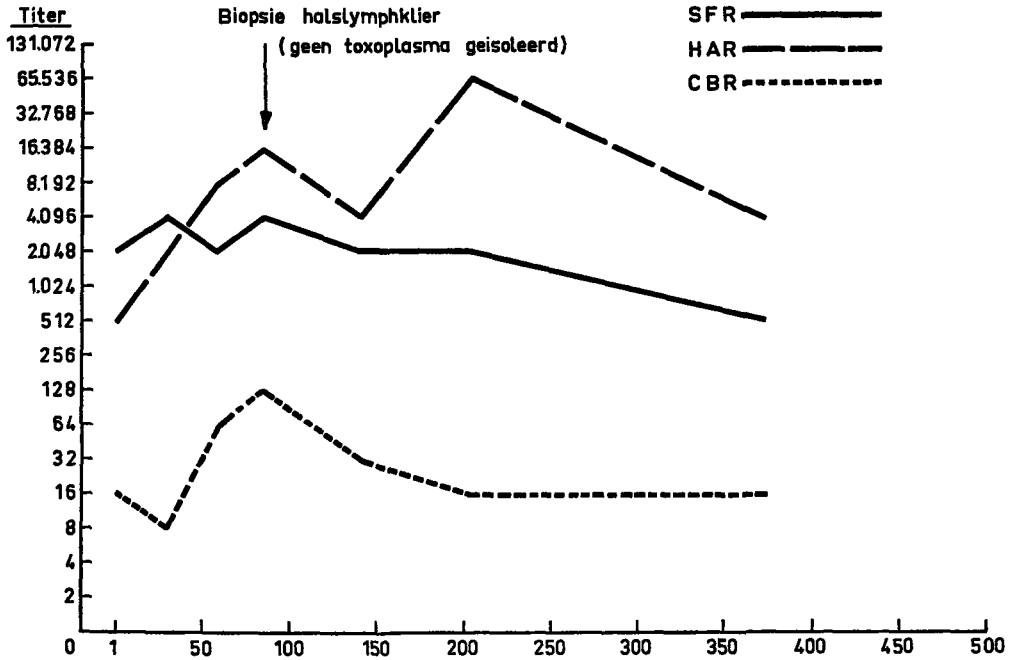


Fig. 2j. Patiënt J:  
7-jarige jongen. Hepatitis, vergrote lever, multipale lymfomen.  
Reactie van Paul en Bunnell negatief.

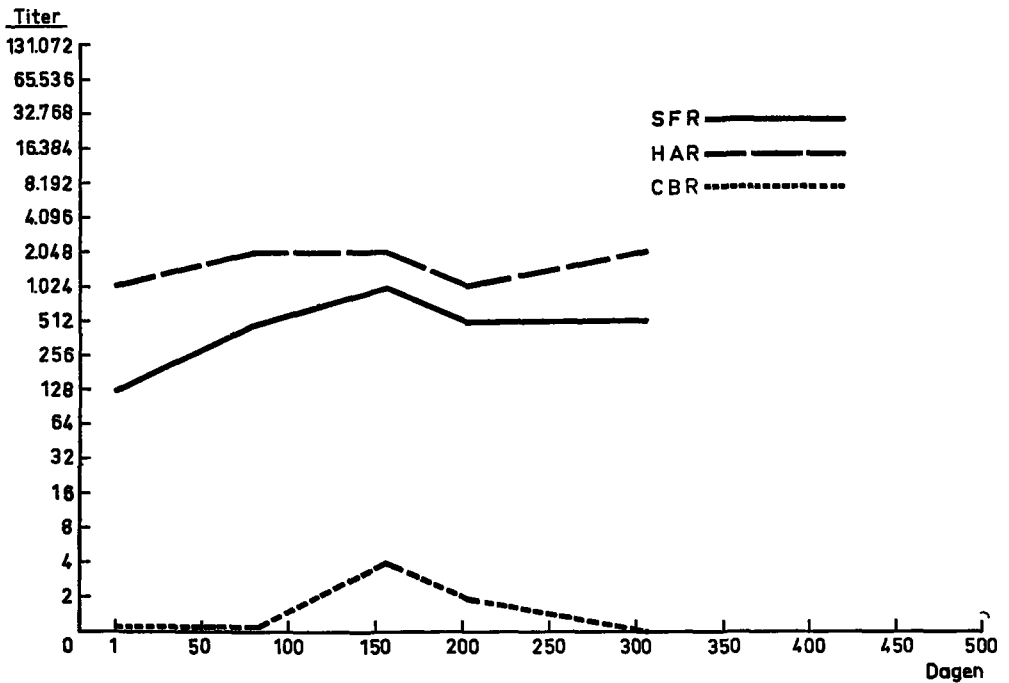


Fig. 2k. Patiënt K:  
8-jarig meisje. Hepatitis recidief. Reactie van Paul en Bunnell negatief.

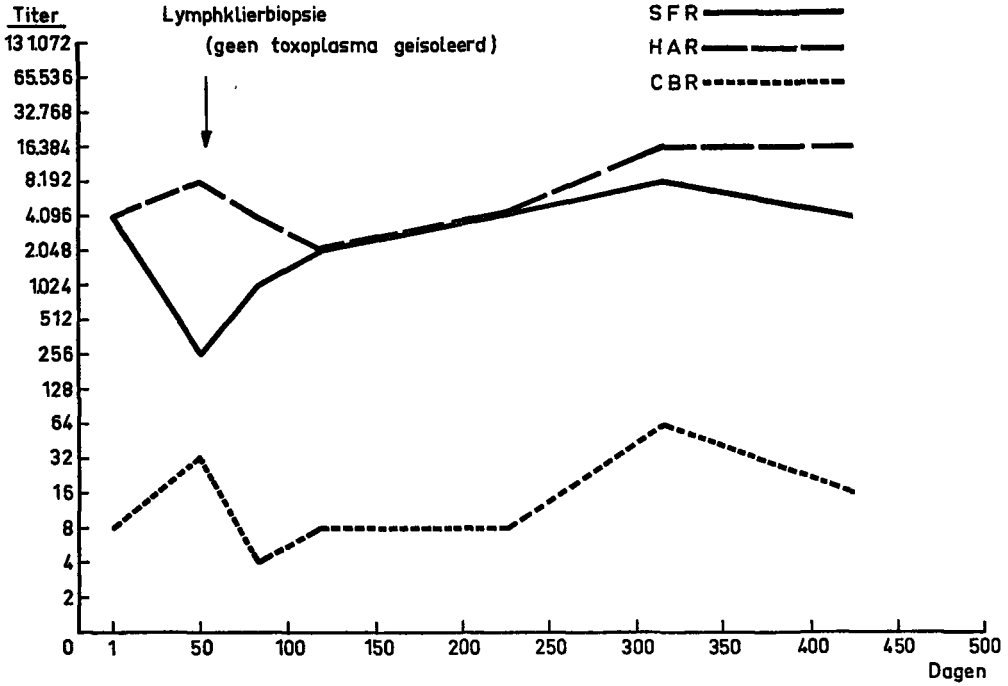


Fig. 2 l. Patiënt L:  
4-jarig meisje met verworven glandulaire toxoplasmosis.

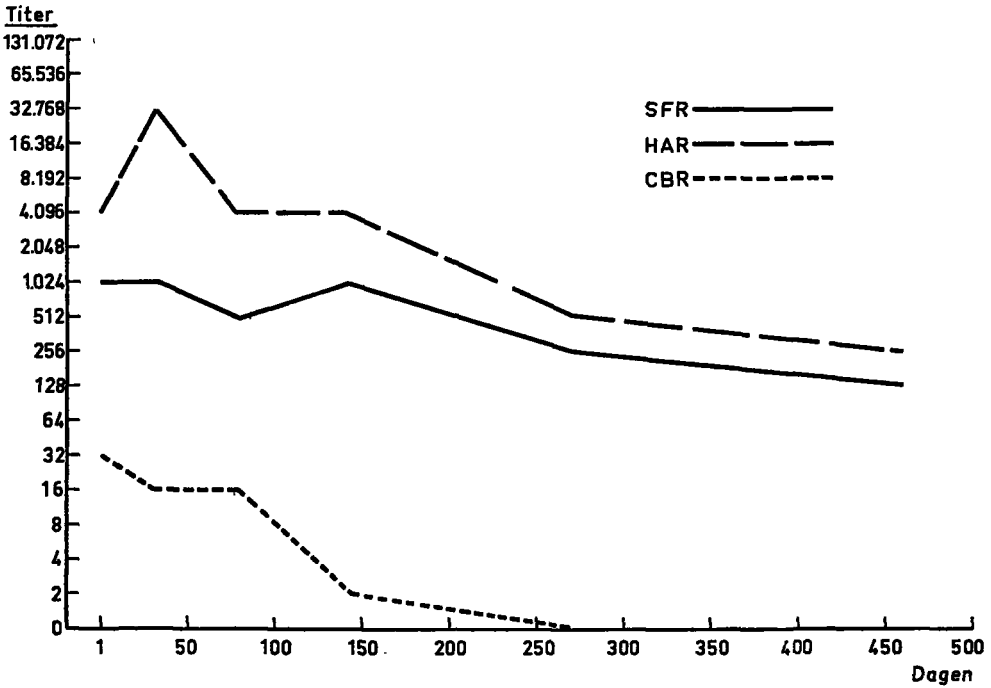


Fig. 2 m. Patiënt M:  
10-jarige jongen. Convulsies. Lymphomen in oksels.

