

VERHANDELINGEN VAN HET
INSTITUUT VOOR PRAEVENTIEVE GENEESKUNDE

I

AETIOLOGIE DER INFLUENZA

DE ISOLEERING VAN HET INFLUENZA-VIRUS
TIJDENS DE EPIDEMIE VAN 1941 TE GRONINGEN

DOOR

Dr. L. BIJLMER



1943

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

Typografische verzorging
N.V. DRUKKERIJ V/H H. BORN
ASSEN

Het Instituut voor Praeventieve Geneeskunde heeft gedurende eenige jaren subsidie verleend aan de onderzoekingen, die te Groningen, aanvankelijk door Dr. J. Mulder, daarna door Dr. L. Bijlmer, over het griepvraagstuk verricht werden. De onderzoekingen gaven herhaaldelijk aanleiding tot besprekingen met de medewerkers van het Instituut, die eveneens het influenza-probleem in studie hebben.

In de publicatie, die thans van de hand van Dr. Bijlmer verschijnt, wordt een uitvoerige critische bespreking gegeven van de aetiologie en de immunotherapie en -prophylaxis der influenza, waardoor zijn studie voor de Nederlandsche artsen, die zich voor het griepvraagstuk interesseeren, van belang is. De nauwkeurige beschrijving van de in Groningen gevolgde methodiek en van de onderzoekingen betreffende de epidemie van 1941 te Groningen zijn in het bijzonder van beteekenis voor degenen, die zelf onderzoekingen over het virusprobleem verrichten.

De Directeur van het Instituut voor
Praeventieve Geneeskunde,

J. P. BIJL.

INHOUD

| | |
|--|----|
| Inleiding | 9 |
| Hoofdstuk I. Historisch overzicht | 11 |
| De ontdekking van het virus door Wilson Smith, Andrewes en Laidlaw | 11 |
| Het werk van Shope over varkensinfluenza | 17 |
| Francis' onderzoek in Amerika | 19 |
| Burnet's werk in Australië | 21 |
| Het vasteland van Europa | 21 |
| De ontdekking der antigene structuur | 23 |
| De epidemieën van 1936—1937 | 29 |
| De influenza van 1939 | 30 |
| Een nieuw virus in 1940 | 32 |
| Influenza A in 1941 | 35 |
| Samenvatting | 36 |
| Hoofdstuk II. Werkwijze, in Groningen gevolgd bij het isoleeren van het virus | 38 |
| Het frettenisoleerhuis | 38 |
| Het enten van het fret | 43 |
| Aanpassing van het virus aan de muis | 47 |
| Pathologische anatomie van de influenza-long bij de muis | 50 |
| De filtratie van het virus | 55 |
| Het bewaren van influenza-virus. Drogen in vacuo | 61 |
| Ontsmetting en sterilisatie | 65 |
| Hoofdstuk III. Methodiek der immunologische proeven | 70 |
| De kruisimmuunproef | 70 |
| De virusneutraliseeringsproef | 71 |
| De complementbindingsreactie | 78 |
| Hoofdstuk IV. De epidemie te Groningen in Januari— Februari 1941 | 82 |

| | |
|---|------------|
| Het aantonen van de aanwezigheid van het influenza-virus door fretten-enting | 82 |
| Het isoleeren van een drietal virusstammen | 92 |
| Immunologisch onderzoek van patiëntensera met behulp van de virusneutraliseeringsproef | 100 |
| De complementbindingsreactie | 109 |
| Hoofdstuk V. Antigene structuur van de in Groningen geïsoleerde influenza-virusstammen | 116 |
| De specifieke influenza-virusstammen | 116 |
| Antigene structuur van den stam B 1939 | 120 |
| Vergelijking der virusstammen van 1941 onderling | 122 |
| Antigene structuur van stam Z 1941 | 126 |
| Hoofdstuk VI. Immunotherapie en -prophylaxe | 130 |
| Het verwekken van immuniteit bij fretten | 130 |
| Vaccinatieproeven bij muizen | 132 |
| Verschillende bronnen voor vaccinbereiding | 134 |
| Specificiteit van het influenza-virus als antigeen | 136 |
| Vaccinatieproeven bij mensen | 137 |
| Serumbehandeling | 139 |
| Het mechanisme der immuniteit bij influenza | 141 |
| Locale en natuurlijke immuniteit | 144 |
| Eigen vaccinatieproeven | 144 |
| Hyperimmuniseering van konijnen | 146 |
| Inhalatie van immuunserum bij muizen | 152 |
| Hoofdstuk VII. Chemoprophylaxis en -therapie | 158 |
| Samenvatting | 159 |
| Résumé | 163 |
| Zusammenfassung | 165 |
| Summary | 167 |
| Literatuur | 169 |

INLEIDING.

Het ingestelde influenza-onderzoek is mogelijk gemaakt door den financieelen steun van Curatoren der Rijksuniversiteit, het Instituut voor Praeventieve Geneeskunde te Leiden, de Directie van het Algemeen Provinciaal-, Stads- en Academisch Ziekenhuis te Groningen en de N.V. Organon te Oss. Aan den Oud-Directeur van het Algemeen Provinciaal-, Stads- en Academisch Ziekenhuis, den Heer L. J. Zielstra, komt bijzondere dank toe voor zijn actieve medewerking bij den bouw en de inrichting van het frettenisoleerhuis.

Het doel van een werk als het verrichte mag zeker niet als bereikt beschouwd worden, wanneer de aetiologie van de bestudeerde epidemie door de isolatie van het agens voor een belangrijk deel is opgehelderd. Het doel omvat meer, namelijk de voorbereiding op een snelle en juiste determineering en een, hiermede samenhangende, zoo doeltreffend mogelijke bestrijding van een toekomstige influenza-pandemie.

Nog steeds geldt in hoofdzaak, wat Mulder in 1938 schreef in het Nederlandsch Tijdschrift voor Geneeskunde, als aanhef van een overzicht van den stand van het influenza-vraagstuk: „Tegenover de dreiging van een nieuwe influenza-pandemie, die misschien tuschen 1940 en 1950 de menschheid zal bezoeken, staat de medische wetenschap op het oogenblik machteloos. Wat dit beteekent beseft men pas goed, als men bedenkt, dat in 1918, het jaartal der laatste pandemie, millioenen menschen het slachtoffer van deze ziekte zijn geworden, ongeteld nog de tallozen, die als gevolg van de influenza door een chronische long- of hersenziekte, in den vorm van chronische pneumonie met bronchiëctasieën en chronische encephalitis, de rest van hun leven invaliden bleven.”

Door de ongunst der laatste jaren kon het influenza-onderzoek, dat sedert de ontdekking van het virus in verschillende deelen van de wereld met geestdrift aangevat werd en reeds tot veelbelovende uitkomsten leidde, niet tot dien bloei komen, welke, op grond van het reeds bereikte, verwacht had mogen worden.

Als wij, met bescheiden middelen, zijn begonnen een studie te maken van de influenza in haar weinig gerucht makenden, milden epidemischen vorm, en haar doorzetten, ondanks alle huidige be-

lemmeringen, dan geschiedde dit in de overtuiging, dat een land als het onze, met zijn hooge cultuur, niet het minst op medisch wetenschappelijk gebied, geoefend en paraat moet zijn om, tezamen met anderen, de pandemische influenza, die in haar catastrophalen vorm, gezien een zekere periodiciteit in haar optreden, binnen afzienbaren tijd wel moet verschijnen, terstond te bestudeeren, te bestrijden en, zoo het mocht zijn, te overwinnen.

HOOFDSTUK I.

Historisch overzicht.

De ontdekking van het virus door Smith, Andrewes en Laidlaw.— In Juli 1933 verscheen in „The Lancet” het verslag van Wilson Smith, C. H. Andrewes en P. P. Laidlaw¹, slechts enkele kolommen druks beslaand, waarin deze onderzoekers, werkend aan het National Institute for Medical Research te Londen, mededeelden er in te zijn geslaagd, een virus af te zonderen uit het keelspoelsel van influenza-patiënten. Zij openden daarmee een reeks van waarlijk klassieke onderzoekingen, die eens en voor al een eind maakten aan de onzekerheid, welke tot dan toe had geheerscht omtrent den verwekker van de epidemisch optredende influenza. Zij ontnamen daarmee voorgoed aan *Haemophilus influenzae*, den bacil van Pfeiffer, den reeds veel betwijfelden roep van veroorzaker der influenza. Nooit was het gelukt deze bacterie geregeld in de sputa van influenza-lijdens aan te toonen, noch ging het vinden van *Haemophilus* steeds met influenza gepaard. Van den naam van dit micro-organisme, door Pfeiffer in 1892 in het sputum van influenza-patiënten gevonden, bleef intusschen een suggestie uitgaan, welke buiten den engeren kring van vakgeleerden haar greep op de geesten nooit geheel verloren heeft.

Haemophilus influenzae, die blijkens latere onderzoekingen, waaronder die van Mulder², een ubiquitaire verwekker is van etterige bronchitis en bronchiolitis, wordt, weliswaar naast het filtreerbare virus, ook thans nog als verwekker van influenza beschouwd, met name door Kairies³. Volgens dezen onderzoeker staat de enkelvoudige aetiologie van de influenza allermintst vast, doch zijn er twee groepen van aetiologische factoren: ultravira, waaronder het influenza-virus van Smith, Andrewes en Laidlaw het voornaamste is, en bacteriën, waaronder *Haemophilus* de eerste plaats inneemt.

De verwarring komt voort uit een vage omgrenzing van de influenza als klinisch begrip. Influenza-achtige aandoeningen van de luchtwegen, welke niet door het influenza-virus worden veroorzaakt, komen veelvuldig voor, ook in min of meer epidemischen vorm. Het ziet er intusschen naar uit, dat andere vira verantwoordelijk zijn voor deze ziektevormen en niet een bepaalde groep van bacteriën. Zeker is het, dat tijdens de epidemieën, waarbij uit de

lijders het influenza-virus werd geïsoleerd, *Haemophilus* zeer onregelmatig gevonden werd, zoodat aan bacteriën, behorende tot dit geslacht, geen aetiologische beteekenis kan worden gehecht.

Nog tijdens de epidemie van 1941 heeft Varenius ⁴ in Stockholm vastgesteld, dat de bacterieele flora van de door hem bestudeerde influenza-gevallen geen verschil toonde met die, welke buiten de influenza-epidemieën bij afwijkingen van de luchtwegen werd aangetroffen, waaruit hij indirect besluit tot een filtreerbaar virus als verwekker van de epidemie. Zijn bevinding is geheel in overeenstemming met hetgeen in Groningen tijdens dezelfde epidemie werd gevonden.

Kairies (l.c.) wijst er op, dat het agens, hetwelk tijdens het manifest worden van de ziekte gevonden wordt, er niet de eerste verwekker van behoeft te zijn. Deze opvatting willen wij laten gelden voor de bacteriën, welke gevonden worden bij de pneumonieën, die als complicaties bij de influenza plegen op te treden. Dat echter tijdens vele epidemieën, van 1933 tot heden, het influenza-virus als eenige verwekker van de ongecompliceerde influenza mag worden aanvaard, zal uit den gang van het onderzoek, zooals wij dat in zijn ontwikkeling gaan schetsen, voldoende blijken.

Gefiltreerde keelspoelsels bij proefdieren geënt. — Intusschen is de oplossing van het influenza-vraagstuk al in beginsel vervat in het eerste verslag van de onderzoekers, die wij in den aanhef noemden. De mededeeling, waarin zij hun ontdekking aan de wereld bekend maakten, is in haar eenvoud en bescheidenheid zoo overtuigend, dat wij er de voornaamste gedeelten zoo letterlijk mogelijk vertaald van willen laten volgen.

„De influenza-epidemie aan het begin van 1933 verschaftte ons een gelegenheid een experimenteele studie van deze ziekte te maken, waarvan de uitkomsten vervat zijn in deze voorloopige mededeeling.

Keelspoelsels werden verkregen van een aantal patiënten, zoo vroeg mogelijk na het optreden van duidelijke symptomen. In de veronderstelling, dat het aetiologisch agens van de influenza waarschijnlijk een filtreerbaar virus was, werden de keelspoelsels voor het gebruik gefiltreerd door een bacteriedichte membraan. De filtraten, die kiemvrij bleken te zijn, werden gebruikt om te trachten vele verschillende diersoorten te besmetten. Al deze pogingen bleven volkomen zonder resultaat totdat het fret werd

gebruikt; het eerste succes werd pas behaald tegen het einde van de epidemie.

De eerste proef, die slaagde, werd gedaan met twee fretten, die elk een filtraat kregen toegediend van menselijke keelspoelsels, zoowel onderhuids als intranasaal. Beide dieren werden duidelijk ziek op den derden dag na de infectie en vertoonden symptomen van de kenmerkende ziekte, die in hetgeen volgt beschreven wordt. Wij vonden, dat de ziekte overgebracht kon worden zoowel door contact als door directe overdracht van neusspoelsels van een ziek op een gezond fret. Toen wij zoover waren, werd het werk overgebracht naar het buiten-laboratorium van het Instituut te Mill Hill, waar het kon worden voortgezet onder de voorwaarden van strenge afzondering der proefdieren, zooals die ontwikkeld en toegepast waren door Dunkin en Laidlaw bij hun werk over de hondenziekte."

De experimenteele fretteninfluenza.— Een belangrijk punt in de mededeeling van de Engelsche onderzoekers is de beschrijving van den typischen influenza-aanval bij het fret.

„De frettenziekte is gekenmerkt door een incubatietijd van twee dagen, een diphasische temperatuurstijging, symptomen van rhinitis en verschillende algemeene ziekteverschijnselen. De temperatuur stijgt plotseling, omtrent 48 uur na de infectie, vaak boven 105° F (41° C), zelfs boven 106° F, en daalt op den 3en of 4en dag weer, om opnieuw te stijgen op den 4en of 5en dag. In den loop van de volgende paar dagen wordt de temperatuur geleidelijk weer normaal en blijft in de meeste gevallen verder binnen normale grenzen."

De algemeene verschijnselen van de experimenteele fretteninfluenza worden door de Engelsche onderzoekers als volgt gekarakteriseerd.

„Tegelijk met het eerste oploopen van de temperatuur begint het fret er ziek uit te zien, het dier is stil en suf, weigert vaak voedsel en kan teekenen van spierslakte vertoonen. De catarrhale verschijnselen beginnen meestal op den derden dag. De oogen worden waterig en er komt uit den neus een grootere of kleinere hoeveelheid waterige afscheiding. Deze wordt soms kleverig en kan slijm-etterig zijn, zoodat de pels om de randen van de neusgaten vastkleeft. Het dier niest vaak, geeuwt herhaaldelijk en ademt in veel gevallen gedeeltelijk door den mond met hijgende en rochelende geluiden, die duidelijk een aanmerkelijken graad

van neusverstopping te kennen geven. Deze gaat nu en dan gepaard met een overvloedige neusuitscheiding. De punt van den neus, normaal rose, is vaak erg bleek. De ziekteverschijnselen houden soms maar enkele dagen aan, doch kunnen ook wel tien dagen duren, waarna het fret weer volkomen normaal wordt. Er is een aanmerkelijk verschil, zoowel wat den koortstop aangaat als wat betreft de intensiteit en het moment van het optreden der direct waarneembare verschijnselen..... De ziekte is nooit doodelijk geweest in de 64 geobserveerde gevallen.....”

Afwezigheid van zichtbare virus-insluitels. — Van eenige opmerkingen over de pathologische anatomie, die dan volgen, is belangrijk, dat er geen insluitels, „inclusion bodies”, te ontdekken waren, welke kenmerkend zouden zijn voor de virusziekte. Deze door de Engelsche onderzoekers reeds in hun eerste mededeeling vermelde bevinding heeft nog niets van haar geldigheid verloren. Van microscopisch zichtbare insluitels, zooals die voor vele vira karakteristiek zijn (gele koorts, poliomyelitis, lyssa, ectromelia, hondenziekte, enz.), wordt bij het influenza-onderzoek door geen enkele der bekende onderzoekers melding gemaakt. Aan de waarneming van een klein lichaampje, „minute corpuscle”, in de longlaesies van met influenza-virus geïnfecteerde muizen door Tsurumi en Ogasawara⁵ wordt door Haagen geen beteekenis toegekend.

Viruspassage van dier op dier. — Teneinde zich ervan te verzekeren, dat zij het ziekteverwekkend agens in handen hadden, hebben Smith c.s. aanstonds nagegaan, of de experimenteele fretteninfluenza zich bij passage van dier op dier zou herhalen. Het gelukte hun vele malen contactbesmetting te verkrijgen, door een gezond dier gedurende 24 uur bij een ziek te zetten. De gebruikelijke techniek voor de viruspassage was echter de volgende :

„Het geïnfecteerde dier wordt gedood zodra het symptomen vertoont. De neusschelpen worden uitgekraab, fijngewreven met zand en gesuspenseerd in ongeveer 20 cm³ van gelijke deelen bouillon en physiologisch zoutwater. De suspensie wordt even gecentrifugeerd en ongeveer 1 cm³ van de bovenstaande vloeistof wordt in de neusgaten van een nieuw fret gedruppeld. Op deze wijze werden van een stam 26 achtereenvolgende passages gemaakt en ieder dier van die reeks toonde de typische tempe-

ratuurkromme en duidelijke ziekteverschijnselen. Een honderd-voudige verdunning bleek ook nog geregeld infectieus."

Deze laatste mededeeling wijst er wel op, dat de onderzoekers met een virulent virus te doen hadden. Ook maakten zij bij deze proeven gebruik van een ongefiltreerde suspensie.

Na een opsomming van de gevallen, gediagnosticeerd als influenza, waarvan de keelspoelsels bij fretten de ziekte opwekten, wordt vermeld, dat de keelspoelsels van personen, die niet aan influenza leden, niet infectieus bleken. De neusuitscheiding van een lijder aan zware verkoudheid was eveneens niet besmettelijk.

Filtreerbaarheid van het virus. — De filtreerbaarheid van het infecteerend agens werd nader bewezen door de neussuspensies der fretten te filtreren door een gradocolmembraan met een gemiddelde poriënwijdte van $0,6 \mu$, en het filtraat bij gezonde fretten te enten. Aldus werd gehandeld bij herhaalde passages achter elkan-der. Steeds bleek het filtraat infectieus te zijn en veroorzaakte het eenzelfde typisch ziektebeeld. Een enkele maal werd een zeer dichte membraan gebruikt, met een gemiddelde poriënwijdte van $0,25 \mu$; ook hierdoor bleek het virus heen te gaan, zoodat het virus der fretteninfluenza niet grooter bleek te zijn dan dat van koepokken en van herpes.

„De virulentie van de filtraten, gepaard aan het feit, dat wij er niet in slaagden eenigen bacterieelen groei uit het filtraat te verkrijgen op allerhande media, aeróob noch anaeróob, hebben ons ervan overtuigd", aldus de Engelsche auteurs, „dat wij bij de influenza met een echte virusziekte te doen hadden. Wij hebben een aantal bacteriën bestudeerd, afkomstig van menschen en fretten, en slaagden er niet in een microörganisme te ontdekken, dat de typische ziekte nabootste, wanneer culturen ervan gedruppeld werden in den neus van een fret. *Haemophilus influenzae*, *H. canis* en *H. influenzae suis*, tezamen met het virus toegediend, gaven slechts lichte wijzigingen van de symptomen".

Hiermee was dan voor het eerst een agens ontdekt, dat ten opzichte van de influenza voldeed aan de beginselen, die zijn neergelegd in de postulaten van Koch. In de afscheiding van zieke slijmvliezen van influenza-patiënten, en uitsluitend in die van influenza-patiënten, was een filtreerbaar agens, een virus, aangetoond, dat bij een geschikt proefdier de ziekte experimenteel

opwekte, terwijl met dit proefdier het virus door herhaalde passages in kweek kon worden gehouden.

Immunitetsproeven. Identiteit van de infectie bij mensch en dier. — Het sluitstuk op de bewijsvoering werd geleverd door de immunitetsproef.

„Fretten, die hersteld waren van de ziekte, bleken steeds immuun tegen volgende infecties met denzelfden virusstam. Dit gaat op, wanneer de immunitetsproef wordt gedaan enkele dagen na het verdwijnen der symptomen, zoowel als vijf of zes dagen later... Geen andere wijze om een actieve onvatbaarheid te verzekeren is totnogtoe gevonden, dan alleen door het verwekken van de ziekte zelf”.

Reeds bij hun eerste onderzoek zijn Smith c.s. verder gegaan in immunologische richting. Zij stelden vast, dat het serum van een reconvalescent fret in staat was virussuspensie te neutraliseeren. Een mengsel van dit serum en de suspensie bleek, bij een proefdier intranasaal geënt, onwerkzaam. Normaal frettenserum mist dit neutraliseerende vermogen, zelfs ten opzichte van verdund virus.

En dan volgt het overtuigende bewijs van de identiteit van de influenza-infectie bij mensch en proefdier.

„Vele menschersera zijn in staat om verdund frettenvirus te neutraliseeren. Sera, verkregen van tien patiënten, na herstel van influenza, bleken alle neutraliseerende antilichamen te bevatten... Drie sera van personen, die geen recenten aanval van influenza hadden doorstaan, werden eveneens onderzocht. Eén toonde neutraliseerende eigenschappen; de beide andere waren onwerkzaam. Een dergelijke uitkomst was te verwachten bij het onderzoeken van een bevolking kort na een influenza-epidemie”.

Ziehier het geheele influenza-onderzoek in ovo. In deze eerste publicatie wordt, na de aetiologie in beginsel te hebben opgehelderd, reeds een blik geslagen op het ruime veld van de epidemiologie.

Een ongezochte bevestiging van de beteekenis van het op fretten gebrachte virus als uitsluitende oorzaak van een klinisch als humane influenza verloopend geval werd geleverd door de laboratoriuminfectie, welke een der medewerkers aan het onderzoek, Stuart Harris⁶, opdeed bij het waarnemen van fretten, die geïnfecteerd waren met het influenza-virus, dat sedert de isoleering uit een

menschelijk ziektegeval 196 maal over fretten was gepasseerd. Acht en veertig uren na het contact met de zieke dieren — één had op korten afstand van den onderzoeker hevig geniest — werd Stuart Harris ziek met een typische influenza, plotseling begonnen met coryza, slapeloosheid, stijfheid, en verder verlopend met hoofdpijn, rugpijn, duizeligheid, pharyngitis, tracheïtis met pijnlijke hoest, samengaand met hooge koorts gedurende drie dagen. Een tweetal fretten, geënt met het keelspoelsel van den patiënt in de eerste ziektedagen, reageerden met een typischen aanval van fretteninfluenza. Bij sectie vertoonden zij zelfs aandoeningen van de longen. Deze hadden zich nog nooit voorgedaan bij fretten, rechtstreeks met materiaal van patiënten geënt, maar plachten pas op te treden, nadat het virus door een aantal passages bij het fret was aangepast. De omstandigheid, dat het van Stuart Harris geïsoleerde virus aanstonds bij de fretten de long aantastte, wees er heel duidelijk op, dat de onderzoeker zich met het pneumotrope passagevirus had geïnfecteerd. De proef op de som werd geleverd door de antilichamentitratie in het bloed van den patiënt met geregelde tusschenpoozen. Het serum toonde een gestadige stijging in antilichamentiter tegen den frettenvirusstam, door de Engelsche onderzoekers den WS-stam genoemd. Deze is afkomstig uit de epidemie van 1933 en wel van het influenza-ziektegeval van Wilson Smith zelf. De afkorting van zijn naam is als kenmerk voor den stam gekozen.

Het werk van Shope over varkensinfluenza. — Wij hebben de verdiensten van Wilson Smith c.s. zeer ruim uitgemeten door hun onderzoek klassiek te noemen. Deze waardeering gronden wij niet op de tot hiertoe beschreven studie alleen; in de volgende jaren hebben de Engelsche onderzoekers het influenza-onderzoek in vele bijzonderheden op voorbeeldige wijze uitgewerkt. Zij bleven daarbij steeds binnen het kader der bacteriologie, epidemiologie en kliniek, met den nadruk op de eerste van deze drie. Chemisch-fysische studies omtrent den aard van het virus beschouwden zij als liggend buiten hun eigen terrein.

Wilson Smith⁷ zelf legt er intusschen den nadruk op, dat hij en zijn medewerkers voor een niet gering deel er toe gebracht zijn te zoeken in de richting van een influenza-virus door hetgeen hij noemt het „schitterende werk van Shope”. Deze onderzoeker, werkend aan het Departement for Animal Pathology van de Rockefeller Institution te Princeton N.J., had in de jaren 1931—1932 de aetiologie opgehelderd van de varkensinfluenza of „hog flu”, die

het eerst als specifieke ziekte bij varkens was herkend in het najaar van 1918. Allereerst slaagde Shope⁸ er in regelmatig uit de luchtwegen van de zieke dieren een *Haemophilus* te isoleren, die hij *H. influenzae suis* noemde. Pogingen om door intranasale enting met reine culturen van deze bacterie de ziektesymptomen op te wekken, mislukten ten eenen male. Wel gelukte het Shope⁹ experimenteel bij de varkens een ziekte te veroorzaken, hoogst besmettelijk en met een incubatietijd gelijk aan die van de varkensinfluenza, met filtraten van bronchiale klieren en longen. Deze „filtraatziekte” verliep echter zeer mild in tegenstelling tot de oorspronkelijke ziekte, die steeds een mortaliteit van 1 tot 4 procent meebrengt. Tenslotte probeerde Shope de enting met filtraat en *Haemophilus*-cultuur samen, en nu ontwikkelde zich experimenteel het typische ziektebeeld van de „hog-flu”. In 1932 voegde Shope¹⁰ aan de artikelen, waarin hij de bovenstaande vondsten bekend maakte, er een toe, waarin hij vaststelde, dat alleen de filtraatziekte een rol speelde bij het verwekken van immuniteit.

In 1934 bevestigde Shope¹¹, maar nu op zijn beurt in het voetspoor van Smith c.s., dat het varkensinfluenza-virus voor fretten pathogeen was en verklaarde de onderzoeker, dat hij heftiger ziekteverschijnselen bij de fretten verkreeg, als hij deze dieren onder aethernarcose entte, waarop Smith deze werkwijze ook tot de zijne heeft gemaakt. Shope was tot narcotiseeren overgegaan, teneinde de hinderlijke niesreflex van de fretten bij het indruppelen van de virussuspensie te voorkomen.

De influenza-virusinfectie bij de muis. — Het was met het over fretten gepasseerde varkensinfluenza-virus van Shope, dat Andrews, Laidlaw en Smith¹² er het eerst in slaagden muizen te infecteeren. Eerst spotten zij frettenlongsuspensie door den borstwand direct in de long; spoedig vonden zij, dat het mogelijk was muizen een kleine hoeveelheid virussuspensie te doen insnuiven, als deze dieren in een aetherroes verkeerden. De aldus bewerkstelligde intranasale enting is de gebruikelijke gebleven en wel met een hoeveelheid van 0,05 cm³. Na vier dagen werden bij sectie longlaesies bij drie van de zes muizen aangetroffen. Van de aangetaste longen werd een suspensie gemaakt voor de volgende enting. Na een aantal passages over muizen werden fretten nasaal met het muizenlongmateriaal geënt. Na een aanval van typische fretteninfluenza bleken zij immuun tegen den oorspronkelijken frettenvirusstam. Hiermee was de identiteit van het muizen- en het frettenvirus bewezen.

Op gelijke wijze werd vervolgens het menscheninfluenza-virus, afkomstig van het voorjaar 1933, na 98 maal over fretten gepasseerd te zijn, op muizen geënt en met goed gevolg bij deze soort aangepast.

De beschrijving, die de Engelsche onderzoekers geven van de influenza bij de muis, is even voorbeeldig als die, welke zij gaven van de frettenziekte.

„Drie of vier dagen na de infectie gaat het haar rechtop staan, de muizen worden minder actief, verliezen den eetlust en blijven samenhokken in een hoek van de kooi, de oogen half dicht. Later wordt de ziekte gekenmerkt door versterkte adembewegingen, langzamer dan bij normale muizen. De dieren kunnen reeds den derden of vierden dag sterven, maar de symptomen kunnen ook veertien dagen aanhouden voor de dood intreedt.”

Deze beschrijving geldt, naar zij verder mededeelen, voor muizen, die een zware infectiedosis hebben gekregen; bij lichtere entingen kan na doorstane ziekte beterschap intreden. Er wordt voorts vastgesteld, dat bij sectie alleen afwijkingen worden gevonden in de longen. Het influenza-virus is voor muizen uitsluitend bronchopneumotroop en laat de neus-keelholte onaangetast. De aangedane longen vertoonen diep rood gekleurde gedeelten, „die in water zinken”. Het proces gaat veelal uit van den hilus en is meestal over alle lobi verspreid. In vele gevallen blijken de zieke deelen bacterievrij te zijn. De filtreerbaarheid van den verwekker van de typische muizeninfluenza werd nagegaan met behulp van Elford's gradocol-filters met een gemiddelde poriënwijdte van 0,6 μ .

De invoering van de muis als proefdier was een groote stap vooruit in de techniek van het influenza-virusonderzoek. Nadat eenmaal het virus op fretten was geïsoleerd, kon het op muizen worden aangehouden voor verdere proefnemingen. Het werken met het influenza-virus kwam op deze wijze binnen het bereik van laboratoria, die niet over groote aantallen fretten en over de inrichting, welke daarvoor noodig is, beschikken.