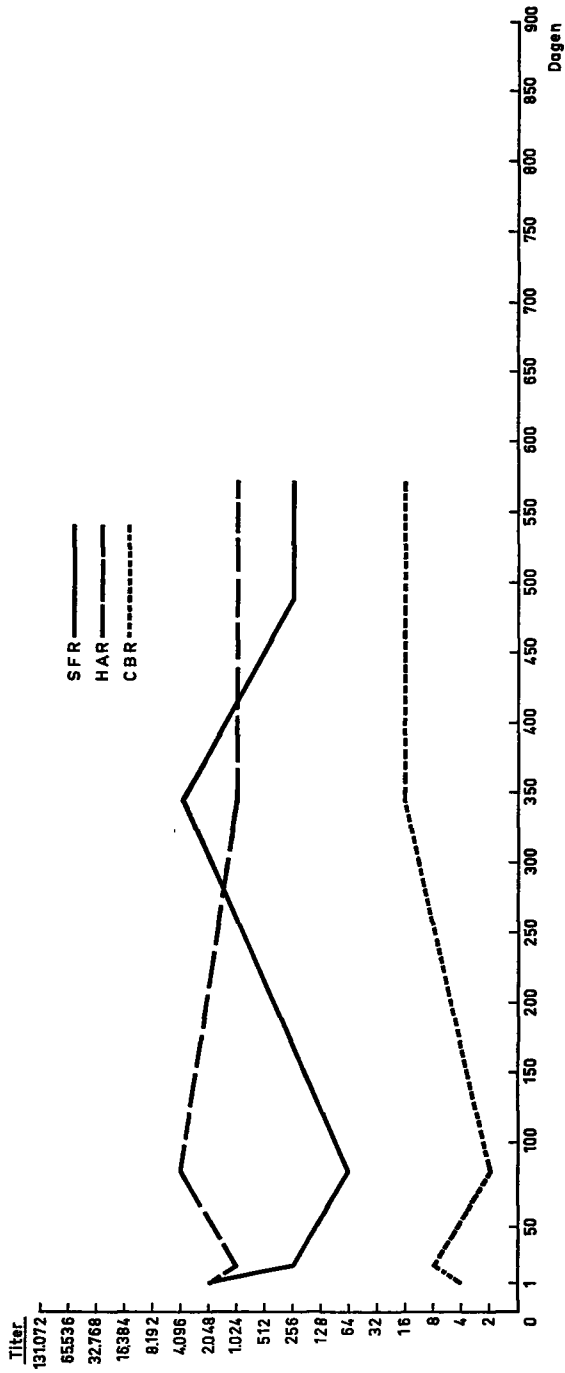


Fig. 2n. Patiënt N:  
 10-jarige jongen. Koorts, lymphomen, vergrote lever en milt.  
 Reactie van Paul en Bunnell positief.

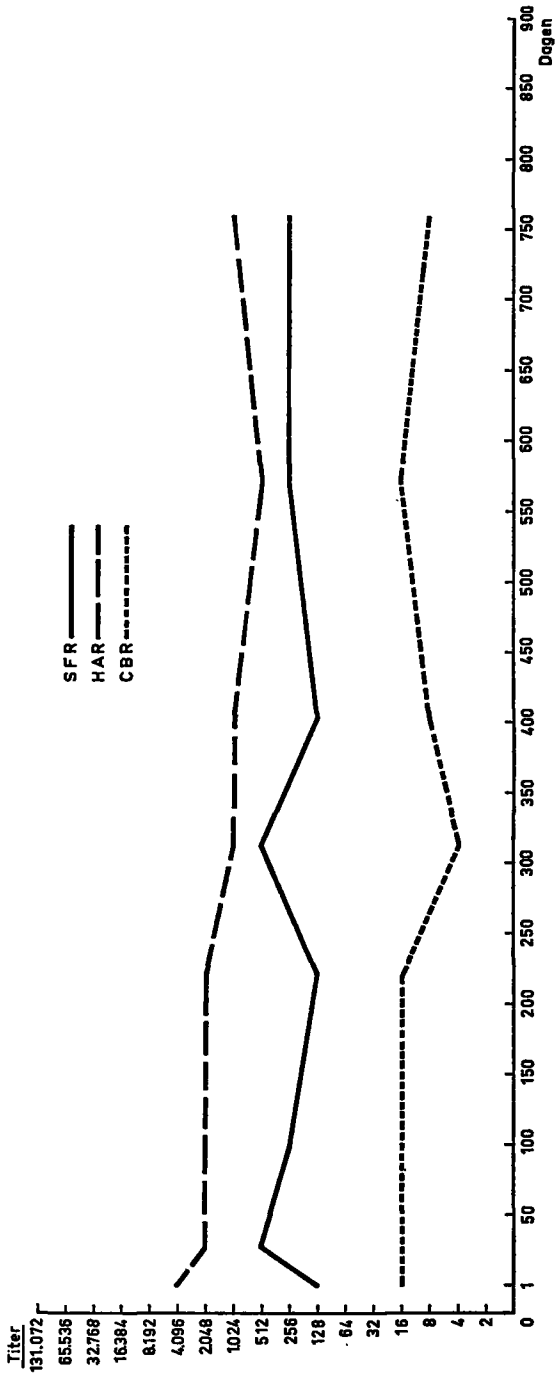


Fig. 2 o. Patiënt O:  
12-jarige jongen met algemene malaise en koorts.

## HOOFDSTUK VI.

### DE S.F.R., H.A.R. en C.B.R. BIJ EXPERIMENTEEL GEINFECTEERDE KONIJNEN

Om een indruk te krijgen van het gedrag van de verschillende reacties gedurende het beginstadium van een infectie werd een aantal, ongeveer zes maanden oude, konijnen experimenteel met toxoplasma besmet. De serologische reacties van deze dieren waren bij de aanvang van het experiment alle negatief (H.A.R. en S.F.R.  $< 4$ , C.B.R.  $< 2$ ).

Voor het infecteren werd gebruik gemaakt van de bij muizen voortgekweekte toxoplasmastam Deelen, nadat eerst een vijftal ei-passages was verricht om de mogelijkheid van antistofvorming tegen muizeïwitten uit te schakelen. De dieren werden subcutaan ingespoten met een suspensie die ongeveer 1000 parasieten per ml bevatte. Zes konijnen kregen een dosis van 0,2 ml, twee andere konijnen een dosis van 1 ml. Als controle werden twee dieren ingespoten met een suspensie van chorioallantoïsvliezen van 15 dagen bebroede kippeïeren.

Gedurende de eerste zes weken na de besmetting werd om de andere dag een serummonster afgenomen. Daarna geschiedde dit afnemen met steeds groter tussenpozen. Alle sera werden bewaard bij  $-20^{\circ}$  C en na beëindiging van het experiment werden alle van eenzelfde konijn afkomstige monsters gelijktijdig onderzocht. Daar voor de H.A.R. menserythrocyten werden gebruikt, werden alle sera met deze erythrocyten geabsorbeerd.

Gedurende de gehele waarnemingsperiode bleven de toxoplasmareacties van de controledieren negatief. Beide konijnen die met 1 ml parasietensuspensie waren besmet succombeerden op de veertiende dag na de infectie. Uit het door hartpunctie verkregen bloed van deze dieren werd toxoplasma geïsoleerd. Zowel de S.F.R. als de C.B.R. waren reeds na 7 dagen positief. Op de veertiende dag waren de titers van deze reacties gestegen tot 4096 respectievelijk 512. De H.A.R. bleef gedurende deze gehele periode negatief. Op de mogelijke oorzaken van deze negatieve resultaten van de H.A.R. wordt in hoofdstuk VII ingegaan.

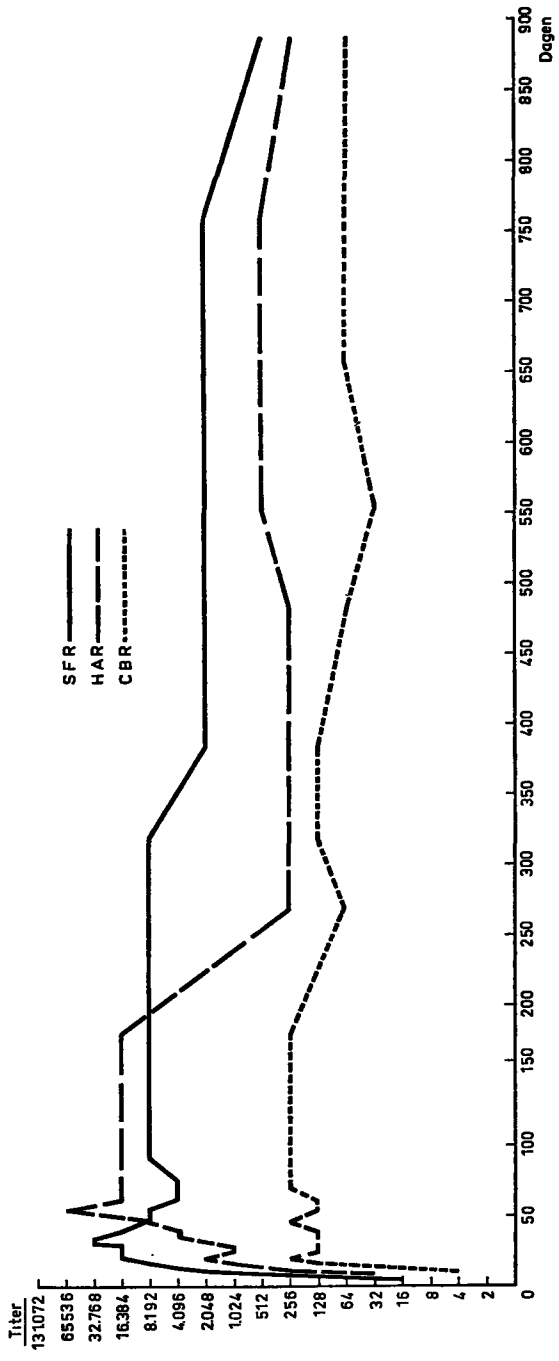
Het verloop van de reacties bij de zes konijnen die met 0,2 ml parasietensuspensie waren ingespoten wordt weergegeven in de figuren 3a t/m 3f. In grote lijnen blijkt bij al deze dieren hetzelfde beeld te worden gevonden. Vooral in de eerste weken na de infectie is er een zeer duidelijk verschil in de wijze waarop de S.F.- en de H.A.-titers verlopen. De S.F.R. wordt reeds na zeven dagen positief en bereikt tussen de 20e en 30e dag

een maximum met titers die variëren van 16.000 tot 65.000. De H.A.R. wordt omstreeks de tiende dag positief. De titerstijging vindt bij deze reactie veel geleidelijker plaats dan bij de S.F.R. De hoogste titers worden na 7—10 weken bereikt, in één geval zelfs pas na 20 weken (konijn 1114, fig. 3f). Verder lopen de titers van beide reacties grotendeels parallel. In de meeste gevallen ligt de S.F.-titer op een iets hoger niveau dan de H.A.-titer. Bij konijn 1114 is dit echter juist omgekeerd.