Francis' onderzoek in Amerika. — Intusschen had zich in Amerika, waar Shope zijn varkensinfluenza-virus had geïsoleerd, ook het onderzoek van het menscheninfluenza-virus ontwikkeld. Thomas Francis Jr. ¹³, van de International Health Division der Rockefeller Foundation te New York, slaagde er in September 1934 in, uit sputummateriaal, in 50 % glycerine geconserveerd, hem toegestuurd van een influenza-epidemie op Porto Rico, het influenza-

virus op fretten over te brengen. Tot zoover wandelde hij in het voetspoor van Smith c.s., doch spoedig vond hij, gelijktijdig met de Engelschen en onafhankelijk van hen, dat het virus op muizen kon worden overgebracht. Ook hij beschreef de „extensieve pneumonie”, waaraan deze dieren ten gronde gaan. Francis vond tevens, dat het virus ook bij fretten longafwijkingen veroorzaakte, na een periode van aanpassing (6e passage). Als eerste slaagde hij er in, bijgestaan door Magill¹⁴, het virus te kweken in een voedingsbodem, bereid uit Tyrode-oplossing, waaraan een weinig suspensie van fijngemaakte kippenembryonen was toegevoegd, hetgeen weer een nieuw perspectief opende voor het werken met het influenza-virus.

Het door Francis afgezonderde virus, naar de herkomst van Porto Rico met de voorletters van dit eiland PR8 genoemd, heeft naast den door Smith in 1933 geïsoleerden stam WS zijn weg gevonden als laboratoriumstam over de geheele wereld.

Overeenkomstig den aard van het land kenmerkte het Amerikaanse influenza-onderzoek zich door een groote uitgebreidheid. Terwijl Andrewes, Laidlaw en Smith¹⁵ in de eerste maanden van 1935 acht gevallen bestudeerden, afkomstig van garnizoenen uit de omgeving van Londen (Woolwich en Shorncliffe), waaruit zij 8 virusstammen isoleerden, kreeg Francis zijn materiaal per Pan American Airways toegezonden uit Alaska, waar het optreden der influenza bestudeerd werd door Pettit, Mudd en Pepper¹⁶. Uiterst belangwekkend is het relaas, dat deze auteurs geven van de verspreiding van de epidemie, die in den winter 1934—1935 vooral in het Oosten der Vereenigde Staten heerschte, via de Pacific-haven Seattle naar het hooge Noorden. De ziekte volgde de luchtlijn over Fairbanks en Nome naar Point Barrow aan de IJszee. De omstandigheid, dat de nederzettingen in dit noordelijk territorium geïsoleerd liggen, maakte het mogelijk den loop der epidemie stap voor stap na te gaan. Als merkwaardigheid wordt vermeld, dat de besmetting naar het uiterste Noord-Westen moet zijn overgebracht door een reisgezelschap, waarvan niemand influenza heeft gehad. Een van hen moet als virusdrager hebben gefungeerd ten opzichte van de Eskimo's in Point Barrow, onder wie 15 gevallen met doodelijken afloop voorkwamen op een bevolking van 300 zielen. De Eskimo's zorgden voor de verspreiding naar een afgelegen, nog Westelijker gelegen plaats, via de hondensleeroute.

In Point Barrow werden keelspoelsels genomen en per vliegtuig naar New York opgezonden, waar Francis uit het gemengde

materiaal het virus afzonderde. Sera werden in dezelfde plaats van patiënten gewonnen en doorgezonden naar Andrewes, Laidlaw en Smith voor immunologisch onderzoek.

In dezelfde periode isoleerde Francis een virusstam uit materiaal van Philadelphia. Zoowel dezen stam „Phila” als den stam „Alaska” bevond hij immunologisch identiek met den stam van Porto Rico (PR8) uit September 1934, zoodat het voor de hand lag te concludeeren, dat één en hetzelfde virus oorzaak was van het epidemisch optreden der influenza over heel het grondgebied der Vereenigde Staten, van de tropen tot de boorden van de IJszee.

Burnet's werk in Australië. — Nadat eerst in Europa, toen in Amerika, de hand gelegd was op het influenza-virus, werd het in Juni 1935 geïsoleerd door Burnet¹⁷ van het Walter and Eliza Hall Institute te Melbourne, tijdens een epidemie in Australië. Nog in hetzelfde jaar kon Burnet¹⁸ melden, dat hij er in geslaagd was het virus te kweken op het chorion-allantoïsvlies van bebroede kippeneieren; hij deed ook zijn immuunproeven met op dezen voedingsbodem gekweekt virus. De Australische onderzoeker verrijkte zodoende het influenza-onderzoek op zijn beurt met een nieuwe methode, die zeer bruikbaar is gebleken.

Het vasteland van Europa. — Nog ten tijde van het baanbrekende werk, dat wij tot nu toe vermeldden, werd het influenza-onderzoek, zij het in bescheidener stijl, aangevat in Nederland. In het voorjaar van 1935 gingen Bijl en Domisse¹⁹, van het Instituut voor Praeventieve Geneeskunde te Leiden, na, of de te dien tijde in hun omgeving heerschende influenza veroorzaakt werd door een virus, identiek met het Engelsche WS-virus. Zij ontleenden hun materiaal aan drie ziektehaarden: te Leiden, te 's-Gravenhage en te Vreeswijk. Zij entten fretten met het gorgelwater van 8 influenza-patiënten en van 1 lijder aan bronchopneumonie. Bij het laatste geval konden zij geen virus aantoonen, ook niet bij influenza-patiënten op den 7en of lateren ziektedag. De fretten, die geïnfecteerd waren met gorgelwater van den 1en, 2en en 3en ziektedag, vertoonden de typische symptomen der experimenteele fretteninfluenza. Tegen een enting, 6 weken later, met Engelsch virus van den stam WS, toonden de dieren zich immuun. Omgekeerd waren fretten, die tevoren van WS-virus ziek waren geweest, onvatbaar voor het Hollandsche entmateriaal. Hiermede konden de onderzoekers hun doel bereikt achten; zij

hadden aangetoond, dat de Nederlandsche influenza-gevallen veroorzaakt werden door een agens, immunologisch gelijk aan het influenza-virus van Wilson Smith. Filterproeven worden door de Nederlandsche auteurs niet vermeld, maar zij hebben niet verzuimd aan te toonen, dat de bacterieele flora, die zij in de neusafscheiding van de zieke fretten aantroffen, op zichzelf niet in staat was de ziekteverschijnselen te veroorzaken. Het werk van Bijl en Domisse, hoewel beknopt van omvang, mag met erkentelijkheid worden genoemd. Het influenza-onderzoek, eenmaal te Leiden aangevat, is onafgebroken voortgezet. Het Instituut voor Praeventieve Geneeskunde bleef steeds een bijzondere voorliefde voor dit onderzoek toonen; van dit Instituut zou ook de steun uitgaan voor de vestiging van een afzonderlijk laboratorium voor Influenza-onderzoek te Groningen.

Als behoorend tot het eerste — wij zouden mogen zeggen — verkennende stadium van het influenza-onderzoek moet nog de eerste vaststelling van het virus in Oost-Europa worden vermeld.

In 1936 isoleerde Smorodintseff²⁰ van de Afdeeling Filtrerbare Vira aan het Instituut voor Experimenteele Geneeskunde der Sovjet-Unie, het influenza-virus tijdens een hevige epidemie, die alleen te Leningrad 500.000 ziektegevallen opleverde. Smorodintseff en zijn medewerkers volgden de werkwijze, aangegeven door Wilson Smith, met dien verstande, dat zij slechts over enkele fretten beschikten. Hun verslag is interessant om het zeldzaam geluk, dat zij hadden met deze enkele proefdieren. Twee fretten kregen elk binnen twee dagen onder aethernarcose twee intranasale entingen met in het geheel 1 cm³ ongefiltreerde keelspoelsels van een aantal patiënten, gemengd. Een der fretten werd typisch ziek; op het hoogtepunt van de ziekte werden neusslijm en keelspoelsel van het fret geënt bij 5 jonge muizen onder aethernarcose. Deze werden 6 dagen later gedood; van twee dieren vertoonden de longen aangetaste delen, die bacterieel steriel waren. Bij de 5e passage gingen alle muizen dood op den 4en tot 7en dag, met volledig aangedane longen. Het virus werd immunologisch gelijk bevonden aan WS, hetgeen door Andrewes werd bevestigd. Smorodintseff meent zelf zijn welslagen te moeten verklaren door de hoge virulentie van het virus van Leningrad en wellicht ook door de, door hem ingevoerde, dubbele enting van het fret, op twee achtereenvolgende dagen, met ongefiltreerd materiaal. Smorodintseff, op ietwat hachelijke manier in het bezit gekomen van zijn eersten virusstam, paste in zijn verder onderzoek een gedurfd experiment toe. Hij liet een vijftal vrij-

willigers fijn verdeeld influenza-virus inademen, gedurende 30 minuten, 2 dagen achtereen. De slachtoffers kregen typische influenza. Later hebben de Russische onderzoekers dezelfde inhaleermethode toegepast met anti-influenza-serum als therapeutikum en ook als prophylacticum (Hoofdstuk VI).

Ontwikkeling van centra voor influenza-onderzoek. — De eigenaardige eischen, die het werken met het fret als proefdier stelt, is wel een van de hoofdoorzaken geweest, dat het influenza-onderzoek, alhoewel een infectieziekte betreffend, waarvan de clinische en epidemiologische beteekenis zoo groot is, tot eenige weinige centra is beperkt gebleven.

Aan de opsomming van Instituten, waar oorspronkelijk werk werd gedaan, en niet uitsluitend of hoofdzakelijk met van elders verkregen virusstammen werd geëxperimenteerd, kunnen in hoofdzaak worden toegevoegd: de influenza-afdeeling van het Staatsinstituut voor Hygiëne te Boedapest, waar Taylor van de Rockefeller Institution belangrijk werk deed, in samenwerking met Dreguss, en het Laboratorium voor Influenza-onderzoek te Groningen. Het werk van deze laboratoria begint echter in een periode, waarin de techniek van het onderzoek al in meer details is uitgewerkt.

De fijnere techniek heeft bijzonderheden van het virus aange-toond, waarop in het begin de aandacht nog niet kon vallen.

De ontdekking der antigene structuur. — De hiervoor bedoelde bijzonderheden betreffen bovenal de antigene structuur van de verschillende influenza-virusstammen. In de jaren 1936—1937 konden zoowel Wilson Smith als Francis de tot dan toe geïsoleerde virusstammen als identiek beschouwen. In October 1936 gaf Francis ²¹ op de jaarvergadering van de American Public Health Association, gehouden te New Orleans, een overzicht over den stand van het onderzoek. Na al de plaatsen te hebben opgesomd, waar de aanwezigheid van het influenza-virus was vastgesteld, zeide hij: „Nog belangrijker is het, dat de virusstammen, voorzoover kan worden bepaald met de gebruikte methoden, immunologisch niet te onderscheiden zijn.” Smith ⁷ op zijn beurt, in een rede in St. Mary's Hospital op 8 Juni 1937, verklaarde nog: „Virusstammen zijn tot nog toe afgezonderd van influenza-patiënten over de geheele wereld... Het is een zeer belangrijk punt, dat al deze stammen, voorzoover zij bestudeerd zijn, in dit land en elders, identiek zijn van antigene structuur of uiterst nauw verwant.”

Een tweevoudige methode tot immunologische identificatie was tot dan toe in gebruik: de kruisimmunoproef met fretten en de kruisneutraliseeringsproef met muizen.

De kruisimmunoproef werd zoo uitgevoerd, dat een fret, dat, als gevolg van enting met materiaal afkomstig van een patiënt, een influenza-infectie heeft doorgemaakt, na hersteld te zijn, opnieuw geënt wordt met een reeds bekenden stam, b.v. WS. Blijkt het dier hiertegen immuun, dan wordt de eerste infectie beschouwd als te zijn veroorzaakt door een identiek virus. Inderdaad bleek de kruisimmunoproef bij alle geïsoleerde stammen op identiteit te wijzen. Op deze proef steunend, besloten ook Bijl en Domisse tot de aanwezigheid van een met het Engelsche identiek influenza-virus als verwekker van de door hen bestudeerde epidemie.

Een schaduw op deze methode werd geworpen door de bevinding, dat ook het doorstaan van de varkensinfluenza het fret immuniseerde tegen het menscheninfluenza-virus. Andrewes, Laidlaw en Smith voerden om die reden een tweede methode in, de kruisneutraliseeringsproef.

Bij de kruisneutraliseeringsproef met muizen gingen zij na, of het filtraat van een nieuwen virusstam geneutraliseerd werd door een door hen bereid standaard-immuunserum, verkregen door hyperimmuniseering van een paard met WS-virus: het I(nfluenza) H(orse) 2-serum. De neutraliseering in vitro, dat wil dus zeggen het onwerkzaam maken van het virus, wordt aangetoond door de zoogenaamde muisbeschuttingsproef. De proef werd voor dit doel uitgewerkt door Laidlaw, Smith, Andrewes en Dunkin²². Bij hun proeven bleken alle onderzochte menschenvirusstammen in gelijke mate geneutraliseerd te worden door het IH2-serum, zoodat ook op deze wijze geen antigene verschillen van eenig belang voor den dag kwamen, zelfs niet tusschen Engelsche en Amerikaansche stammen als WS en PR8, die toch karakteristieke verschillen vertoonen in virulentie voor fretten en muizen. Tusschen varkens- en menscheninfluenza-virus wees de kruisneutraliseeringsproef echter wel op een antigeen verschil.

Het werk van Francis en Magill. — De schaduw van het varkensinfluenza-virus liet den onderzoekers geen rust. Het feit, dat het fret, eenmaal immuun geworden tegen een humanen stam, tevens immuun was tegen het varkensvirus, terwijl anderzijds paardenimmuunserum alleen antilichamen bevatte tegen het virus, dat voor de bereiding gebruikt was, hetgeen ook het geval bleek

met immuunsera van konijnen, bereid door Francis en Shope²³, deed bij de onderzoekers de gedachte opkomen, dat het menschen en het varkensvirus bepaalde antigenen gemeen zouden hebben en dat elk voor zich bovendien nog andere antigenen bevatten zou. Eenmaal op dezen weg, gingen Magill en Francis²⁴ verder en breidden de gedachte uit tot de verschillende humane influenza-stammen.

Daar het fret hun om bovengenoemde redenen ongeschikt leek, deden zij hun proeven met antiserum, verkregen van konijnen (evenals het paard onvatbaar voor influenza), terwijl zij met weefselcultuurvirus werkten als voorraad van de verschillende stammen. De konijnen kregen intraperitoneaal 2 cm³ virussuspensie ingespoten en leverden na 9 tot 15 dagen bloed. Het serum werd in de neutraliseringsproef getest tegen de homologe en tegen eenige heterologe stammen. Aanstonds kwamen er verschillen voor den dag, zoowel tusschen de humane stammen PR8 en Phila onderling, als tusschen deze en het varkensinfluenza-virus.

Op dezen weg voortgaande onderzochten Magill en Francis²⁵ 24 stammen, afkomstig uit Amerika, Engeland, Australië en Hongarije, waarvan elk tegen alle andere werd getest. Het resultaat van deze omvangrijke proef was verrassend. Vrijwel tusschen alle stammen bleken er verschillen in antigene structuur te bestaan, in dier voege, dat een rangschikking schier onmogelijk leek. „Terwijl er grove groepen kunnen worden gemaakt, neigen deze er toch toe om in elkander over te gaan”, aldus de auteurs. „In verschillende gevallen bezitten stammen eigenschappen, die hen in meer dan één groep plaatsen. Van belang is het, dat de stammen, die elkander schijnen te naderen, in het algemeen tot dezelfde epidemie behooren... toch kunnen blijkbaar verschillende stammen geïsoleerd worden uit dezelfde epidemie.”

Hoe weinig bevredigend deze uitkomst ook mocht zijn uit een oogpunt van strenge classificatie, de bevestiging, die er door geleverd werd voor de opvatting, dat het influenza-virus een mozaïek van antigenen bevatte, „zoodat iedere stam gekenmerkt wordt door zijn eigen antigenenpatroon”, was belangrijk genoeg.

Francis en Magill²⁶ bevestigden het bereikte resultaat door met niet minder dan 16 stammen kruisimmunoproeven en wel bij muizen uit te voeren. Zij vonden, dat de antigene verschillen weerspiegeld werden in een tekort aan wederzijdsche immuniteit; dat dit tekort echter werd vereffend door langdurige immunisering. Dit was in overeenstemming met hun bevinding bij het vorige onderzoek, dat het serum van konijnen na herhaalde immunisering

in de neutraliseeringsproef meer heterologe antilichamen vertoonde dan na een enkele inspuiting.

De antigeen-analyse door Wilson Smith en Andrewes. — Reeds voor de publicatie van de Amerikaansche resultaten hadden Burnet²⁷ in Australië, werkend met fretten-antisera tegen virusstammen, gekweekt op eivliezen, en Andrewes²⁸ in Engeland, gebruik makend van frettensera tegen muizenlongvirus, verschillen tusschen afzonderlijke virusstammen vastgesteld. Onmiddellijk aansluitend op de mededeeling van de Amerikaansche onderzoekers, verscheen het verslag van de uitgebreide antigeen-analyse, waaraan Smith en Andrewes²⁹ 28 influenza-virusstammen onderworpen hadden, waaronder de voornaamste tot dan toe geïsoleerde uit Engeland (17), Amerika (8), Hongarije (1), Rusland (1), Duitschland (1) aanwezig waren.

De Engelsche onderzoekers weken in 3 punten van de Amerikaansche werkwijze af: ze gebruikten frettenimmunsera inplaats van konijnensera, muizenvirus inplaats van weefselcultuurvirus en bezigden een andere manier van aflezen van het resultaat der neutralisatie bij de muis. Francis beoordeelde den uitslag der virusneutraliseering naar het al of niet dood gaan van de muis voor den 10en dag, dan wel naar het al of niet aanwezig zijn van longafwijkingen bij sectie van de op dien dag gedoodde muis. Smith doodde de muizen op den 4en of 5en dag en beoordeelde den graad der longlaesies.

Het is niet gemakkelijk de voor- en nadeelen van beide werkwijzen tegen elkander af te wegen. Het is duidelijk, dat de Engelsche methode, om de muizen vroegtijdig te doden, reden van bestaan had, als gewerkt werd met een hoogvirulent virus zooals WS, dat minstens 1.000.000 minimale letale doses per 0,05 cm³ (de hoeveelheid, welke de muis krijgt ingedruppeld bij intranasale enting) bevatte. Smith gebruikte het gefiltreerde virus 10 maal verdund. Francis' cultuurvirus bevatte 100 tot 1000 letale doses per 0,05 cm³, het was dus minder virulent. Hij vermeldt intusschen, dat de meeste van zijn stammen dezen virulentiegraad vrij constant bezaten; Smith spreekt er daarentegen van, dat hij ook met virusstammen werkte, die niet eens in staat waren muizen te doden.

Het bezwaar van de geringe specificiteit der frettensera, waarop Francis gestuit was, werd door Wilson Smith evenmin als door Burnet ondervonden. Bovendien genoten zij het voordeel, dat de frettensera in belangrijk hogere verdunning dan de konijnensera virusneutraliseerende werking vertoonden, n.l. tot in 1/250

of 1/1250 tegen het homologe virus en tot in 1/10 of 1/50 tegen heterologe stammen. Francis bereikte bij de konijnensera daarentegen slechts een virusneutraliserende titer van 1/40 tegen den homologen stam. Moest hij zijn verdunningsreeks aldus maken: 1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, Smith kon grootere sprongen nemen: 1/2, 1/10, 1/50, 1/250, 1/1250, hetgeen een scherpere aflezing van de titergrens mag doen verwachten en daarmee een betere differentieering.

De uitkomsten van Smith's en Andrewes' proeven bevestigden Francis' resultaten en overtroffen deze zelfs. De Engelsche onderzoekers hadden het geluk drie „specifieke” stammen te voorschijn te zien springen, die zich scherp van elkander onderscheidden; later kon er een vierde specifieke stam aan worden toegevoegd. Wij laten de namen dezer stammen volgen met plaats en jaar van isoleering: WS, Londen 1933, Talmey (Tal), Chatham 1937, Gatenby (Gat), Windsor 1937 en Christie (Chr), Shorncliffe 1937.

„Naarmate er meer stammen werden onderzocht, werd het steeds moeilijker om eenige orde te onderscheiden in den stroom van kruisneutraliseringsproeven”, aldus het verslag van de onderzoekers. „Wij besloten daarom onze pogingen te beperken tot het testen van alle virusstammen tegen hun homologe sera en tegen de antisera van de vier specifieke stammen, en omgekeerd tot het bestudeeren van het vermogen van ieder serum om deze vier virusstammen te neutraliseeren.”

De uitkomst van de aldus uitgevoerde antigeen-analyse was als volgt: een aantal stammen bleek identiek met één van de specifieke stammen of er na mede verwant. Andere vertoonden verwantschap met twee of drie der specifieke stammen; zij konden intermediair worden genoemd. Nog andere bezaten verwantschap met alle vier in ongeveer gelijke mate; zij zouden beschouwd kunnen worden als onspecifieke „hoofdstammen”, omdat zij alle antigenen in zich bevatten.

De door Francis opgezonden, mede onderzochte Amerikaanse stammen, zes in getal, vormden in het schema van Smith en Andrewes een tamelijk homogene groep, intermediair van karakter. De verschillen, die Francis had vastgesteld, kwamen in Smith's proeven niet naar voren, ook niet toen deze de techniek van Francis ten deele overnam en konijnensera bereidde. Hij vond de konijnensera niet specifiekere dan de frettersera. De oorzaak van dit uiteenlopende resultaat „aan weerszijden van den Atlantischen Oceaan blijft derhalve in het duister”, besluit Smith. „Het is waarschijnlijk”, zegt hij verder, „dat Francis en Magill

verschillen bestudeeren tusschen stammen van onze intermediaire groep, verschillen, die wij geneigd zijn te verwaarloozen als zijnde minder treffend dan die, welke wij zijn tegengekomen."

Een viertal hoofdantigenen. — Op grond van zijn proeven nam Wilson Smith de gedachte van Francis, die sprak van een antigenenpatroon, over en sprak de veronderstelling uit, dat er vier hoofdantigenen zouden zijn, waarvan de specifieke stammen er ieder één in overmaat bevatten. Een classificatie zou gegrond moeten worden op het gehalte aan deze antigenen, waaruit dan de verdeeling zou volgen in specifieke stammen, niet-specifieke stammen en intermediaire stammen.

Om de aanwezigheid van een antigenenpatroon te bevestigen, werden absorptieproeven gedaan, waarbij het gelukte een antiserum uit te putten met een heterologen virusstam, en daarna met de neutralisatieproef aan te toonen, dat antilichamen tegen den homologen stam nog aanwezig waren. Deze proeven zijn omslachtig en werden daarom niet op grooten schaal uitgevoerd.

Evenals Francis, maar minder uitgebreid, deden de Engelschen kruisimmunoproeven met muizen. Ook zij vonden, dat vaccinatie het best beschutte tegen re-infectie met den homologen stam.

De draagwijdte der stamverschillen. — Kruisimmunoproeven met fretten hadden, zooals reeds vermeld is, geen sprekende stamverschillen doen onderkennen. Zij brachten ten eerste aan het licht, dat genezen fretten immuun waren ook tegen heterologe virusstammen, zij het, dat de immuniteit tegen zulke stammen korter van duur was dan die tegen den homologen stam. Ten tweede: fretten, die gevaccineerd werden met een bepaalden virusstam, bleken of wel immuun tegen een volgende infectie met een anderen stam, of wel zij reageerden slechts met een zeer mild ziektebeeld, in tegenstelling met de contrôledieren.

Uitdrukkelijk wordt door Smith en Andrewes vermeld, dat al de door hen voor de vaccinatieproeven gebruikte dieren al eens eerder een influenza-infectie hadden doorgemaakt, te lang geleden om nog daadwerkelijk immuun te zijn — dit bleek dan ook bij de contrôledieren. Van deze dieren was blijkens een onderzoek van Stuart Harris, Andrewes en Smith³⁰ echter bekend, dat zij op een vaccinatie reageerden met een sterke stijging van de antilichamentiter. Deze stijging zou berusten op een „basale immuniteit” — wij zouden kunnen spreken van een „rest-immuniteit” — waaraan groote waarde wordt gehecht, omdat deze ook bij den mensch wijd verbreid moet voorkomen.

„In tegenstelling tot de muizenproeven, gaan dus de proeven met fretten in die richting”, aldus de conclusie van Smith en Andrewes, „dat de belangrijkheid der stamverschillen verminderd wordt. Heterologe immuniteit, volgend op het herstel van een infectie, is gewoonlijk op een peil, hoog genoeg om beschutting te bieden tegen groote virusdoses.” Zij waarschuwen echter ervoor, aan deze weinige proeven te veel gewicht te hechten, en achten een vergelijkende proef noodzakelijk met vele verschillende vaccins bij menselijke vrijwilligers in den tijd vóór het uitbreken van een uitgebreide epidemie, waarvan gewenscht wordt, dat ettelijke verschillende virusstammen de verwekkers zijn.

De proef, die hier wordt voorgesteld, is van niet geringen omvang; de voorwaarden tot de verwezenlijking ervan zijn niet weinige! De volgende jaren zouden allerminst gunstig zijn om er uitvoering aan te geven.

De epidemieën van 1936—1937. — De influenza-epidemieën, die in den winter 1936—1937 heerschten, zoowel aan deze als aan gene zijde van den Atlantischen Oceaan, hebben een niet gering deel van de virustammen opgeleverd, die als materiaal dienden voor de beschreven antigeen-analyses. Onderzoekers, die zich, naast de reeds vaak genoemde corypheeën, bij het isoleeren van deze stammen verdienstelijk hebben gemaakt, zijn Brightman en Trask in New Haven, Conn., Hoyle en Fairbrother³¹ te Manchester, Stokes te Philadelphia, Taylor en Dreguss te Boedapest en de medewerkers van Francis te New York: Beck en Rickard³², terwijl Dujarric de la Rivière en Chev³³ in Frankrijk een viertal stammen isoleerden.

Van het onderzoek van de epidemie in December 1936—Januari 1937 te New York verdient afzonderlijk te worden vermeld, dat hier het virus direct van patiënten (5 in getal) intranasaal bij muizen geënt werd, met het gevolg, dat bij de 4e muizenpassage longlaesies begonnen op te treden. Aanleiding om tot deze nieuwe methode over te gaan, was een in het begin der epidemie door Francis en Magill³⁴ verrichte proef. Zij slaagden er in muizen te infecteeren met het sediment van het gemengde spoelsel van twee influenza-patiënten, nadat dit gedurende 3 uren bij hoog toerental was gecentrifugeerd. Als nadeel van de nieuwe wijze van doen geven zij echter op, dat in plaats van de snelle diagnose: virus-influenza, waartoe de influenza-aanval bij het fret in staat stelt, een afwachten van verscheidene muizenpassages geboden is. Dit nadeel is wel belangrijk, als men in aanmerking neemt, dat

een influenza-epidemie binnen 6 weken afgelopen kan zijn.

Een geslaagde proef, om gedurende den winter 1936—1937 het influenza-virus onmiddellijk van patiënten op muizen over te brengen, wordt nog vermeld door Clampit en Gordon³⁵ te Chicago, terwijl Chapman en Hyde³⁶ te Baltimore in dezelfde periode influenza-virusstammen direct uit gefiltreerde keelspoelsels isoleerden op het chorion-allantoisvlies van bebroede kippeneieren.

Wij mogen hier nog vermelden, dat het Wilson Smith c.s. slechts éénmaal gelukte muizen direct met patiëntenmateriaal ziek te maken, en wel in het bijzondere geval Stuart Harris, die zich besmet had met passagevirus van het fret.

In het algemeen houden de oude onderzoekers aan het fret als eerste en de muis als tweede proefdier vast.

De influenza van 1939. — Het eerste algemeene optreden van epidemische influenza na 1937 viel in het begin van 1939. De groote beloften, die de successen van de afgelopen jaren schenen in te houden, werden ten deele door de ten kwade keerende tijdsomstandigheden verijdeld. Veel van het onderzoek, te dien tijde gedaan, is niet meer tot ons kunnen komen, althans niet in uitgewerkten vorm. Bovendien was de epidemie van 1939 van een niet zeer groote hevigheid.

Het onderzoek van Stuart Harris, Smith en Andrewes³⁷ te Hampstead met materiaal uit Eastchurch, Shotley, Sheerness en Haileybury gedurende de periode Januari tot Maart 1939 verricht, leverde geen belangrijke nieuwigheden op, tenzij men als zoodanig wilde aanmerken de grootere moeilijkheid om het virus, dat weinig virulent was, aangepast te krijgen bij de proefdieren. Van 41 keelspoelsels werden slechts 7 virusstammen gekweekt. Van deze 7 stammen gaven er maar 4 een typische koortsreactie bij het eerste fret; de overige verwekten slechts catarrhale verschijnselen. Eerst na herhaalde passages over fretten trad de koortstop op en gelukte het de stammen op muizen over te brengen.