De C.B.R. wordt eveneens omstreeks de tiende dag positief en ook bij deze reactie treedt er een snelle titerstijging op, zodat in de meeste gevallen reeds in de vierde ziekte-week een maximum wordt bereikt.

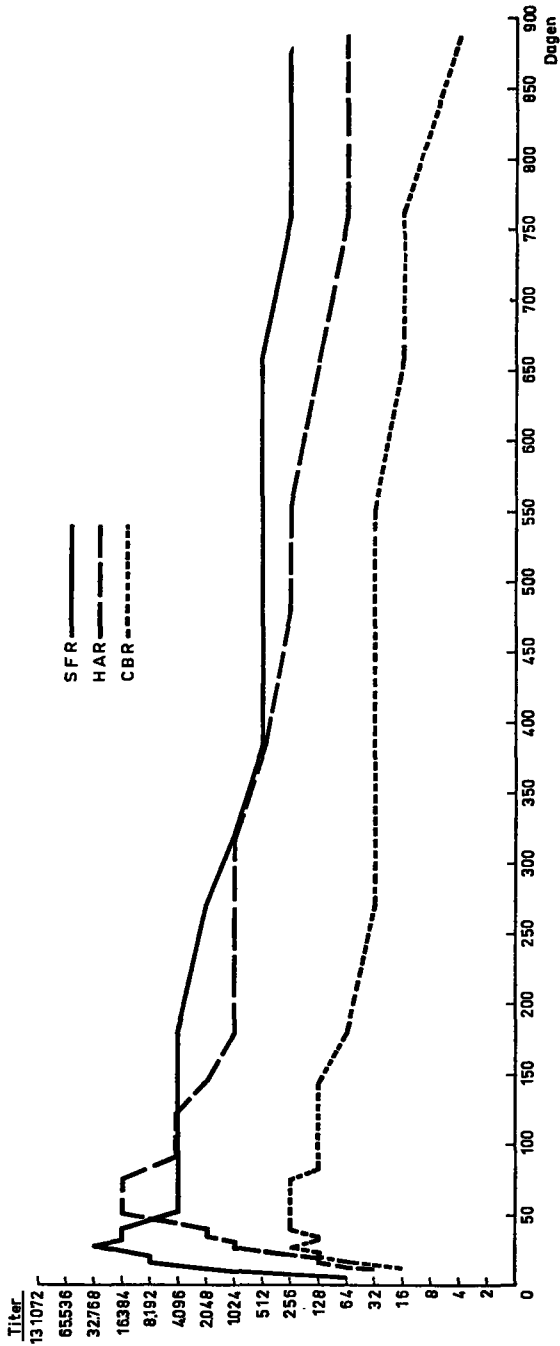
Door de relatief grote hoeveelheid parasieten waarmee de konijnen werden ingespoten ontstond reeds direct in het begin van de infectie een sterke antigene prikkel. Mogelijk is deze omstandigheid verantwoordelijk voor het zeer snel positief worden van de reacties.

In hoeverre het verloop van een experimentele infectie bij konijnen een indruk kan geven van het verloop van een natuurlijke infectie bij de mens kan uiteraard niet met zekerheid worden gezegd. In de latere stadia van de ziekte, die ook bij de mens kunnen worden waargenomen, blijkt het gedrag van de S.F.R. en de H.A.R. bij de mens en bij het konijn ongeveer gelijk te zijn. Het lijkt daarom niet onmogelijk dat ook in het beginstadium van de ziekte deze reacties bij mensen en konijnen op gelijke wijze verlopen.