De antigeen-analyse van de nieuwe stammen wees niet op een nieuw specifiek virus. De zes, die werden onderzocht, waren alle nauw verwant, zoowel met Talmey als met Christie, beide van 1937. Zij geleken daarin op de Amerikaansche stammen, welke in 1937 in de groote antigeen-analyse waren betrokken.

Het was tijdens de in het garnizoen te Groningen in Februari—Maart optredende epidemie, dat Mulder³⁸ voor het eerst een Nederlandschen influenza-virusstam isoleerde en volledig beschreef. Evenals de Engelschen ondervond hij de moeilijkheid om bij

de eerste fretten een typisch ziektebeeld te herkennen ; bij de passagedieren kwam de koortstop echter duidelijk naar voren en werden ook de klinische verschijnselen heviger. Aanpassing bij de muis gelukte reeds van het tweede fret af. Mulder vond, dat het geïsoleerde virus, de stam B 1939 (Groningen), sterk van WS verschilde in antigene structuur. Een in den loop van 1940 uitgevoerde antigeen-analyse³⁹ plaatste den Groningschen stam in de nabijheid van den specifieke stam Christie, met eenige toenadering tot Talmey.

Het derde onderzoek, dat in 1939 verricht werd met het doel het influenza-virus te kweken en te analyseeren, is dat van Taylor en Dreguss⁴⁰, die gedurende Januari van dat jaar in Midden- en Oost-Europa niet minder dan 16 stammen afzonderden in verschillende plaatsen en landen.

De weinig hevige reactie van het fret op het virus van 1939 werd in Midden-Europa evenzeer als in Nederland en Engeland onderzocht.

Taylor en Dreguss merkten op, dat ook fretten, die geen koortsreactie vertoonden, wel degelijk virus in neus en longen konden herbergen. In 12 gevallen gelukte het hun het virus direct uit keelspoelsels op muizen over te brengen. Niettemin hebben zij al hun stammen, op één na, via één of meer fretten op muizen overgebracht. In het geheel onderzochten zij keelspoelsels van 19 personen, zoodat hun succes naar verhouding veel grooter is te noemen dan dat van de Engelschen in dezelfde periode.

De antigeen-analyse wees op verwantschap met Christie en Talmey, hetgeen in overeenstemming is met de bevindingen in Engeland en Nederland. Het ziet er dus naar uit, dat het optreden der influenza in 1939 door één soort van virus werd veroorzaakt, in tegenstelling met 1937, toen tijdens dezelfde influenza-periode in den omtrek van Londen alleen al 3 zeer specifieke stammen werden aangetroffen.

Door Patocka⁴¹ werd tijdens de epidemie van begin 1939 in Tsjecho-Slowakije een viertal stammen op fretten geïsoleerd en op muizen overgebracht. Aan een antigeen-analyse werden deze vira evenwel niet onderworpen.

In Australië heerschte een influenza-epidemie in den zomer van 1939. Het ziekteverloop was mild, evenals bij de voorjaarsepidemieën in Europa. Burnet en Lush⁴² slaagden er in 4 virusstammen op fretten te kweken ; ook zij vermelden, dat de eerste passagefretten slechts lichte verschijnselen vertoonden. Het gelukte niet het virus direct op muizen te brengen, wel na eenige fretten-passages.

Vermeldenswaard is het, dat Burnet sedert 1935 geen influenza-epidemie in Melbourne tot ontwikkeling had zien komen: de wereldwijd zich verspreidende influenza van den winter 1936—1937 schijnt Australië niet te hebben bereikt.

In de Vereenigde Staten werden in de eerste maanden van 1939 door Horsfall, Hahn en Rickard ⁴³ vier plaatselijke epidemieën bestudeerd. Het onderzoek leverde een aantal influenza-virusstammen op; ook van deze wordt de geringe virulentie voor fretten vermeld. De antigeenanalyse van 2 dezer stammen bracht geen verwantschap aan het licht met WS en PR8. Andere stammen werden niet in het vergelijkende onderzoek betrokken.

Een nieuw virus in 1940. — Het influenza-virus werd in 1940, althans voorzoover de berichten ons bereikt hebben, niet afgezonderd en ook niet langs immunologischen weg aangetoond. In Groningen werden de sera van een groot aantal patiënten, die geleden hadden aan influenza-achtige aandoeningen, met behulp van de complementbindingsreactie op antilichamen tegen het influenza-virus onderzocht door Hoek †, met negatieven uitslag. *)

Door Amerikaansche onderzoekers wordt intusschen melding gemaakt van een geheel nieuw virus, dat in het begin van 1940 epidemieën verwekte van een ziekte der luchtwegen, welke klinisch niet van influenza was te onderscheiden. De meest volledige mededeeling hieromtrent bezitten wij van Francis ⁴⁴. Deze slaagde er in van een der patiënten, tijdens een epidemie in Irvington, een virus over te brengen op het fret en van het fret op de muis. Het gelukte echter niet dit virus te neutraliseeren met anti-influenza-serum tegen een bekenden stam. Evenmin neutraliseerden patiëntensera van Irvington het influenza-virus. Francis concludeerde, dat hij een nieuw virus in handen had, hetwelk hij naar den patiënt Lee-virus noemde.

Bij een tegelijk heerschende epidemie in North-Carolina bleek een virus te zijn betrokken, dat identiek was met het Lee-virus en dat geen enkele antigene verwantschap vertoonde met het klassieke influenza-virus. Doch ook onderzoek van patiëntensera uit een epidemie van begin 1936, waarvan toentertijd de aetiologie niet had kunnen worden vastgesteld, brachten antilichamen aan het licht tegen het Lee-virus. Tenslotte werd hetzelfde vastgesteld ten aanzien van een door Horsfall bestudeerde influenza-epidemie, welke in West-Indië heerschte tijdens den zomer van 1940.

Francis wijst er met nadruk op, dat deze epidemieën klinisch

*) Niet gepubliceerd.

in geen enkel opzicht afweken van echte influenza-epidemieën. Desalniettemin is het virus, dat erbij betrokken is, immunologisch geheel op zichzelf staand (a serologically distinct entity). Ook de complementbindingsreactie, die in den regel slechts een gemeenschappelijk antigeen in verschillende influenza-stammen onthuld heeft, en derhalve voor de antigeen-analyse van geen beteekenis is, bracht hier geen enkel verband aan het licht. Terwijl de bekende epidemieën van 1936—1937 en van 1938—1939 verwekt werden door het influenza-virus van de gewone variëteit (the usual variety), werden die van begin 1936 en van begin 1940 veroorzaakt door het virus van het Lee-type.

Francis is met zijn ontdekking niet alleen gebleven. Magill en Tyndall ⁴⁵, eveneens in Amerika, vergeleken epidemieën van 1939 en 1940 met elkander en stelden vast, dat deze veroorzaakt werden door vira, die onderling geen immunologische verwantschap bezaten; het virus van 1940 noemden zij TM-virus; de vraag, of dit een influenza-stam was, dan wel een geheel nieuw virus, lieten zij onbeslist.

Uit Engeland beschikken wij over een bericht van Martin en Fairbrother ⁴⁶ te Manchester, die een epidemie bestudeerden, waaruit het influenza-virus niet kon worden geïsoleerd, en waarbij, blijkens het onderzoek van een groot aantal sera met de complementbindingsreactie, dit virus ook niet was betrokken. Zij nemen aan, dat er een bijzonder virus in het spel was, en komen tot de slotsom, dat kliniek en epidemiologie niet voldoende zijn, om de diagnose influenza te stellen.

Door de ontdekking van het influenza-virus in 1933 scheen de influenza door Wilson Smith tot een eenheid gemaakt, aetiologisch onderscheiden van andere acute ziekten der hoogere ademwegen, en de opvatting won veld, dat ook klinisch deze virus-influenza een eigen karakter had. Thans wordt aan deze opvatting, die door de vereenvoudiging, welke zij scheen mede te brengen, zoo bemoedigend werkte op het onderzoek, door ervaren werkers op het gebied van het influenza-virus getornd.

Influenza B naast influenza A. — De Amerikanen Horsfall, Lennette en Rickard, in samenwerking met Andrewes, Smith en Stuart Harris ⁴⁷ van Engelsche zijde, zijn overeengekomen, den vorm van influenza, veroorzaakt door het eerstgevonden virus, aan te duiden met Influenza A. Francis ⁴⁴ sluit zich hierbij aan en stelt voor bij epidemieën, verwekt door virus van het Lee-type, te spreken van influenza B.

Wij kunnen ons troosten met de gedachte, dat op deze wijze weer een begin van orde is geschapen. Ook mag verondersteld worden, dat het misschien nog gelukt de betrokken vira onder één microbiologisch en immunologisch gezichtspunt samen te vatten. Aan den anderen kant moet onder het oog worden gezien de mogelijkheid, dat meer vira worden gevonden, die klinisch op influenza gelijkende ziektebeelden geven. Door Kairies³ wordt het bestaan van meer vira reeds lang, zij het a priori, aangenomen. Hij blijft in talrijke publicaties, die zich over het geheele tijdvak van het influenza-virusonderzoek uitstrekken, pal staan voor een veelvoudige aetiologie van de influenza.

Naar zijn opvatting word het uitbreken van de influenza bepaald door een „onspecifieke provocatie”, die rustende ziektekiemen, ook vira, tot ziekteverwekkers maakt. Worden proefdieren met materiaal van influenza-patiënten geënt, dan doet zich opnieuw een provocatie voor van in het dier rustende kiemen, eventueel vira. De uit het dier geïsoleerde ziekteverwekker behoeft in het geheel niet dezelfde te zijn, die van den mensch afkomstig was. Door Dujarric de la Rivière⁴⁸ werd in 1929 reeds op zulk een mogelijkheid in verband met het influenza-onderzoek gewezen. Kairies⁴⁹ beroept zich o.m. op zijn ervaring, dat met *Haemophilus influenzae* geënte muizen sterven aan een infectie door *Pasteurella*, welke van nature bij de muis voorkomt. De van den mensch afkomstige influenza-bacterie gaat na enkele passages in de muis ten gronde, doch de in het dier sluimerende ziektekiemen worden gewekt tot pathogeniteit.

Het is inderdaad noodig, om bij het influenza-onderzoek met mogelijkheden, als door Kairies bedoeld, rekening te houden. Nooit mogen wij het optreden van experimenteel bij proefdieren verwekte ziekten als door influenza-virus veroorzaakt beschouwen, voor en aler dit immunologisch is bewezen. Wij herinneren er met nadruk aan, dat dit bij het werk, dat wij in dit historisch overzicht bespraken, door de influenza-onderzoekers steeds is gebeurd. De immunologie was bij hen steeds het begin en het einde van hun werk en daarmee is de juistheid van hun gevolgtrekkingen boven allen twijfel verheven.

Dat het uitbreken van een influenza-epidemie niet uitsluitend bepaald wordt door het aanwezig zijn van een virus, wordt ook door ons aangenomen. Omtrent de natuur van de „onspecifieke provocatie”, die het virus op een gegeven oogenblik virulent maakt voor den mensch, tasten wij echter in het duister. Het is wel zeker, dat meteorologische factoren een rol spelen, zooals o.a. Jäschock⁵⁰

tracht aan te toonen. Flohn ⁵¹ gaat zoover van een „Geomedizin der Grippe” te spreken, terwijl Jusatz ⁵² naar een verband zoekt tusschen de periodictiteit der influenza en die der zonnevlekken. Bijdragen tot de aetiologie van de influenza leveren zij uiteraard niet, wel tot de opsporing van de factoren, die aan het virus zijn aangrijpend vermogen schenken of dat versterken.

Influenza A in 1941. — De eerste maanden van 1941 werden door het verschijnen van influenza-epidemieën in vele landen van Europa gekenmerkt; van virus-onderzoekingen, welke elders in dien tijd zijn gedaan, zijn een drietal tot ons doorgedrongen.

Tijdens de epidemie, die in Januari 1941 in Hongarije heerschte, isoleerde Dreguss ⁵³ uit keelspoelsels van patiënten 4 stammen, welke immunologisch influenza A bleken te zijn. Naast de enting op fretten paste hij die op hamsters (*Cricetus cricetus*) toe. Reeds eerder hadden Taylor en Dreguss ⁵⁴ vastgesteld, dat het influenza-virus van fretten en muizen op hamsters kon worden overgebracht. Thans gelukte het deze knaagdieren onmiddellijk met keelspoelsels van patiënten te infecteeren. Ziekteverschijnselen, zooals bij het fret, deden zich niet voor; eenige passages van het neusmateriaal van de hamster op muizen waren noodig om het influenza-virus aan te toonen. Het serum van de herstellende hamsters bevatte antilichamen tegen het influenza-virus. Als voordeel van zijn methode geeft Dreguss op, dat hamsters minder kostbaar zijn dan fretten; als nadeel, dat de infectie bij dit proefdier subclinisch blijft, zoodat pas na eenige muizenpassages de diagnose influenza kan worden gesteld.

Een uitgebreide proefneming, om muizen onmiddellijk met keelspoelsels van patiënten te infecteeren, verliep ditmaal negatief.

Te Florence is door Davoli en Pardi ⁵⁵ het influenza-virus A aangetoond tijdens een epidemie, welke daar heerschte in Januari-Februari. Er werd een enkele virusstam geïsoleerd en in de sera van een aantal patiënten werden antilichamen tegen het influenza-virus van het A-type vastgesteld, zoowel met de neutraliseeringsproef als met de complementbindingsreactie.

Te New York bestudeerden Dalldorf, Whitney en Ruskin ⁵⁶ een epidemie, welke in Januari 1941 optrad in een besloten gemeenschap, waaraan de helft der bewoners in December daaraan voorafgaande tegen influenza gevaccineerd was. Op deze proef komen wij in Hoofdstuk VI terug; op deze plaats dient vermeld te worden, dat langs immunologischen weg het influenza-virus A werd aangetoond.

Over het onderzoek van de epidemie in het begin van 1941 te Groningen ⁵⁷ zal in het vervolg uitvoerig worden bericht. Genoeg zij hier mede te deelen, dat de aanwezigheid van het influenza-virus A met zekerheid kon worden vastgesteld.

Samenvatting. — Nadat in 1931 het varkensinfluenza-virus was ontdekt, werd in 1933 het menscheninfluenza-virus door intranasale enting van gefiltreerde keelspoelsels van patiënten op fretten overgebracht. Directe enting op muizen mislukte; wel kon door enting met passagevirus, afkomstig van fretten, een experimenteele muizeninfluenza worden opgewekt. De longen van de geënte muizen leverden een zeer virulente virushoudende suspensie. Later gelukte het in enkele gevallen het influenza-virus onmiddellijk van den mensch op de muis over te brengen.

Behalve op levende proefdieren werd het influenza-virus gekweekt in suspensies van fijngemaakte kippenembryonen en op het chorion-allantoisvlies van kippeneieren.