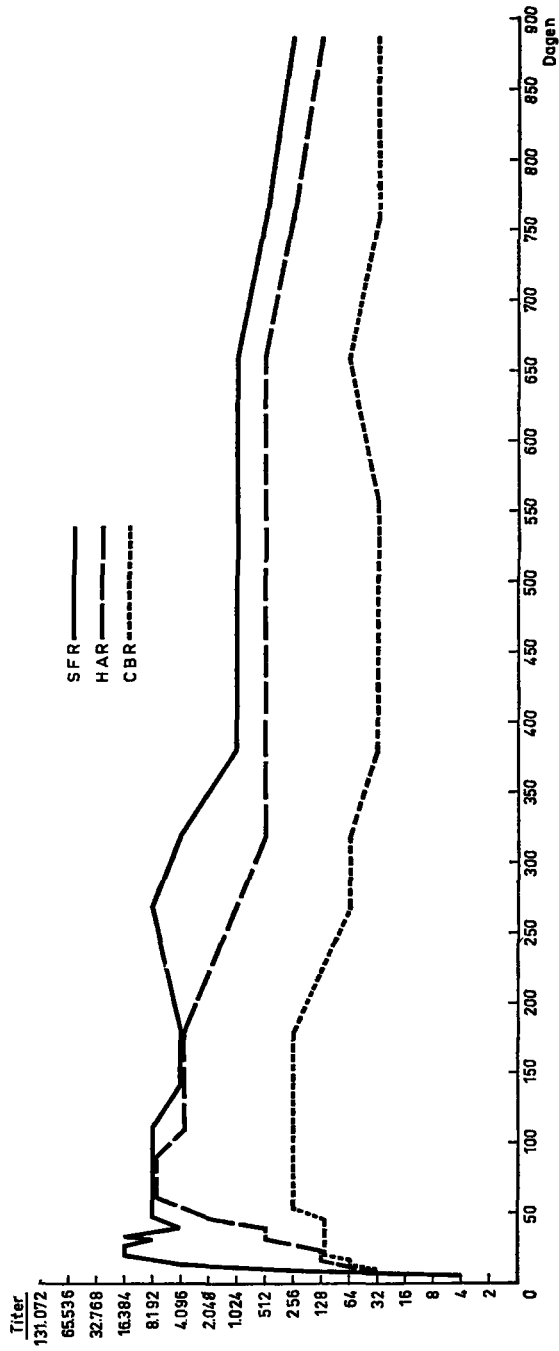


Figur 3a Konjin 0100

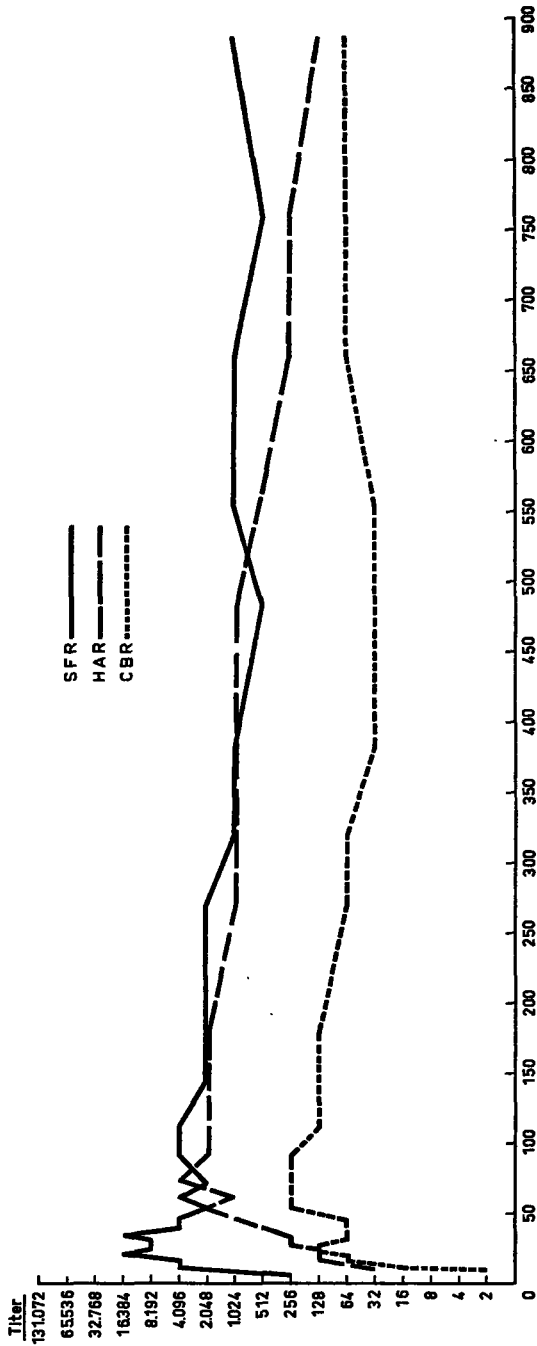




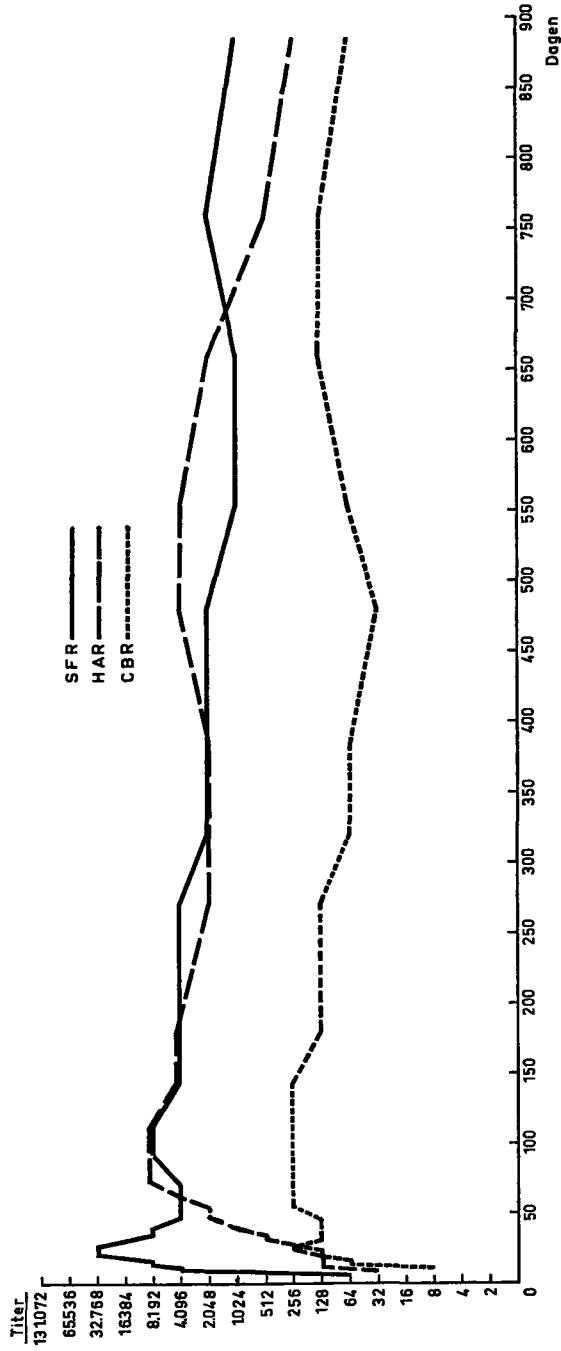
Figuur 3b Konijn 1104



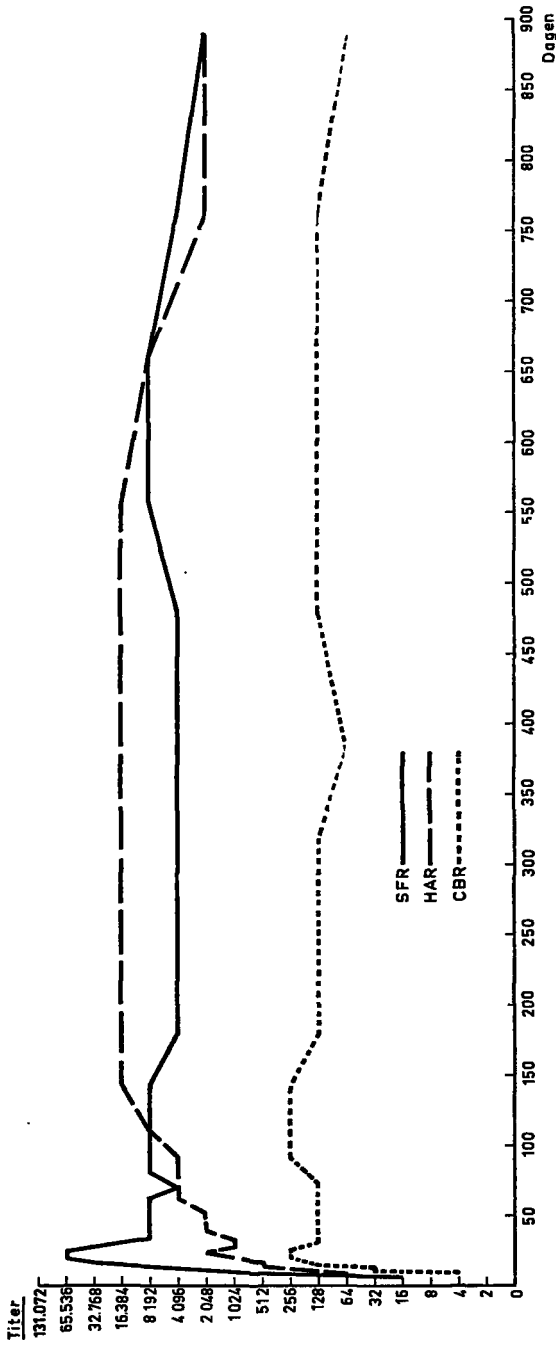
Figuur 3c Konijn 1105



Figuur 3d Konijn 1106



Figuur 3e Konijn 1110



Figuur 3f Konijn 1114

Fig. 3a t/m 3f: het verloop van de titers van de S.F.R., de H.A.R. en de C.B.R. bij experimenteel met toxoplasma geïnfecteerde konijnen.

## HOOFDSTUK VII.

### EXPERIMENTEEL ONDERZOEK

In de loop van het onderzoek deden zich enkele problemen voor. Getracht werd hiervoor een verklaring te vinden. De proefnemingen die daartoe werden verricht worden in dit hoofdstuk beschreven.

Bij het in het voorgaande beschreven onderzoek werd een positieve H.A.R. als specifiek beschouwd indien ook de S.F.R. positief was. Om na te gaan in hoeverre deze veronderstelling inderdaad gerechtvaardigd was, werden honderd willekeurig gekozen sera waarvan zowel de S.F.R. als de H.A.R. positief waren onderzocht met de in hoofdstuk III beschreven remmingsreactie. Bij al deze sera werd in de eerste reeks een titerdaling van vijf of zes verdunningen waargenomen, terwijl de reactie in de beide controlereeksen niet beïnvloed werd. Hoewel hiermede niet bewezen is dat een positieve H.A.R. niet door andere antigenen veroorzaakt zou kunnen worden, pleit deze uitkomst toch wel voor de specificiteit van de reactie bij de onderzochte sera.

Indien bij een steekproef van honderd exemplaren in 100% van de gevallen dezelfde uitkomst wordt gevonden, kan met een betrouwbaarheid van 95% worden aangenomen dat bij ten hoogste 3,6% van de totale populatie het onderzoek eventueel een andere uitkomst zou kunnen opleveren. (Zie Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabelle, Basel 1960.)

Uit het bovengenoemde resultaat van de remmingsproef bij honderd sera kan dus niet met absolute zekerheid geconcludeerd worden dat in alle gevallen waarin een positieve H.A.R. gecombineerd met een positieve S.F.R. wordt gevonden, eerstgenoemde reactie specifiek zal zijn. Op grond van praktische overwegingen werd er evenwel van afgezien alle sera op deze wijze te onderzoeken.

Het dikwijls totaal verschillende verloop van de H.A.- en S.F.-titers deed het vermoeden rijzen dat de antistoffen die met de H.A.R. worden aangetoond niet identiek zijn met de cytoplasma veranderende antistoffen van de S.F.R. Om de juistheid van deze veronderstelling na te gaan werd de volgende proef uitgevoerd. Van een aantal sera met positieve H.A.R., S.F.R. en C.B.R. werd een gedeelte van elk serum geabsorbeerd met een gelijk volumen erythrocyten („packed cells”) die gesensibiliseerd waren met toxoplasma-antigeen. Een ander deel van het serum werd geabsorbeerd met erythrocyten die met controle-antigeen waren gesensibiliseerd.

Daarna werden het niet geabsorbeerde gedeelte en de beide geabsorbeerde porties gelijktijdig onderzocht. De resultaten van deze proef bij een drietal sera worden weergegeven in tabel VI.

	serum 2863			serum 4871			serum 6256		
	H.A.R.	S.F.R.	C.B.R.	H.A.R.	S.F.R.	C.B.R.	H.A.R.	S.F.R.	C.B.R.
Voor absorptie	256	256	32	512	1024	64	4096	2048	64
Na absorptie met toxopl.-antigeen erythrocyten	<16	256	a.c.	<16	1024	a.c.	128	2048	a.c.
Na absorptie met contr.-antigeen erythrocyten	256	256	a.c.	256	1024	a.c.	2048	2048	32

TABEL VI.

Resultaten van absorptieproeven met gesensibiliseerde erythrocyten.

In totaal werden op deze wijze twaalf willekeurige sera onderzocht. Bij al deze sera werden gelijksoortige uitkomsten verkregen. Het blijkt, dat de titer van de S.F.R. door het absorberen niet wordt beïnvloed. De H.A.-titer daarentegen is duidelijk lager geworden na absorptie van het serum met toxoplasma-antigeen-erythrocyten. De invloed van het absorberen op de complementbindende antistoffen kon niet worden beoordeeld, daar alle sera na absorptie met toxoplasma-antigeen anticomplementair waren geworden. Ook na absorptie met controle-antigeen trad dit verschijnsel bij het merendeel der sera op. Na het absorberen hadden de sera een licht-bruine kleur gekregen.

De uitkomsten van deze proef geven dus grond aan de veronderstelling dat de antistoffen die met de H.A.R. worden aangetoond niet dezelfde zijn als die welke een rol spelen bij de S.F.R.

Bij het in hoofdstuk IV beschreven onderzoek werden enkele mensenen hondensera gevonden waarbij de H.A.R. negatief, de S.F.R. en de C.B.R. echter positief waren. Bij twee patiënten, allebei pasgeborenen met ernstige verschijnselen van congenitale toxoplasmosis, werd de diagnose bevestigd door het kweken van de parasiet uit het bloed. Bij één van deze patiëntjes (zie hoofdstuk V, patient B) was het tweede serummonster wel positief met de H.A.R. Van het andere patiëntje werd slechts éénmaal serum ontvangen, daar dit kind na enkele dagen overleed. Ook bij de twee konijnen die met 1 ml toxoplasma-suspensie waren ingespoten (zie hoofdstuk VI) werd een negatieve H.A.R. gevonden, terwijl de S.F.R. en de C.B.R. positief waren. Bij deze dieren werd de parasiet eveneens uit het bloed geïsoleerd. Al deze sera, en ook enkele andere waarvan alleen

de S.F.R. positief was, werden nader onderzocht teneinde een verklaring te vinden voor het negatieve resultaat van de H.A.R.

Als oorzaak van het uitblijven van een positieve reactie komen de volgende mogelijkheden in aanmerking.

1. Er zijn geen antistoffen gevormd, of slechts in een zo geringe concentratie dat zij met de gebruikte techniek niet aantoonbaar zijn.

2. Er zijn wel antistoffen gevormd, doch in het serum komen bovendien remmende stoffen voor waardoor het niet gelukt deze antistoffen aan te tonen. Deze remming kan zowel specifiek als aspecifiek zijn.

3. Het serum bevat alleen incomplete antistoffen die met de gewone H.A.R. niet kunnen worden opgespoord. Ook in dit geval kan het serum remmende stoffen bevatten.