Bij fretten, die van een besmetting met menschenvirus genezen waren, werd een immuniteit van beperkten tijdsduur, niet alleen tegen herinenting met menschen-, maar ook tegen die met varkensinfluenza-virus aangetroffen, terwijl in hun serum antilichamen uitsluitend tegen het influenza-virus, waarmede de infectie had plaats gehad, werden aangetoond. Zulke antilichamen werden ook gevonden in de sera van reconvallescente influenza-patiënten.

Nadat het influenza-virus op vele plaatsen ter wereld was geïsoleerd, kwam in 1938 vast te staan, dat er tusschen de tot dan toe gevonden stammen, naast een algemeene antigene verwantschap, duidelijke antigene verschillen bestaan, welke met name tot uiting komen in de virusneutraliseeringsproef, waarbij muizenlongvirus als antigeen wordt gebruikt. Er kon een voorloopige rangschikking in specifieke, intermediaire en onspecifieke stammen worden opgesteld.

De tot heden toe afgezonderde stammen van het klassieke influenza-virus zijn afkomstig uit de epidemieën van 1933—1934, 1936—1937, begin 1939 en begin 1941. In 1940 werd een influenza-virus op fretten, en van fretten op muizen, gebracht, dat geen antigene verwantschap met de tot dan toe gevonden virustammen vertoonde. De toonaangevende onderzoekers kwamen overeen dit virus Influenza B te noemen, terwijl de stammen van het eerstgevonden virus worden samengevat als Influenza A.

De in 1939 en 1941 te Groningen geïsoleerde stammen behooren tot de A-groep.

Een overzicht van enkele der voornaamste geïsoleerde influenza-virusstammen en der in Groningen verkregen stammen wordt gegeven in tabel 1.

Tabel 1. Indeeling van het influenza-virus.

| INFLUENZA-VIRUS. | | | | | |
|---|------------|--|--|--|----------------|
| Virusgroepen met een gemeenschappelijk antigeen | | | | Zonder antigene verwantschap met de nevenstaande groepen | |
| Varkensinfluenza-virus | | Menscheninfluenza-virus A | | Menscheninfluenza-virus B | |
| Aanduiding van den stam | Geïsoleerd | Aanduiding van den stam | Geïsoleerd | Aanduiding van den stam | Geïsoleerd |
| Shope | Iowa 1931 | WS (specifiek) PR8 Melbourne Tal (specifiek) Gat (specifiek) Chr (specifiek) B 1939 D, S en Z | Londen 1933 Porto Rico 1934 Australië 1935 Chatham 1937 Windsor 1937 Shorncliffe 1937 Groningen 1939 Groningen 1941 | Lee | Irvington 1940 |

HOOFDSTUK II.

Werkwijze, in Groningen gevolgd bij het isoleeren van het virus.

Het frettenisoleerhuis. — Het Laboratorium voor Influenza-onderzoek te Groningen, sinds Juli 1940 organisatorisch de Afdeling Acute Longziekten van het Hygiënisch Laboratorium der Rijksuniversiteit, is ingericht door Mulder, nadat hij in December 1937 in de gelegenheid was geweest om aan het Institute for Medical Research te Londen het werk en de werkwijzen te leeren kennen van Wilson Smith, Andrewes en Laidlaw.

Kan het werken met een bepaald influenza-virus en met name het proefnemen met muizen in beginsel plaats vinden in elk laboratorium, dat over een afzonderlijke ruimte voor dit doel en over een proefdierenkamer beschikt, voor het isoleeren van nieuwe virusstammen met behulp van fretten is een inrichting voor het afzonderen van een aantal dezer dieren vereischt. Van 1938 tot 1940 stonden hiertoe vier isoleercellen ter beschikking, welke dienst deden tijdens de epidemie van begin 1939, waaruit de eerste Groningsche stam B 1939 werd gewonnen. Deze cellen, hoewel voldoende aan de noodzakelijke eischen van afzondering, waren uiterst bekrompen van afmetingen en stelden niet in staat tot werk op ruimere schaal. Het verkrijgen van een speciaal frettenlaboratorium werd dan ook spoedig als doel gesteld.

Het voorbeeld daartoe was aanwezig in het fretten-isoleerhuis van de Farm Laboratories van de Medical Research Council te Mill Hill, ingericht terwille van de bestudeering van de hondenziekte (dog-distemper) door Dunkin en Laidlaw⁵⁸ in 1926. Oorspronkelijk was het gebouw ontworpen voor proefnemingen met honden, doch het bleek ongeschikt voor deze bewegelijke dieren; voor deze voldeden afzonderlijke kennels in de open lucht, verspreid over het terrein van het laboratorium, beter.

Daar het bekend was, dat fretten zeer gevoelig voor hondenziekte zijn, en het fret bovendien een dier is, dat zich gemakkelijk laat opsluiten in een kleine ruimte, besloten Dunkin en Laidlaw voor een deel hunner proefnemingen met hondenziekte fretten te gebruiken — vóór hen waren Gray en Sewell er al in geslaagd de hondenziekte experimenteel op deze dieren over te brengen — en zij gingen er toe over het isoleerhuis voor dit deel van het

onderzoek te benutten. Zoo kwam het isoleerhuis tot de bestemming, waarvoor het niet beter had kunnen worden ingericht.

Het wezenlijke van het gebouw te Mill Hill zijn een aantal kamertjes, waarin de proefdieren kunnen worden afgezonderd, 2.50 m bij 1.80 m groot, uitkomend op een centrale ruimte met een grooten lysolbak voor desinfectiedoeleinden. Toegang verkrijgt men door een portaal met ingezonken vloer, waarop 7.5 cm lysol (1 %) staat; ter desinfectie van de voeten. Ieder, die binnengaat, draagt gummilaarzen en een rubberjas, en krijgt een douche met lysol ter desinfectie. Dezelfde maatregel wordt genomen na het verlaten van elk kamertje, waarin een ziek proefdier is opgesloten.

Het fret beweegt zich niet vrij in de isolatiecel, maar wordt gehouden in een zinken kooi of kist, volgens het model, dat Topley⁵⁹ bij het bestudeeren van epidemieën bij muizen gebruikte. De kooi is kubusvormig, meet 40 cm in elke richting en is voorzien van een deksel met lichtgaten. Een glazen plaat maakt het mogelijk de proefdieren te zien, zonder de kooi te openen. De kooien zijn zoo ingericht, dat ze twee aan twee met elkaar in verbinding kunnen worden gebracht, als het dier een schoone behuizing moet krijgen. In iedere isoleerkamer is plaats voor drie kooien.

Het gebouw bestaat uit twee vleugels, die ieder op de beschreven wijze zijn ingericht en die beide uitkomen op een centrale sectiekamer. Het geheel is door Wilson Smith c.s. overgenomen, toen zij in het begin van 1933 hadden gevonden, dat fretten zich lieten infecteeren met een filtraat van keelspoelsel van influenza-patiënten.

De inrichting van het frettenisoleerhuis (fig. 1) in Groningen herinnert in de voornaamste punten aan het Engelsche voorbeeld. Ook hier zijn twee vleugels, elk met isoleercellen. Deze zijn twee maal 9 in getal en elk is 2 m lang, 1 m breed en 2.50 m hoog, met deur en tuimelraam. Wanden, vloeren en zolderingen zijn van cement, zoodat de cellen geheel kunnen worden uitgespoten. Waar de centrale gangen van beide vleugels samenkomen, bevindt zich een betegelde verdieping in den vloer voor de voetontsmetting. Wij zijn er echter nooit toe over gegaan, deze met lysol te vullen, evenmin hebben gummilaarzen en gummi-jas bij ons ingang gevonden en ook de afsputting met lysol is nooit toegepast.

De ontsmettingsmaatregelen, die wij in acht nemen, houden rekening met de omstandigheid, dat het fret zich allermintst vrij door de cel beweegt, maar opgesloten zit in een afzonderlijke kooi, zoodat besmetting van het celinterieur, zoo zij al plaats vindt, in geen geval intens kan zijn. Ook krijgt het fret door de toegepaste wijze van opsluiting geen gelegenheid de schoenen van den be-

zoeker te besnuffelen en zodoende te besmetten, zodat het ontsmetten daarvan overbodig mag heeten. Er echter van uitgaande, dat de besmetting van fret op mensch, en omgekeerd, van den neus of van de keel uit kan plaats vinden, achten wij het dragen van een lapje, dat neus en mond bedekt, een onmisbare voorzorg.

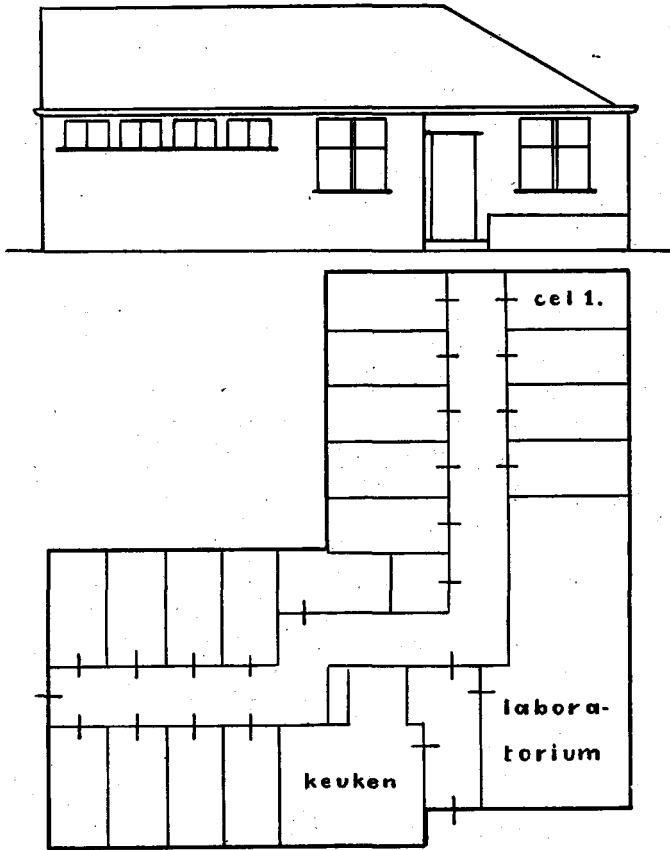


Fig. 1. Frettenisoleerhuis : voorgevel en plattegrond

Verder hangt in iedere isolatiecel een witte jas, die over allé andere kleding wordt aangetrokken en die bij het verlaten van de cel daar wordt achtergelaten. De bezoeker voorkomt daardoor besmetting van de eigen kleding en tevens wordt eventueele indirecte contactbesmetting van fret op fret door middel van die kleding voorkomen. De handen worden na aanraking met het fret en met de voorwerpen in de cel ontsmet met alcohol.

De frettenkooien of isolatiekisten zijn van een vereenvoudigd model: stevige zinken kisten, kubiek, met een ribbe van 40 cm, met gesloten wanden en bodem, voorzien van een los deksel met luchtgaten, dat met eenvoudige sloten en pennen kan worden bevestigd. Tot ontsmetting van de frettenkisten dient een zeer diepe gootsteen, waar zij geheel in lysol kunnen worden ondergedompeld.

De geheele inventaris van een isolatiekamertje bestaat uit een, van een etiket voorziene, zinken frettenkist, een thermometer en een temperatuurlijst. Verder voltooiën een kom met alcohol voor de handen en een tweede met lysol voor de ontsmetting van de etensbak van het zieke dier de inrichting.

Alleen de proefnemer komt tijdens de ziekte van het fret de isoleerkamer binnen. Hij temperatuurt het dier en verwisselt de etensbakken. Alleen bakken, die 24 uur onder lysol hebben gestaan, plaatst hij buiten op de gang, waar de bediende ze afspoelt en met voedsel vult. Bij een volgenden rondgang neemt de experimenterator de gevulde bak mee naar binnen. Deze regeling sluit contactbesmetting van de fretten onderling, via de etensbakken, uit en waarborgt de beveiliging van het laboratoriumpersoneel.

De hier beschreven isolatie- en desinfectiemaatregelen zijn eenvoudig en praktisch door te zetten. Men bedenke, dat het „antiseptische ritueel” van Dunkin en Laidlaw, zooals zij het zelf noemen, opgesteld was in de veronderstelling, dat honden de rumoerige bewoners zouden zijn van hun inrichting. Fretten zijn daarentegen dieren, die zich in een halfduister kist, mits ruim voorzien van droog stroo, tijdelijk uitstekend thuis voelen. Zij maken zich een behagelijk nest en zijn niet zelden na een verblijf van veertien dagen in deze gevangenis, ondanks het doorstaan van een influenza-infectie, in gewicht toegenomen. Bij het openen van het deksel, richten zij zich wel snuffelend tegen den wand op, doch doen zelden regelrechte pogingen tot ontvluchting. Wij hebben in 1941 geen contactbesmettingen bij mensch noch fret waargenomen tijdens het werken met talrijke fretten.

Het fret. — Het werken met het fret heeft ongetwijfeld zijn eigenaardige moeilijkheden. Het fret, een albino bunzing (*Putorius furo*, E. Ferret, Fr. Furet, D. Frettchen) is een roofdier van de Orde der Marterachtigen, niet te verwarren met den hermelijn, die een zwarte staartpunt heeft en kleiner is. Het fret is een huisdier, waarvan de oorsprong onbekend is. Reeds de Romeinen gebruikten het dier voor de konijnenjacht, voor welk doel het nog steeds gefokt en afgericht wordt. In weidmanstaal wordt gesproken van „het”

fret, hetgeen door de Nederlandsche schrijftaal is overgenomen ; in laboratoria kan men niet zelden van „de” fret hooren spreken. Niet alle fretten hebben de kenmerkende geelwitte pels en de rose oogen ; er zijn ook bunzingkleurige exemplaren onder met zwarte oogen (E. pole cat). Zij worden verkregen door er wild bunzingbloed in te teelen. Het laboratoriumfret, dat niet, zooals het jacht-fret, wordt afgericht, blijft een roofdier, dat zich geducht verweren kan. Voor kwaadaardige exemplaren dient men zware leeren handschoenen te dragen. Na eenige ervaring legt de proefnemer het gebruik hiervan, omdat het lastig is, wel weer af. Hij bemerkt, dat goed gevoede dieren wel aan de hand komen snuffelen, maar zelden bijten. Hij leert ook spoedig zijn dieren kennen.

Het temperatuur-opnemen, dat rectaal gebeurt, dulden de fretten in het begin niet ; vele zijn er echter na enkele keeren aan gewend. Er is een gemakkelijke manier om het fret te pakken. Men grijpt met snelle beweging het dier aan de staart. Het keert zich dan niet om, maar tracht weg te loopen, in de richting van de hand af. De gestrekte houding, die het daarbij aanneemt, maakt het gemakkelijk met de andere hand snel en stevig den nek te grijpen, vlak achter de ooren : dan is het fret weerloos.

Het fret kan gehouden worden in geschikte gazen hokken in gezelschap van soortgenooten en maakt dan een levendigen indruk, watervlug en ongenaakbaar. Doch het dier ziet vrij slecht en zijn tamelijk geringe intelligentie maakt, dat er onverwachte reacties niet van te verwachten zijn. Als proefdier is het fret onvergelykelyk veel handelbaarder dan hond en kat, psychisch weinig ontwikkeld, vrij ongevoelig en in het geheel niet schrikachtig. De herinnering aan een reeds eerder ondergane onaangenaamheid schijnt niet of bijna niet te bestaan.

Voor onze voorraadfretten hebben wij een kooi ontworpen, waarin de dieren levendig en gezond blijven. De bodem is van geölied eterniet ; de wanden bestaan uit kippengaas. Openslaande deurtjes, zonder drempel, maken het afkrabben van den bodem op een vlotte manier mogelijk. Twee decimeter boven den bodem bevindt zich een gesloten houten nachthokje met ronde opening. Op den bodem van de kooi wordt houtzaagsel gestrooid, vooral in den hoek waar de dieren mesten ; in het nachthok komt stroo. De kooien zijn zoo gemaakt, dat een drietal zonder bezwaar op elkaar geplaatst kan worden. Tegen kou zijn de fretten goed bestand ; zoolang de hokken droog zijn, vinden zij genoeg warmte bij elkander.

Wij houden de dieren in groepen van 3 tot 5 ; indien zij

samen zijn opgegroeid komen onderlinge vechtpartijen niet voor.

In den zomer doet zich het verschijnsel voor, dat de mannelijke fretten in minder goeden doen raken, erg vermageren en een slechten haargroei vertoonen. Het is dan raadzaam, de dieren in ruime buitenhokken te brengen, waarin zij kunnen voldoen aan hun behoefte aan beweging. In het algemeen moet gezegd worden, dat de beschreven huisvesting berekend is op het onderbrengen van aangekochte dieren. Aan een stal tot het fokken van fretten zouden andere eischen moeten worden gesteld.

Bij het begin der influenza-epidemie van 1941 stond een veertigtal fretten tot onze beschikking, ten deele door ons, ten deele speciaal voor ons gefokt. Daar import sedert Mei 1940 was uitgeschakeld, waren wij geheel op Nederland aangewezen, waar echter een handelsfokkerij van fretten in eenigszins grootere aantallen niet bestaat, zoodat we ons wendden tot personen, die af en toe fretten voor de jacht kweeken.

Het enten van het fret. — Het materiaal, waarmee het fret geënt wordt, is keelspoelsel of sputum van den patiënt, die verdacht wordt van influenza. Om te laten spoelen, worden fleschjes in voorraad gehouden met 50 cm³ half om half steriele physiologische zoutoplossing en voedingsbouillon. De ingezonden spoelsels worden zoo spoedig mogelijk verwerkt, en mocht dit onmogelijk zijn, in de koelkast ingevroren. Om het spoelsel geschikt te maken voor de enting bij het fret, wordt het eenigen tijd flink met glasparels geschud tot het homogeen is. Het wordt niet gefiltreerd wegens het daarmede verbonden virusverlies.

Halverwege de epidemie van 1941 zijn we begonnen sputa van de patiënten te verzamelen. Om deze voor enting geschikt te maken, moeten zij met steriel zand of glaspoeder in een mortier gewreven worden en in sommige gevallen met physiologisch zoutwater verdund, totdat een homogene, goed vloeibare, suspensie is verkregen. Het zand of

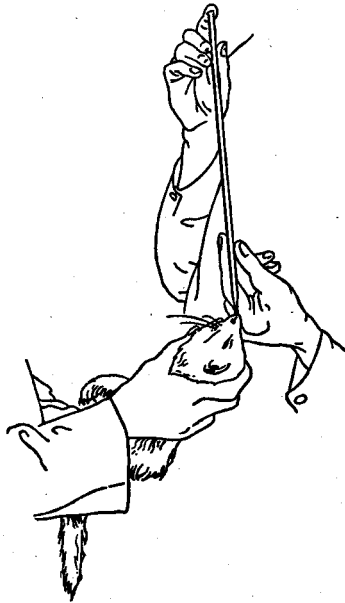


Fig. 2. Het enten van het fret

glaspoeder wordt afgecentrifugeerd. Enting met taai, dradentrekend sputum kan tot verstikkingsverschijnselen van het fret aanleiding geven. Ook sputum-materiaal wordt niet tevoren bacterievrij gefiltreerd, aangezien daarbij een te groot virusverlies plaats heeft (zie later).

De enting van het fret geschiedt als volgt (fig. 2). Met een steriele pipet wordt 0.5 tot 1 cm³ keelspoelsel of sputumsuspensie in den neus van het genarcotiseerde fret gedruppeld. De aethernarcose wordt toegediend door het dier in een emaille schaal te brengen en deze af te sluiten met een glazen plaat. Op den bodem wordt te voren een pluk watten met ruim aether gebracht. Het fret moet geheel slap worden. Zoodra dit het geval is, wordt het door den helper vastgenomen en met den neus naar boven gehouden, zoodat de experimentator den inhoud van de pipet kan laten uitloopen, langzaam, eerst in het eene neusgat, dan in het andere. Is de narcose van de juiste diepte, dan wordt de inhoud regelmatig opgesnoven. Vóór de geheele cm³ is opgenomen, treedt veelal een niesreactie op; zoodra dit gebeurt, wordt het fret in de gereedstaande isolatiekist neergelegd. Tijdens het terugkeeren tot het bewustzijn wordt meestal opnieuw geniest; de ervaring leert echter, dat er genoeg entmateriaal in den neus achterblijft.

Op het deksel van de kist wordt vervolgens een etiket gehecht, beschreven met het nummer van het fret, den naam van den patiënt, datum en uur van de enting, aard van de narcose.

Tweemaal per dag wordt temperatuur opgenomen, rectaal; gewone koortsthermometers zijn daartoe, mits ingesmeerd met wat vaseline, goed bruikbaar. Na 3 minuten wordt de stand afgelezen en ingevuld op de temperatuurlijst.

De klinische verschijnselen van de fretteninfluenza. — De 3 minuten, gedurende welke men de temperatuur opneemt, leenen zich er tevens geschikt toe om den klinischen toestand van het dier te observeeren. Het zieke fret, dat hooge koorts heeft, voelt slap en warm, soms klam aan. Bij hevige conjunctivitis en rhinitis loopt een etterige afscheiding uit oogen en neus, met als gevolg, dat de oogleden soms dichtkleven en zich dikwijls een bruine korst vormt om neus en mondhoeken. Is de afscheiding minder hevig en is het dier minder ziek, dan moet in aanmerking genomen worden, dat het dier zich zooveel mogelijk schoonlikt. Het neusexcreet kan dan het beste worden waargenomen na de momenten, dat het fret geniesd heeft. Het veelvuldig niezen is bij vele geïnfecteerde fretten kenmerkend. Om niesbuien waar te nemen is echter vaak een

langer verblijf dan 3 minuten in de cel vereischt. Het hoesten, dat beschreven wordt van fretten, die met een door herhaalde fretten-passages aangepast pneumotroop virus geïnfecteerd zijn, hebben wij tijdens de epidemie van 1941 niet waargenomen. Wel was dit het geval bij de epidemie van 1939.

Gedurende den incubatietijd, de eerste 24 tot 48 uur, gedragen de fretten zich normaal, ieder naar zijn eigen aard. Sommige zijn wild en springen tegen de wanden van de kooi op, zoodra zij iemand hooren. Zij verweren zich hevig tegen temperaturen en trachten verwoed te bijten. Andere zijn rustig en laten zich gemakkelijk grijpen en geduldig hanteeren. Het is goed dit gedrag aanstonds op de temperatuurlijst aan te teekenen. Het kan een handwijzing zijn bij de beoordeeling van het gedrag gedurende de volgende dagen, dat het dier ziek wordt; bij van nature wilde dieren kan het contrast treffend zijn; bij rustige dieren moet op fijnere verschillen worden gelet.

Een niet zeer betrouwbaar symptoom is het verlies of liever het niet-verliezen van de eetlust. Het is immers bekend, dat roofdieren, die een doodelijke ziekte onder de leden hebben, blijven eten, tot ze er bij neervallen. Vele fretten blijven tijdens een zeer duidelijk ziekteverloop geregeld hun bak leegeten. Pas in de ernstigste gevallen, waarin het dier apathisch neerligt of met verstopten neus en keel ligt te rochelen, zoodat men voor het behoud van zijn leven vreest, blijft de etensbak onaangeroerd.

De voorzorg om bij het waarnemen van het fret een mondlapje te dragen, is in de periode van reconvalescentie, dat is de tweede week na de enting, minder geboden, daar het dier geen besmettelijke excreta meer afgeeft en practisch immuun is tegen een volgende infectie. Intusschen blijven sommige fretten ook tijdens het herstel niezen. Veertien dagen na de infectie zijn de dieren meestal volledig hersteld en worden zij uit de isolatie bevrijd en groepsgewijze ondergebracht. De gebruikte dieren, die verder worden aangehouden, worden gemerkt in het oor.

Serumbereiding. — Van de herstelde fretten wordt bloed afgenomen, voor het winnen van immuunserum. Dit geschiedt den 12en tot 14en dag na de enting. Bij grootere exemplaren gebeurt het door hartpunctie onder lichte aethernarcose, ook wel door punctie van de halsvena. Het frettenbloed stolt zeer snel en wordt spoedig haemolytisch. Kort laten uitpersen, spoedig afschenken of afcentrifugeeren is aan te raden. Inactiveren geschiedt een half uur bij 56° C.

Steriel ingesloten, bewaard bij een temperatuur van even boven het vriespunt, behoudt het frettenserum een aantal maanden zijn virusneutraliseerende eigenschappen, hoewel de titer, gelijk door Smith en Andrewes²⁹ wordt vermeld, en door Hare⁶⁰ proef-ondervindelijk werd bevestigd, veelal achteruitloopt.

De viruspassage van fret op fret. — Het overbrengen van het virus van fret op fret, hoewel mogelijk door contact, geschiedt met opoffering van het passagefret. De contactmethode zou het voordeel bieden, dat van ieder fret na herstel immuunserum verkregen kon worden; als nadeel staat daar tegenover, dat zij ons het virushoudende materiaal niet in handen geeft. Volgens onze wijze van handelen wordt het fret op het hoogtepunt van de ziekte, dat is 48 tot 72 uur na de enting, door aether gedood en met de rugzijde naar boven opgespeld. De huid van den neus wordt afgepraepareerd en met een knabbeltang worden de neusbeenderen verwijderd. Vervolgens wordt de neusholte afgekrabd met een scherpen, metalen lepel; van de neusschelpen en van de slijmvliezen, die deze en de neusholtewanden bekleeden, wordt een deel in een mortier gebracht en met fijn steriel zand of glaspoeder gewreven, onder toevoeging van een kleine hoeveelheid van gelijke deelen physiologische zoutoplossing en vleeschbouillon, die een pH 7,6 heeft.

Nadat het materiaal tot een min of meer homogene massa is fijngewreven, wordt zooveel van de bovengenoemde verdunningsvloeistof toegevoegd tot een centrifugeerbare suspensie is verkregen. Deze wordt even afgedraaid om de been- en kraakbeendeelen te verwijderen; het bovenstaande wordt afgegoten en gebruikt voor enting van het volgende fret.

Het overgebleven deel van het neusafkrabsel wordt in vacuo gedroogd volgens een werkwijze, die later zal worden beschreven, en bewaard. Zodoende blijft van elke passage virushoudend materiaal, in virulenten toestand beschikbaar, waarop kan worden teruggegrepen, indien in den verderen loop van een onderzoek materiaal verloren mocht zijn gegaan.

Wat na de enting van de virushoudende suspensie overblijft, wordt in een goed afgesloten buis eenigen tijd in de koelkast bij — 8° beschikbaar gehouden, doch na enkele weken opgeruimd, daar de ervaring leert, dat de virulentie van zoodanige suspensies bij deze temperatuur vrij snel verloren gaat. Met lagere temperaturen konden wij deze jaren nog niet werken.

Teneinde zoo snel en zoo zeker mogelijk tot de diagnose „influenza” bij het fret te komen, werd het materiaal, zooals we het

verkregen van den patiënt, ongefiltreerd geënt. Eerst na 2 of 3 frettenpassages werd tenminste één keer met gefiltreerd fretten-neusmateriaal verder geënt. Kreeg nu het met bacterievrij filtraat geënte fret dezelfde ziekteverschijnselen als het met ongefiltreerde suspensie geïnfecteerde, dan was de virusnatuur van het ziekteverwekkende agens bewezen.

Van het contrôle-fret, dus van het met filtraat geënte dier, dat niet voor verdere passage werd gedood, werd na verloop van 12 tot 14 dagen immuunserum gewonnen.

Pneumotroop maken van het frettenvirus. — Francis¹³ vermeldt, dat het PR8-virus na een aantal frettenpassages voor het fret pneumotroop werd en een afwijking in de longen teweegbracht, welke hij beschrijft als een echte viruspneumonie. Smith⁷ deelt mede, dat hetzelfde bereikt wordt bij herhaalde passage van het Engelsche influenza-virus. Wegens schaarschte aan fretten hebben wij zulk een onderzoek niet kunnen doen; wel stierven sommige met den voor muizen zeer virulenten WS-stam geënte fretten aan een specifieke influenza-pneumonie.

Aanpassing van het virus aan de muis. — Volgens het werkschema, dat wij hadden opgesteld, werd van het 3e passagefret het virus overgebracht op de muis. Wij steunden daarbij op de mededeelingen van Andrewes, Laidlaw en Wilson Smith¹⁵ en op ervaringen, in ons eigen laboratorium opgedaan tijdens de epidemie van 1939. De Engelsche onderzoekers vermelden, dat zij er in slaagden, verschillende virusstammen op muizen over te brengen na 3 frettenpassages, andere zelfs na 2. Bij een enkelen stam gelukte het eerst na 13 frettenpassages. Mulder⁶¹ slaagde er in, het in 1939 geïsoleerde influenza-virus van het 2e passagefret af op muizen over te brengen. Vervolgens bracht hij ook van de volgende passagefretten het virus op de muis over en hield tenslotte dat van het 8e fret als stam B 1939 aan. Wij meenden een veiligen weg te bewandelen door steeds 3 frettenpassages af te wachten.