Het aantonen van remmende stoffen geschiedde door na te gaan of de H.A.R. van een bekend positief serum geremd werd door het te onderzoeken serummonster. Om de reactie zo gevoelig mogelijk te maken werd dit positieve serum gebruikt in een concentratie die juist voldoende was om agglutinatie (2+ patroon) te veroorzaken. Deze optimale concentratie werd verkregen door een serum waarvan de H.A.-titer 1024 bedroeg 500 maal te verdunnen met een physiologische zoutoplossing met 1% normaal konijneserum. Van de te onderzoeken sera werden tweevoudige verdunningsreeksen gemaakt in hoeveelheden van 0,25 ml. Aan elk buisje werd 0,25 ml verdund positief serum en, een half uur later, één druppel erythrocytensuspensie toegevoegd. Een verdunningsreeks van toxoplasma-antigeen deed dienst als positieve controle. Enkele sera waarvan de toxoplasma-reacties negatief waren werden als negatieve controles gebruikt. De reciproke waarde van de hoogste serumverdunding waarbij de agglutinatie volledig werd onderdrukt werd als haemagglutinatieremmingstiter beschouwd.

Van de sera die remming veroorzaakten werd bovendien nagegaan of zij in staat waren ook andere haemagglutinatiereacties te beïnvloeden. Hiervoor werden de volgende sera gebruikt.

1. Serum van een konijn dat ingespoten was met een suspensie van chorioallantoïsvliezen (zie hoofdstuk VI).
2. Agglutinerend serum voor Salmonella O, groep B (Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, Utrecht).
3. Agglutinerend serum voor Escherichia coli O 26, B 6 (Central Public Health Laboratory, London).

Het chorioallantoïis-antigeen werd op dezelfde wijze bereid als het toxoplasma-antigeen. De coli- en salmonella-antigenen werden verkregen door suspensies van deze bacteriën gedurende een half uur te koken en daarna te centrifugeren. De adsorptie van deze bacteriële antigenen aan de erythrocyten geschiedde zonder voorafgaande tanninebehandeling. De remmingsproeven werden voorafgegaan door een controle van de te onderzoeken sera op de aanwezigheid van antistoffen tegen de gebruikte anti-



Serum no.	Titer S.F.R.	Titer C.B.R.	Remmings-titer Toxopl.	Remmings-titer E. coli	Remmings-titer Salmon.	Remmings-titer Chorioal.	Toxoplasma geïsoleerd uit bloed
3813	4096	128	512	<8	<8	<8	++
3815	4096	4	256	<8	<8	<8	++
5496	256	2	<8	<8	<8	<8	
6498	16384	128	512	256	512	1024	
751	<4	<4	<8	<8	<8	<8	
4896	<4	<4	128	64	256	128	
1103	2048	256	2048	<8	<8	<8	++
1115	4096	128	1024	<8	<8	<8	++

TABEL VII.

Resultaten van remmingsproeven bij enkele mensen- en konijnensera.

genen. De uitkomsten van deze remmingsproeven bij enige mensen- en konijnensera zijn samengevat in tabel VII.

De sera 3813 en 3815, afkomstig van neonati met congenitale toxoplasmosis, remden alleen de toxoplasma H.A.R., terwijl de andere haemagglutinatiereacties niet beïnvloed werden. Hetzelfde geldt voor de sera 1103 en 1115, afkomstig van de twee konijnen die met 1 ml toxoplasma-suspensie waren ingespoten. Dit maakt het waarschijnlijk dat de remmende stoffen in deze sera specifiek zijn. Deze vier serummonsters werden vrijwel op het zelfde tijdstip afgenomen als de bloedmonsters waaruit toxoplasma werd geïsoleerd. Op dat ogenblik bestond er dus een parasitaemie. De aanwezigheid van specifiek remmende stoffen zou verklaard kunnen worden door aan te nemen dat zich terzelfder tijd van de parasiet afkomstige stoffen in het bloed bevonden die nauw verwant waren aan het voor de H.A.R. gebruikte antigeen.

Serum 6498 was afkomstig van een volwassen vrouw van wie geen klinische gegevens bekend waren. Een tweede serummonster van deze patiënte werd niet ontvangen. Dit serum blijkt zowel de toxoplasma H.A.R. als ook de andere haemagglutinatiereacties te remmen. Deze remming is dus niet specifiek, hoewel de gelijktijdige aanwezigheid van specifiek remmende stoffen niet kan worden uitgesloten.

Geen van de reacties werd geremd door serum 5496, dat afkomstig was van een volwassen man van wie geen verdere gegevens bekend waren. Dit serum bevat dus noch remmende stoffen, noch haemagglutinerende antistoffen. Het is mogelijk, dat deze antistoffen niet gevormd zijn, doch het is ook denkbaar dat zij niet meer aanwezig zijn. Bovendien moet rekening

worden gehouden met de mogelijkheid, dat er slechts incomplete antistoffen in het serum aanwezig zijn.

Twee andere mensensera met positieve S.F.R. en C.B.R., doch negatieve H.A.R. konden niet onderzocht worden omdat de beschikbare hoeveelheid serum te klein was. Ook van deze patiënten was slechts één serummonster aanwezig en waren geen klinische gegevens bekend. Bij een tiental sera waarvan alleen de S.F.R. positief was, met titers variërend van 128 tot 512, werd geen remming waargenomen.

Bij serum 4896, dat als negatieve controle dienst deed, werd specifieke remming aangetroffen. Vijftien andere, willekeurig gekozen, negatieve sera remden de reacties niet.

Vele hondensera bleken specifieke remming te veroorzaken. Van de acht sera met positieve S.F.R. en C.B.R. en negatieve H.A.R. waren er zeven die specifiek remmende stoffen bevatten. Bij één serum was de remming wel specifiek. De S.F.- en C.B.-titers van dit serum waren respectievelijk 256 en 64. Bij negen van de vijftientig sera waarvan alleen de S.F.R. positief was kon de aanwezigheid van specifiek remmende stoffen worden aangetoond. De overige zestien sera remden de reacties niet. Ook bij sera waarvan alle toxoplasmareacties positief waren kwamen specifieke remmingsverschijnselen voor, evenals bij sera waarvan deze reacties negatief waren. Bij sera waarvan de H.A.R. positief was kwam deze remming ook tot uiting doordat in de eerste buisjes van de verdunningsreeks slechts een 2+, soms zelfs een 1+ patroon werd waargenomen.

Bij een vijftiental sera werd getracht de specifieke remming op te heffen door de sera te behandelen met R.D.E. (cholerafiltraat) of met koolzuursneeuw (voorschrift W.H.O.). Geen van beide methoden leverde echter enig resultaat op. Verder onderzoek in deze richting werd nog niet verricht.

De aanwezigheid van specifiek en specifiek remmende stoffen in sera waarvan de H.A.R., in strijd met de verwachting, negatief is, betekent uiteraard niet dat deze sera wel haemagglutinerende antistoffen bevatten.

In 1959 beschreef Mathews een methode om incomplete haemagglutinerende antistoffen aan te tonen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van schapeërythrocyten die volgens de methode van Boyden worden gesensibiliseerd met antigeen. Vervolgens worden de niet door antigeen bezette receptoren geblokkeerd door de erythrocyten enige tijd in aanraking te brengen met een eiwitoplossing (albumine of normaal konijneserum). Na uitwassen van de overmaat proteïnen worden de erythrocyten gemengd met het te onderzoeken serum, dat van tevoren met schapeërythrocyten is geabsorbeerd. Eventueel aanwezige incomplete antistoffen hechten zich aan de antigeengroepen en kunnen worden aangetoond doordat de erythrocyten, na uitwassen van het serum, worden geagglutineerd door anti-globuline serum.

Alle pogingen met deze methode incomplete antistoffen aan te tonen in sera met een negatieve H.A.R. en positieve S.F.R. en C.B.R. mislukten doordat er een zeer sterke haemolyse optrad. Ook proefnemingen met een iets gewijzigde techniek, waarbij gebruik gemaakt werd van formaline-erythrocyten, leidden niet tot het gewenste resultaat door het optreden van aspecifieke reacties.

Daar de serummonsters die voor dit onderzoek van belang waren inmiddels waren verbruikt, moest van verdere proefnemingen in deze richting worden afgezien, zodat de vraag naar het al of niet voorkomen van incomplete antistoffen in deze sera niet beantwoord kon worden.

## HOOFDSTUK VIII.

### BESPREKING VAN DE RESULTATEN

Het vergelijken van de resultaten van verschillende onderzoekers wordt bemoeilijkt doordat in vrijwel elk laboratorium de S.F.R. en de H.A.R. op een andere wijze worden uitgevoerd, terwijl ook de onderzochte groepen dikwijls verschillend van samenstelling zijn. Meestal kan dan ook niet meer dan een globale indruk worden verkregen van de mate waarin deze resultaten met elkaar overeenstemmen.

Bij een 121 sera omvattend onderzoek vonden Lunde en Jacobs (1958) 100% overeenstemming tussen de H.A.R. en de S.F.R., indien alleen aan titers van 16 en hoger betekenis werd toegekend. Werden ook de lagere titers in aanmerking genomen dan bedroeg de overeenstemming 95,9%. Een S.F.-titer van 16 volgens de door hen gebruikte techniek komt ongeveer overeen met een titer van 32 volgens onze eigen methode. 30% van deze sera was afkomstig van personen jonger dan 20 jaar, terwijl slechts 4% een positieve S.F.R. met een titer lager dan 32 had. Voor de H.A.R. werden verse schapeërythrocyten gebruikt.

Reuss (1961), die eveneens schapeërythrocyten gebruikte, vond bij 146 patiëntensera 93,1% overeenstemming tussen beide reacties. De laagste S.F.- en H.A.-titers die werden waargenomen bedroegen respectievelijk 16 en 128. Reuss maakt tevens melding van een onderzoek van Angelillo en Mandras (1959), die bij 130 sera 86,9% overeenstemmende resultaten vonden. De laagste titer die vermeld werd bedroeg 32.

De 95,7% overeenstemming bij ons onderzoek van 1947 patiëntensera wijkt dus niet veel af van hetgeen door anderen werd gevonden. Zowel uit de gegevens van Lunde en Jacobs als uit die van Reuss blijkt dat ook deze onderzoekers bij eenzelfde S.F.-titer een grote spreiding van de H.A.-titers vonden.

Zowel Lunde en Jacobs (1959) als Reuss (1961) maken melding van remmingsverschijnselen bij de H.A.R. Bij andere indirecte haemagglutinatiereacties werden soortgelijke waarnemingen gedaan. Zo kregen Young, Sochard en Gillem (1960) bij patiëntjes met een enteropathogene colinfectie enkele malen negatieve uitkomsten met de H.A.R., die op de aanwezigheid van specifieke, aan de bacteriële antigenen verwante stoffen in het serum bleken te berusten. Het verschijnsel kwam voornamelijk bij sera van zeer jonge kinderen voor. Volgens Popp (1958) zou ook bij tuberculosepatiënten de H.A.R. volgens Middlebrook en Dubos (1948) geremd kunnen worden door bacteriële antigenen of haptenen die vanuit

tuberculeuze haarden in de circulatie komen. Ook de resultaten van het eigen onderzoek duiden op de aanwezigheid van specifiek remmende stoffen in sera van patiënten bij wie parasitaemie bestond.

Jacobs en Lunde (1957) beschreven een geval van glandulaire toxoplasmosis tengevolge van een laboratoriuminfectie. Bij deze patiënt werden de S.F.R., de H.A.R. en de C.B.R. respectievelijk 14, 18 en 24 dagen na de infectie positief. Het titerverloop was als volgt: 14e dag: S.F.R. 64, H.A.R. < 4; 18e dag: S.F.R. 1024, H.A.R. 4; 21e dag: S.F.R. 4096, H.A.R. 64; 25e dag: S.F.R. 1024, H.A.R. 64. Het verdere verloop werd helaas niet vermeld. Ook bij de door ons geïnfecteerde konijnen werd de H.A.R. enkele dagen later positief dan de S.F.R. en toonde de S.F.-titer een zeer snelle stijging, terwijl de H.A.-titer slechts langzaam steeg. Het lijkt daarom niet uitgesloten dat de reacties zich bij de mens en bij het konijn op ongeveer gelijke wijze gedragen.

Indien dit inderdaad zo is zou de H.A.R. een grotere kans bieden in het begin van de ziekte een significante titerstijging vast te stellen dan de S.F.R. Misschien moet daarom ook de titerstijging bij de patiënten F en J (zie hoofdstuk V) op deze wijze worden verklaard.

Uit het veelvuldig voorkomen van een positieve S.F.R. met een titer lager dan 32 gepaard met een negatieve H.A.R., bij sera van gezonde personen, kan worden geconcludeerd dat de H.A.R. minder lang positief blijft dan de S.F.R. Evenzo blijkt uit het grote aantal gevallen met een positieve H.A.R. en een negatieve C.B.R. dat de H.A.R. in het algemeen langer positief zal blijven dan de C.B.R.

In hoeverre het ondanks de hiaten in onze kennis verantwoord kan worden geacht de S.F.R. geheel of gedeeltelijk te vervangen door de H.A.R., dient in de eerste plaats te worden bepaald door de gevolgen die dit zal hebben voor de betrouwbaarheid van de diagnostiek. De gevolgen zullen niet onder alle omstandigheden en bij alle vormen van toxoplasmosis dezelfde zijn.

Bij de twee door ons onderzochte gevallen van congenitale toxoplasmosis bij pasgeborenen (zie hoofdstuk V, patiënt B, en hoofdstuk VII) zou de negatieve uitkomst van de H.A.R. niet hebben geleid tot een ten onrechte verwerpen van de diagnose, daar de positieve C.B.R. een indicatie zou zijn geweest de S.F.R. alsnog in het onderzoek te betrekken. Uit de literatuur blijkt echter dat bij neonati bij wie de parasiet, soms zelfs bij herhaling, uit het bloed en uit de liquor cerebrospinalis kan worden geïsoleerd dikwijls gedurende lange tijd na de geboorte een negatieve C.B.R. wordt gevonden (Verlinde en Makstenieks, 1950 en 1951). In zulke gevallen zou een negatieve H.A.R. tengevolge van de bestaande parasitaemie kunnen leiden tot het niet stellen van de juiste diagnose. Bij het onderzoek van sera van pasgeborenen en zeer jonge kinderen kan daarom de S.F.R. niet gemist worden.

In de minder ernstige gevallen van congenitale toxoplasmosis, waarbij

het eerste onderzoek dikwijls pas op een wat latere leeftijd wordt verricht, is door de geringere activiteit van het ziekteproces de kans op remming van de H.A.R. aanmerkelijk kleiner. Bovendien zal in deze gevallen door de betere antistofvorming ook de kans op een negatieve C.B.R. veel kleiner zijn. Bij de patiëntjes G en I (zie hoofdstuk V), evenals bij enkele andere kinderen met aangeboren toxoplasmosis die door ons werden onderzocht, zou de diagnose met behulp van de H.A.R. dan ook geen moeilijkheden hebben opgeleverd. De leeftijd van deze kinderen varieerde van 6 tot 24 maanden.

Ook bij de verworven toxoplasmosis dient rekening te worden gehouden met de mogelijkheid van een negatieve H.A.R. tengevolge van remming, ofschoon dit bij geen der door ons onderzochte gevallen is voorgekomen. De kans dat bij deze vorm van de ziekte het eerste onderzoek plaatsvindt op een tijdstip dat de C.B.R. nog negatief is, blijkt in de praktijk bijzonder klein te zijn. In alle in de loop der jaren in ons laboratorium onderzochte gevallen waarbij de diagnose werd bevestigd door isolatie van de parasiet, werd bij het eerste onderzoek een positieve C.B.R. gevonden. Waarschijnlijk zal de patiënt door de weinig alarmerende symptomen in het beginstadium niet spoedig een arts raadplegen. Bovendien blijkt de diagnose toxoplasmosis door de clinicus dikwijls pas te worden overwogen nadat de andere mogelijkheden zijn uitgesloten.

Indien een positieve C.B.R., vergezeld van een negatieve H.A.R., als een indicatie wordt beschouwd om alsnog een S.F.R. te verrichten kan de kans op het niet stellen van de diagnose in acute of althans recente gevallen van verworven toxoplasmosis dan ook bijzonder klein worden geacht.

In bijna alle gevallen waarin de uitkomsten van de S.F.R. en de C.B.R. op een minder recente infectie duiden werd ook een positieve H.A.R. gevonden. Slechts bij 68 van 1947 patiëntensera was alleen de S.F.R. positief, met titers variërend van 32 tot 512. Bij geen van deze patiënten gaven de klinische verschijnselen ook maar enige reden om aan te nemen dat er toch sprake was van een recente of actieve toxoplasma-infectie. Het negatieve resultaat van de H.A.R. bij deze sera behoeft daarom ook niet tegen het gebruik van deze reactie voor diagnostische doeleinden te pleiten.

Uit de literatuur blijkt dat bij patiënten met chorioretinitis, bij wie de diagnose toxoplasmosis werd bevestigd door histopathologisch onderzoek van een geëucleëerd oog, soms een zeer lage S.F.-titer gepaard met een negatieve C.B.R. werd gevonden (zie Jacobs: Human Toxoplasmosis, pag. 149. Copenhagen, 1960). Onze kennis van het gedrag van de H.A.R. bij zulke patiënten is nog niet voldoende om het gebruik ervan te kunnen rechtvaardigen in gevallen waarbij het bestaan van oogafwijkingen de voornaamste indicatie voor het serologisch onderzoek is.

Evenals dat met de S.F.R. het geval is, zullen de uitkomsten van de H.A.R. in de praktijk dikwijls moeilijk te interpreteren zijn. Misschien zal

met de H.A.R. in het begin van de ziekte iets vaker een significante titerstijging worden gevonden dan met de S.F.R., indien althans de reactie tengevolge van remming niet negatief uitvalt. In de meeste gevallen zal de interpretatie echter op grond van één bepaalde titerwaarde dienen te geschieden.

De ervaring heeft geleerd dat bij de S.F.R. titers van 128–256 of hoger, gecombineerd met een positieve C.B.R., als een ernstige aanwijzing voor het bestaan van een recente, actieve infectie moeten worden beschouwd (Piekarski, 1960; Makstenieks en Verlinde, 1957). Hoge S.F.-titers, gepaard met een negatieve C.B.R., zullen in het algemeen wijzen op een minder recente en niet meer actieve infectie, terwijl lage titers meestal een gevolg zijn van een infectie die lang geleden heeft plaatsgevonden.

Een dergelijk schema kan vanzelfsprekend geen aanspraak maken op volledige betrouwbaarheid en is dan ook slechts als algemene richtlijn bedoeld. Een kritische beoordeling van de klinische verschijnselen blijft onmisbaar.

	Titer van de H.A.R.				Aantal sera
	$\leq 128$	256–1024	2048–8192	$> 8192$	
S.F.R. $\geq 128$ C.B.R. $\geq 2$	21	155	232	60	468
S.F.R. $< 128$ C.B.R. $\geq 2$	5	36	12	2	55
S.F.R. $\geq 128$ C.B.R. $< 2$	49	142	36	0	227
S.F.R. $< 128$ C.B.R. $< 2$	128	92	17	0	237
Aantal sera	203	425	297	62	987

TABEL VIII.

Vergelijking van de H.A.-titers met de S.F.- en C.B.-titers bij patiëntensera waarvan de S.F.R. positief was.

In tabel VIII zijn de uitkomsten van vrijwel alle onderzochte patiëntensera waarbij een positieve S.F.R. werd gevonden gegroepeerd in overeenstemming met het hierboven voor de S.F.R. beschreven schema. Alleen sera die anticomplementair waren zijn hierbij buiten beschouwing gelaten. Sera met een positieve S.F.R. doch negatieve H.A.R. zijn wel in de tabel opgenomen.

Uit deze tabel blijkt dat wanneer een H.A.-titer van 256 of hoger, in combinatie met een positieve C.B.R., wordt beschouwd als een indicatie dat met de mogelijkheid van een actieve, of althans recente, infectie ernstig

rekening moet worden gehouden, een beoordelingsschema wordt verkregen dat min of meer parallel loopt met dat voor de S.F.R. Het titerverloop bij patiënt E (zie hoofdstuk V) pleit ervoor dat een H.A.-titer van 256 inderdaad een reden tot waakzaamheid dient te zijn.

Bij 85% van de sera met een positieve C.B.R. zou het oordeel op grond van de uitkomsten van de H.A.R. overeenstemmen met dat gebaseerd op de S.F.-titer. Bij de sera met een negatieve C.B.R. zou met beide reacties in 66% van de gevallen een gelijkkluidend oordeel worden verkregen. Ook dit schema zal uiteraard allerminst volledig betrouwbaar zijn. In ieder individueel geval zal de interpretatie moeten geschieden aan de hand van de klinische gegevens, waarbij er rekening mee zal moeten worden gehouden dat de H.A.-titers in het algemeen wat hoger zijn dan de S.F.-titers.

Met uitzondering van de zes reeds eerder genoemde sera met een negatieve H.A.R. (zie hoofdstuk VII) bevinden zich in de groep: H.A.R.  $\leq 128$ , C.B.R.  $\geq 2$ , S.F.R. positief ( $\geq 32$ ), geen gevallen waarbij op grond van het ziekteverloop en van herhaald serologisch onderzoek de verdenking op een acute infectie gerechtvaardigd bleek te zijn. Onze ervaring in de interpretatie van zulke lage H.A.-titers, vergezeld van een positieve C.B.R., is evenwel nog zeer klein. Bij een eventuele vervanging van de S.F.R. door de H.A.R. zal het daarom aanbeveling verdienen, alle sera waarbij een positieve C.B.R. en een H.A.-titer lager dan 256 worden gevonden ook met de S.F.R. te onderzoeken.

Doordat in vrijwel alle gevallen waarbij een S.F.-titer lager dan 32 wordt gevonden de H.A.R. een negatief resultaat oplevert, is deze reactie voor epidemiologisch onderzoek slechts beperkt bruikbaar. Weliswaar zou een middenweg denkbaar zijn, in die zin dat eerst alle sera met de H.A.R. worden onderzocht en daarna alleen de negatieve sera met de S.F.R., waarbij slechts zelden lange titraties nodig zullen zijn, doch vergelijking van de op deze wijze verkregen resultaten met die van andere onderzoekers wordt dan vrijwel onmogelijk.

Door de slechte overeenstemming die bij hondensera reeds bij een beginverdunding van 1 : 32 tussen beide reacties bestaat komt vervanging van de S.F.R. door de H.A.R. noch voor diagnostisch, noch voor epidemiologisch onderzoek bij deze diersoort in aanmerking. Voor een belangrijk deel wordt de discrepantie tussen de uitkomsten van de H.A.R. en de S.F.R. veroorzaakt door het optreden van aspecifieke remmingsverschijnselen bij eerstgenoemde reactie. Verder onderzoek naar methoden om deze remming op te heffen is daarom noodzakelijk.

Samenvattend kan worden gezegd dat het met inachtneming van enige restricties mogelijk kan worden geacht bij het klinisch diagnostisch onderzoek van mensensera in een zeer groot deel van de gevallen de S.F.R. te vervangen door de H.A.R., zonder dat hierdoor de betrouwbaarheid van



de diagnostiek in belangrijke mate in gevaar zal worden gebracht. Een uitzondering dient te worden gemaakt voor sera van pasgeborenen en zeer jonge kinderen, sera van patiënten verdacht van oculaire toxoplasmosis en sera met een H.A.-titer lager dan 256 en positieve C.B.R. Zolang onze ervaring met de H.A.R. nog onvoldoende is moet in deze gevallen de S.F.R. als onmisbaar worden beschouwd.

Een dergelijke werkwijze, waarbij de S.F.R. als het ware voortdurend in reserve moet worden gehouden, heeft voor de clinicus het bezwaar dat de diagnose nu eens op de uitkomsten van de ene, dan weer op die van de andere reactie zal moeten worden gebaseerd. Door het gebrek aan ervaring in de interpretatie van de H.A.-titers zal dit bezwaar zich vooral in het begin doen gelden.

Hier staat echter tegenover dat de voortdurende toename van het aantal S.F.-reacties dat thans moet worden verricht gemakkelijk kan leiden tot overbelasting van het laboratorium en daardoor tot vertraging van het onderzoek. Hierbij moet tevens worden bedacht dat door de vermoeidheid die bij de S.F.R. een onvermijdelijk gevolg van het tellen is de betrouwbaarheid van de uitkomsten van deze reactie kleiner wordt naarmate het aantal tellingen dat dagelijks door één onderzoeker moet worden verricht toeneemt.

Aan de gerechtvaardigde wens van de clinicus, zo snel mogelijk de uitslag van het gevraagde onderzoek te ontvangen, zou in belangrijke mate tegemoetgekomen kunnen worden indien de S.F.R. zou worden vervangen door de H.A.R.

Bij ons eigen onderzoek werd zowel voor de H.A.R. als voor de C.B.R. uitsluitend gebruik gemaakt van antigeen dat in bevroren toestand ( $-20^{\circ}$  C) werd bewaard. Volgens de onderzoeken van Lunde en Jacobs (1959) zou het antigeen voor de H.A.R. in gelyophiliseerde toestand ook bij kamertemperatuur gedurende lange tijd houdbaar zijn.

In deze publicatie wordt niet vermeld of dit gelyophiliseerde antigeen ook bruikbaar is voor de C.B.R. Indien dit het geval zou blijken te zijn, zou hierdoor de mogelijkheid worden geopend ook laboratoria die niet beschikken over de outillage voor de uitvoering van de S.F.R. in te schakelen bij het klinisch diagnostisch onderzoek op toxoplasmosis, doordat de bereiding van het antigeen en eventueel ook van de formaline-erythrocyten dan in één centraal laboratorium zou kunnen geschieden.

De juistheid van deze veronderstellingen zal echter nog door nader onderzoek moeten worden bevestigd. Ook de door Weinbach (1958) genoemde mogelijkheid, met antigeen gesensibiliseerde formaline-erythrocyten door lyophiliseren houdbaar te maken, verdient de aandacht.

## SAMENVATTING

Het in deze verhandeling beschreven onderzoek had tot doel de betekenis na te gaan van de haemagglutinatiereactie volgens Jacobs en Lunde voor het klinisch diagnostisch en epidemiologisch onderzoek van toxoplasmosis. Door in plaats van verse schapeërythrocyten met formaline geconserveerde mensenerothrocyten te gebruiken, konden resultaten worden bereikt die binnen nauwe grenzen reproduceerbaar waren.

De uitkomsten van deze reactie bij een aantal sera van patiënten, gezonde volwassenen en honden werden vergeleken met die van de Sabin-Feldmanproef. Het gedrag van beide reacties tijdens het verloop van een infectie werd bestudeerd bij experimenteel met toxoplasma besmette konijnen en bij een aantal patiënten die gedurende enige tijd door ons werden gevolgd. Sera waarvan de uitkomsten van de haemagglutinatiereactie en de Sabin-Feldmanreactie sterk van elkaar afweken werden aan een nader onderzoek onderworpen.

Bij de mensen- en hondensera bedroeg de kwalitatieve overeenstemming tussen beide reacties respectievelijk 96% en 77%, indien werd uitgegaan van een laagste serumverdunding van 1 : 32. Met een beginverdunding van 1 : 4 werd bij de mensensera slechts 67% overeenstemming gevonden doordat vrijwel alle sera met een kleurproeftiter lager dan 32 een negatieve haemagglutinatiereactie gaven.

Bij de experimenteel besmette konijnen werd de kleurproef enkele dagen eerder positief dan de haemagglutinatiereactie. De titer van laatstgenoemde reactie toonde een geleidelijke stijging en bereikte pas na enkele weken een maximum. De Sabin-Feldmantiter bewoog zich toen reeds in dalende lijn. Er zijn aanwijzingen dat ook bij de mens een soortgelijk beeld wordt aangetroffen.

Een duidelijke kwantitatieve correlatie tussen beide reacties was niet aanwezig. Bij de mensensera waarvan beide reacties positief waren was de haemagglutinatietiter gemiddeld twee verdunningen hoger dan de Sabin-Feldmantiter, doch er was een zeer grote spreiding. Uit de resultaten van absorptieproeven bleek dat de haemagglutinerende antistoffen waarschijnlijk niet identiek zijn met de cytoplasma veranderende antistoffen die bij de kleurproef een rol spelen.

Door de slechte overeenstemming tussen de Sabin-Feldmanreactie en de haemagglutinatiereactie bij serumverdundingen lager dan 1 : 32 leent laatstgenoemde reactie zich niet voor epidemiologisch onderzoek. Voor diagnostische doeleinden kan de kleurproef grotendeels worden vervangen door de haemagglutinatiereactie indien deze wordt gebruikt in combinatie

met de complementbindingsreactie en iedere negatieve uitkomst die vergezeld gaat van een positieve complementbindingsreactie beschouwd wordt als een absolute indicatie tot het verrichten van een Sabin-Feldmanproef. Ook hierbij zijn er evenwel enkele omstandigheden die de bruikbaarheid van deze reactie enigszins beperken.

1. Bij een groot aantal hondensera werd aspecifieke remming van de haemagglutinatiereactie waargenomen. Hierdoor is deze reactie niet geschikt voor diagnostisch onderzoek van sera van deze diersoort.

2. Bij enkele sera van pasgeborenen met ernstige congenitale toxoplasmosis trad specifieke remming van de reactie op. De betreffende serummonsters waren afgenomen terwijl er een parasitaemie bestond. Hierdoor kan deze reactie niet worden gebruikt voor het onderzoek van sera van pasgeborenen en zeer jonge kinderen, temeer daar bij deze patiënten ook de complementbindingsreactie soms een negatief resultaat geeft.

3. Bij patiënten met oculaire toxoplasmosis wordt dikwijls een lage Sabin-Feldmantiter en een negatieve complementbindingsreactie gevonden. Het gedrag van de haemagglutinatiereactie bij deze vorm van toxoplasmosis is nog niet voldoende bestudeerd om het gebruik ervan in deze gevallen nu reeds te kunnen rechtvaardigen.

4. Daar de interpretatie van lage haemagglutinatietiters ( $< 256$ ) tezamen met een positieve complementbindingsreactie door gebrek aan ervaring moeilijkheden zou kunnen opleveren, verdient het aanbeveling voorlopig ook in deze gevallen een Sabin-Feldmanproef te verrichten. (Bij slechts  $\pm 0,75\%$  van de 1947 door ons onderzochte patiëntensera deed zich deze situatie voor.)

Indien bovengenoemde restricties inacht worden genomen kan, althans bij het in ons laboratorium ter onderzoek aangeboden materiaal, in ruim 95% van de gevallen de Sabin-Feldmanreactie worden vervangen door de haemagglutinatiereactie zonder dat hierdoor afbreuk wordt gedaan aan de betrouwbaarheid van de diagnostiek.

## SUMMARY

This thesis presents a study of the Jacobs and Lunde haemagglutination test for the diagnostic and epidemiological investigation of toxoplasmosis. The substitution of formalinized human erythrocytes for fresh sheep red cells made it possible to obtain results that are reproducible within very narrow limits.

The results of this haemagglutination test, based on the sera of a number of patients, healthy adults and dogs are compared with those obtained using the Sabin-Feldman test. The patterns shown by both tests during the course of the disease were studied in rabbits experimentally infected with toxoplasma and in a number of patients followed for varying periods. Sera in which the results of the haemagglutination test and the dye test showed wide disagreement were given further study.

For human and canine sera the qualitative agreement between the two tests was 96% and 77% respectively when the lower limit of dilution was 1 : 32. With an initial dilution of 1 : 4 only 67% agreement was found for the human sera because almost all the sera with a dye test titre below 32 gave a negative haemagglutination reading.

In experimentally infected rabbits the dye test was positive several days earlier than the haemagglutination test. The titre of the latter showed a gradual increase and reached a maximum only after several weeks, at which time the dye test already showed a descending curve. Indications are present which suggest that the same pattern is to be found for human sera.

No distinct quantitative correlation between the two tests could be found. For the human sera in which both tests were positive, the haemagglutination titre was on the average two dilutions higher than the dye test titre, but there was a very wide variation. From the evidence of absorption tests it appears that the haemagglutinating antibodies are probably not identical with the cytoplasm modifying antibodies which play a role in the dye test.

On account of the poor agreement between the dye test and the haemagglutination test using serum dilutions lower than 1 : 32, the latter is unsuitable for epidemiological investigation. For diagnostic purposes the dye test can for the most part be replaced by the haemagglutination test if the latter is used in combination with the complement fixation test and each negative result accompanied by a positive complement fixation test is considered as an absolute indication for the performance of a Sabin-

Feldman test. However, in this case too there are some restrictions for the use of the haemagglutination test.

1. In a great number of canine sera aspecific inhibition of the haemagglutination test was observed. In view of this fact this test is not suitable for the diagnostic investigation of this type of sera.

2. A few sera of newborn infants with severe congenital toxoplasmosis showed specific inhibition of the haemagglutination test. These serum samples were taken during a period of parasitaemia. Because of this inhibition this test cannot be applied for sera of newborn and very young children, the more so as in these cases the complement fixation test sometimes gives a negative result.

3. For patients with ocular toxoplasmosis frequently a low dye test titre and a negative complement fixation test is found. The behaviour of the haemagglutination test in this form of toxoplasmosis is not yet sufficiently known to justify its use at present.

4. Since lack of experience complicates the interpretation of low haemagglutination titres ( $< 256$ ) accompanied by a positive complement fixation test, it is recommendable for the time being to perform the Sabin-Feldman test in such cases too. (This situation occurred in only  $\pm 0,75\%$  of the 1947 samples of patient sera examined by us.)

With the exception of the restrictions described above, the results obtained from the material investigated in our laboratory indicate that in more than 95% of the cases the dye test can be replaced by the haemagglutination test without reducing the reliability of the diagnosis.

## LITERATUUR

- Angelillo, B. en A. Mandras, *L'Igiene Moderna* 52, 175 (1959).
- Beeuwkes, H., A. Bijlsma en D. E. Mendes de Leon, *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 101, 1740 (1957).
- Benedict, A. A. and E. O'Brien, *J. Immunol.* 80, 94 (1958).
- Borduas, A. G. et P. Grabar, *Ann. Inst. Pasteur* 84, 903 (1953).
- Boyden, S. V. J. *Exper. Med.* 93, 107 (1951).
- Boyden, S. V. and E. Sorkin, *J. Immunol.* 75, 15 (1955).
- Brading, J., *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 34, 157 (1956).
- Chen, T. H. and K. F. Meyer, *J. Immunol.* 72, 282 (1954).
- Cole, L. R. and V. R. Farrell, *J. Exper. Med.* 102, 631 (1955).
- Cox, C. D. and E. C. Pirtle, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 93, 373 (1956).
- Cox, C. D., E. D. Vermillion and B. Fingerhut, *J. Lab. Clin. Med.* 48, 298 (1956).
- Csizmas, L., *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 103, 157 (1960).
- Eegriwe, E., *Zschr. Anal. Chem.* 110, 22 (1937).
- Fauconnier, B., *Ann. Inst. Pasteur* 98, 107 (1960).
- Feeley, J. C., C. P. Sword, C. R. Manclark and M. J. Pickett, *Am. J. Clin. Pathol.* 30, 77 (1958).
- Feigl, F., *Qualitative Analysis by Spot tests*, pag. 395. New York (1947).
- Felton, F. G. and L. V. Scott, *J. Immunol.* 80, 186 (1958).
- Felton, F. G. and L. V. Scott, *J. Immunol.* 86, 42 (1961).
- Fisher, S., *J. Hygiene* 50, 445 (1952).
- Flick, J. A., *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 68, 448 (1948).
- Garabedian, G. A., R. M. Matossian and A. Y. Djanian, *J. Immunol.* 78, 269 (1957).
- Garabedian, G. A. and J. T. Syverton, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 105, 632 (1960).
- Huldt, G., *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 43, 141 (1958).
- Ingraham, S. J., *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 99, 452 (1958).
- Jacobs, L., *Human Toxoplasmosis*, pag. 149, Copenhagen (1960).
- Jacobs, L. and M. N. Lunde, *J. Parasitol.* 43, 308 (1957).
- Kagan, I. G., *Science* 122, 376 (1955).
- Kagan, I. G., L. Norman, D. S. Allain and C. G. Goodchild, *J. Immunol.* 84, 635 (1960).
- Keogh, E. V., E. A. North and M. F. Warburton, *Nature* 160, 63 (1947).
- Keogh, E. V., E. A. North and M. F. Warburton, *Nature* 161, 687 (1948).
- Kessel, J. F., W. P. Lewis, S. Ma and H. Kim, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 106, 409 (1961).
- Landy, M., *Am. J. Public Health* 44, 1059 (1954).
- Landy, M. and R. J. Trapani, *Am. J. Hygiene* 59, 150 (1954).
- Landy, M., R. J. Trapani, R. Formal and J. Klugler, *Am. J. Hygiene* 61, 143 (1955).
- Lawlis, J. F., *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 98, 300 (1958).
- Lunde, M. N. and L. Jacobs, *Am. J. Trop. Med. Hygiene* 7, 523 (1958).
- Lunde, M. N. and L. Jacobs, *J. Immunol.* 82, 146 (1959).
- Makstenieks, O. and J. D. Verlinde, *Doc. Med. Geogr. Trop.* 9, 213 (1957).
- Mas Bakal, P., *Proefschrift Leiden* (1960).
- Mathews, K. P., *J. Immunol.* 82, 279 (1959).
- McKenna, J. M., *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 95, 591 (1957).

- Middlebrook, G. and R. J. Dubos, *J. Exper. Med.* **88**, 521 (1948).  
 Middlebrook, G., *J. Clin. Invest.* **29**, 1480 (1950).  
 Neter, E., L. F. Bertram, D. A. Zak, M. R. Murdock and C. E. Arbesman, *J. Exper. Med.* **96**, 1 (1952).  
 Neter, E., E. A. Gorzynski, R. M. Gino, O. Westphal and O. Lüderitz, *Can. J. Microbiol.* **2**, 232 (1956).  
 Neter, E., *Bacteriol. Review* **20**, 166 (1956).  
 Piekarski, G., *Münch. med. Wschr.* **102**, 842 (1960).  
 Popp, L., *Zschr. Immun. forsch.* **115**, 56 (1958).  
 Popp, L., *Zschr. Immun. forsch.* **117**, 419 (1959).  
 Reuss, K., *Zschr. Immun. forsch. exp. Therapie* **121**, 75 (1961).  
 Sabin, A. B. and H. A. Feldman, *Science* **108**, 660 (1948).  
 Salk, J. E., *J. Immunol.* **49**, 87 (1944).  
 Schubert, J. H. and R. G. Cornell, *J. Lab. Clin. Med.* **52**, 737 (1958).  
 Scott, L. V., F. G. Felton and J. A. Barney, *J. Immunol.* **78**, 211 (1957).  
 Silverman, S. J., *J. Lab. Clin. Med.* **44**, 185 (1954).  
 Soestbergen, A. A. van, *Proefschrift Leiden* (1957).  
 Stavitsky, A. B., *J. Immunol.* **72**, 360 (1954).  
 Vennes, J. W., R. E. MacDonald and P. Gerhardt, *Nature* **180**, 1363 (1957).  
 Verlinde, J. D., and O. Makstenieks, *Antonie van Leeuwenhoek* **16**, 366 (1950).  
 Verlinde, J. D. and O. Makstenieks, *Ned. Tijdschr. Geneesk.* **95**, 2050 (1951).  
 Warburton, M. F., E. V. Keogh and S. Williams, *Med. J. Australia* **1**, 135 (1949).  
 Warren, J. and A. B. Sabin, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **51**, 11 (1942).  
 Warren, J. and S. B. Russ, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **67**, 85 (1948).  
 Warren, J., U. Walz, J. S. Reedal and S. J. Ajl, *J. Bacteriol.* **70**, 170 (1955).  
 Weinbach, R., *Schweiz. Zschr. Path. Bakt.* **21**, 1043 (1958).  
 Weinbach, R., *Schweiz. Zschr. Path. Bakt.* **22**, 1 (1959).  
 Weinbach, R. und N. Moldovan, *Ztrbl. Bakt. I Orig.* **182**, 529 (1961).  
 Westphal, A., *Zschr. Tropenmed. Parasitol.* **9**, 217 (1958).  
 Young, V. M., M. R. Sochard and H. C. Gillem, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **105**, 635 (1960).