De toegepaste techniek was als volgt. Het neusafkrabsel van het fret wordt op de reeds beschreven wijze gesuspendeerd en na afcentrifugeeren van grove deeltjes bij de muis onder aethernarcose in den neus gedruppeld. Deze narcose wordt toegediend in een lage Weck-flesch, waarvan de bodem bedekt is met een laag watten. Onder deze watten wordt aether gegoten, in zulke mate, dat de bovenste laag droog blijft. Het juiste moment voor de enting is gekomen, wanneer de muis opzij valt en snel gaat ademen. Het dier

wordt met den kop omhoog gehouden, terwijl met een injectiespuit door een fijne canule (record no. 18) 0,05 cm³ virussuspensie op den neus wordt gelegd, in achtereenvolgende druppels, die snel worden opgesnoven.

Als de narcose de juiste diepte heeft gehad, komt de muis na de enting snel weer bij. Voorzien van een kleurmerk op den rug wordt zij in een zinken proefdoos met geperforeerd deksel en voorzien van wat zaagsel gelaten. Er worden minstens vier muizen met hetzelfde materiaal geënt; deze komen bij elkander in dezelfde muizendoos.

De muizendozen hebben afmetingen van 20 × 14 × 10 cm en hebben gesloten wanden en bodems. Dit allereenvoudigste model maakt een volledige ontsmetting gemakkelijk mogelijk.

Het influenza-virus is voor de muis uitsluitend pneumotroop, het laat den neus onaangetast, zoodat er geen infectieuze excreten te voorschijn komen. Contactinfectie, zooals bij fretten, is niet te vreezen. Wel worden in één proefdoos uitsluitend muizen bij elkaar gezet, die met hetzelfde entmateriaal zijn geïnfecteerd, doch dozen met dieren van verschillende proeven kunnen in eenzelfde proefdierenkamer zonder bezwaar naast elkander worden neergezet. Dit is een groote vereenvoudiging tegenover het werken met geïnfecteerde fretten.

Door Eaton ⁶² is beschreven, hoe hij contactbesmetting bij muizen heeft verkregen, door ze 24 uur bij geïnfecteerde soortgenooten te plaatsen.

Andrewes, Laidlaw en Smith ¹² verkregen geen contactinfectie bij menscheninfluenzavirus, doch namen wel waar, dat normale muizen, die in aanraking werden gebracht met muizen, die met varkensinfluenzavirus waren besmet, immuniteit hiertegen verkregen, zonder teekenen van ziekte te hebben vertoond.

Mag het al mogelijk zijn met eenig geduld contactbesmetting tot stand te brengen — Eaton nam de verschijnselen ervan eerst na 10 dagen waar — voor onze proeven is het van geen belang, daar het verblijf van muizen in afzonderlijke, afgesloten dozen onmiddellijk en zelfs middellijk contact uitsluit.

Het is niet aanstonds vast te stellen of het influenza-virus, afkomstig van het fret, bij de muis aanslaat. Vaak blijven de muizen der eerste passage gezond. Hieruit mag niet worden besloten, dat het virus bij de dieren niet aanwezig is en zelfs ook niet, dat het zich niet bij hen heeft vermeerderd. Verscheidene „blinde” passages van muis op muis moeten dan worden uitgevoerd, alvorens de ziekteverschijnselen, typisch voor de reactie van de muis op het influenzavirus, voor den dag komen.

Anders dan bij het fret worden de ziekteverschijnselen niet afgewacht, alvorens tot passage wordt overgegaan. Recente proeven van Smorodintseff⁶³ hebben de ondervinding van Wilson Smith c.s. bevestigd, dat 48 uur na de infectie het virusgehalte der longen het hoogst is, om in den loop der volgende dagen geleidelijk te dalen.

De zichtbare longafwijkingen, die veelal eerst na 2×24 uur optreden, zijn geen maatstaf voor de hoeveelheid van het aanwezige virus, maar wel voor de verwoestingen, die het heeft aangericht. Als de longlaesies maximaal zijn, dat is bij het sterven der muizen, dan is het virusgehalte het laagst. Op den tweeden of derden dag na de enting (afhankelijk van bijzondere omstandigheden) worden drie van de vier muizen gedood met aether, opgespeld en geseceerd. Van de vierde, de „contrôlemuis”, wordt het ziekteverloop geobserveerd. Dit laat in den regel de volgende symptomen zien. Het vel wordt ruig, het dier zit stil in een hoek, eet niet meer, ademt met een eigenaardig knapperend geluid. Is het op den zesden dag nog niet bezweken, dan wordt het gedood en geseceerd.

De graad van het aanslaan der infectie wordt afgelezen aan den graad van de longlaesie, en genoteerd met de volgende teekens +, ++, +++, +++++, waarvan het laatste volledige aantasting der longen beteekent, welke alleen bij gestorven of stervende dieren wordt aangetroffen.

Bij de sectie worden met een steriele schaar en pincet de longen uitgenomen, bevrijd van hart en thymus, gewogen, en in een steriel mortier fijngeknipt. Bij de muizen, die na drie dagen, ten behoeve van de passage, worden gedood, worden of geen, of beginnende (+, ++) laesies aangetroffen.

Hoewel het virus niet in den vorm van insluitsels of elementaire lichaampjes in de weefselcellen is waargenomen, wordt toch naar analogie van andere virussoorten aangenomen, dat het zich intracellulair bevindt en zich binnen de cel vermeerderd en wel bij mensch en fret vooral in de epitheelcellen van de hoogere luchtwegen en eventueel van de lagere (wat echter bij den mensch onvoldoende onderzocht is), bij de muis van de bronchi en bronchioli. Uiterst fijnmaken van het muizenlongweefsel is dus geboden, wil het virus vrijkomen. Na geknipt te zijn, wordt het onder toevoeging van steriel pyrexglaspoeder — zand en gewoon glaspoeder zijn te grof — fijngewreven, onder geleidelijke toevoeging van zeer weinig zoutwaterbouillon, zoodat een dikke brij ontstaat. Is de massa homogeen, dan wordt zooveel zoutwaterbouillon toe-

gevoegd tot een 5 % suspensie is verkregen, waarmede bedoeld wordt, dat 5 gewichtsdeelen longweefsel voorkomen op 100 cm³ suspensie. Het glaspoeder wordt afgecentrifugeerd bij laag toeren-tal gedurende eenige minuten.

De longen van een muis van 20 gram gewicht wegen ongeveer 0,18 gram; van een drietal muizen 0,54 gram. Deze leveren 10,80 cm³ standaardsuspensie (5 %).

De standaardsuspensie. — Deze dient tot uitgangspunt bij de virulentietiterbepaling. Hiertoe worden verdunningen van de standaardsuspensie uitgezet, volgens de reeks 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Door met elke verdunning een groep muizen intrana-saal te enten (ongeveer 0.05 cm³ bij muizen van gelijk gewicht) kan worden nagegaan, welke verdunning nog in staat is muizen te doden binnen 6 dagen, en welke (hoogere) verdunning nog juist in staat is om zichtbare longafwijkingen te veroorzaken.

Stel dat de verdunning 10^{-3} nog juist in staat is muizen te doden, dan kunnen we aannemen, dat 0,05 cm³ van deze ver-dunning 1 minimale letale dosis (M.L.D.) bevat. 1 cm³ bevat dan 20 M.L.D. en 1 cm³ van de standaardsuspensie 20.000 M.L.D.

Is de verdunning 10^{-6} nog juist in staat bij muizen longafwij-kingen te verwekken, dan nemen we aan, dat 0,05 cm³ hiervan 1 minimale infectie dosis (M.I.D.) bevat, in welk geval 1 cm³ van de standaardsuspensie 20.000.000 M.I.D. bevat. Wij spreken in het vervolg gemaks- en eenvoudigheidshalve van een infectietiter van 10^{-6} zonder berekening van het aantal M.I.D.'s.

Bij de opeenvolgende passages van het frettenvirus bij muizen doet zich nu het verschijnsel voor, dat het virus, eerst niet of nau-welijks pathogeen voor de muis, gaandeweg pathogeen wordt. De spreekwijze luidt, dat het zich aan de muizen aanpast. Omtrent den aard van het aanpassingsproces weten we niets, doch zeker is het, dat na een aantal passages het virus in staat blijkt muizen binnen de 6 dagen te doden, ook in een hooge verdunning.

De virulentie ten opzichte van de muis, in het begin niet merk-baar, stijgt tot een maximale hoogte is bereikt, waarna we zouden kunnen spreken van een „virus fixe”. Teneinde de maximale viru-lentie te behouden, is het gewenscht regelmatig snelle passages uit te voeren, bijvoorbeeld om den anderen dag.

Pathologische anatomie van de influenza-long bij de muis. — Uit het voorgaande is het duidelijk geworden, dat de afwijkingen van de muizenlong het zichtbare teeken zijn, waaraan wij de aan-

wezigheid van het influenza-virus herkennen. Het is dus van het allergrootste belang den aard der laesies zoo scherp mogelijk vast te stellen en te onderscheiden van andere, voor ons „aspecifieke” afwijkingen. Temidden van de vele ziekten, welke bij muizen beschreven zijn, waaronder ook virusziekten, is de experimenteële influenza patholoog-anatomisch, zoowel macroscopisch als microscopisch, duidelijk onderscheiden.

De macroscopische zichtbare veranderingen (fig. 3) nemen wij waar in den vorm van longgedeelten, gewoonlijk zich uitbreidend van den hilus naar de periferie, die kersrood van uiterlijk zijn, glimmend en ietwat gezwollen. Deze gedeelten puilen nochtans niet merkbaar uit boven de longgedeelten, welke nog de normale kleur vertoonen, daar ook deze eenigszins gezwollen zijn. De geheele „influenza-long” met roode en normaal gekleurde gedeelten, onderscheidt zich van gezonde longen door een grooter volumen en meer afgeronde vormen. De afscheiding tusschen de kersroode en rose longgedeelten is scherp begrensd, zonder eenigen overgang. Mozaïekvormige verdeling van de donkere plekken is zeldzaam en wekt de verdenking op van aspecifieke bijverschijnselen. In den regel vertoont iedere aangetaste lobus een aaneengesloten donkerrood veld, aan den hilus gelegen, en een normaal gekleurd veld perifeer. Het donkerroode veld is soms alleen aan den rand gelegen; zulk een plek kan ook voorkomen bij longen, die tevens afwijkingen aan de hili vertoonen. Totaal aangetaste longen nemen bijna het uiterlijk aan van de lever; de Engelschen spreken van „hepatisation”, „splenisatie” is wellicht een nog juistere aanduiding.

Van belang is verder het volgende: de long blijft elastisch, zonder meer of minder vaste infiltraten. Er is een zeer duidelijk verschil in dit opzicht tusschen de influenza-long en de long, die vulgaire cellige ontstekingshaarden of abscessen bevat. Dergelijke aspecifieke afwijkingen zijn in den regel op het eerste gezicht te onderkennen, en worden, zoo zij bij proefmuizen voorkomen, als

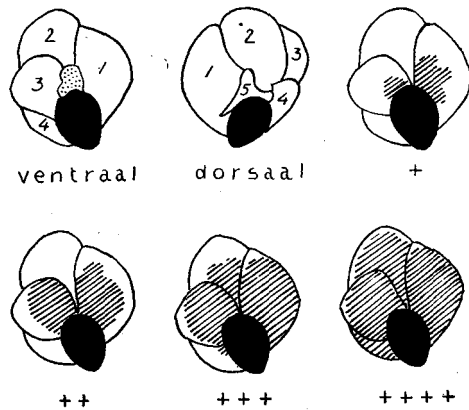


Fig. 3. Schematische voorstelling van de muizenlong en de macroscopische afwijkingen bij influenza. Het massief zwarte is het hart.

zoodanig genoteerd. Op doorsnede vertoonen de aangetaste longgedeelten een gelijkmatig donkerrood beeld.

Microscopisch onderzoek van de influenza-muizenlong leerde reeds aan Wilson Smith, Andrewes en Laidlaw¹², dat het bronchusepitheel verwoest werd. Diepgaand is de pathologische anatomie het eerst bestudeerd door Straub⁶⁴. Hij acht in het microscopische beeld het meest opvallende verschijnsel, dat epitheel over groote gebieden van den bronchiaalboom ontbreekt. De bronchioli terminales en respiratorii zijn geheel van epitheel ontbloot, verwijd en leeg. De alveolen zijn samengevallen, sommige zijn echter gevuld met oedeemvocht; het alveolaire interstitium is sterk hyperaemisch.

Door met influenza-virus geënte muizen te doden op verschillende tijdstippen na de infectie, was Straub in staat den loop van de aantasting bij de muizenlong te vervolgen. Reeds op den dag na de infectie neemt hij een reactie van het longepitheel waar, zich uitstrekkend van de bronchioli respiratorii tot de bifurcatie van de trachea. Het epitheel, dat uit een enkele rij van zuilvormige cellen bestaat, zwelt op en ondergaat een slijmige degeneratie. De cellen laten ten deele los en komen vrij in het lumen te liggen (desquamatie).

De ophooping van mucus veroorzaakt afsluiting van de bronchi en als gevolg hiervan doet zich atelectase voor, en wel het eerst in de streken rondom den hilus, waar bepaalde bronchi kort en nauw zijn. Later verspreidt zich de collaps over geheele lobi, zich aan het oog macroscopisch vertoonend als de eerder besproken kersroode gedeelten. De zichtbare verandering is secundair van aard; de ware aantasting bestaat in een catarrhale ontsteking van de slijmvliezen.

De verwoesting van het epitheel wordt intusschen opgevolgd door een regeneratie. Op den vijfden dag na de enting treedt er, beginnend bij de bronchioli terminales en waarschijnlijk uitgaand van niet afgestooten epitheelcellen, een vaak meerlagig plaatepitheel in de plaats van de verdwenen bekleeding. Dit plaatepitheel dringt de bronchioli respiratorii binnen en zelfs de alveolen. Straub hecht groote beteekenis aan de metaplasie in verband met het optreden van immuniteit. Hij nam waar, dat alleen die muizen immuun waren tegen reïnfectie, welke uit een eerste infectie metaplastische plekken hadden overgehouden.

Behr en Hadders⁶⁵, die in Groningen de pathologische anatomie van de influenza-muizenlong bestudeerden, namen eveneens de door Straub beschreven epitheelverandering waar, doch

noemen het overdreven, dat deze het histologische beeld zou beheerschen. Zij wijzen op afwijkingen van het longparenchym, welke zelfs vóór de epitheelveranderingen zijn op te merken. Zij leggen het grootste gewicht op de verbreeding der alveolaire tusschenschotten, tengevolge van hyperaemie en oedeem, ten deele ook tengevolge van perivasculaire, peribronchiale en interstitieele celinfiltraten. Door de groote dichtheid kan men den indruk krijgen van een monotoon mononucleair infiltraat, doch bij nauwkeurige waarneming zijn de volgende celsoorten te onderscheiden: neutrophiele polynucleairen, enkele eosinophielen, monocytachtige cellen, cellen met radkernstructuur en enkele lymphocyten. Deze cellen zijn uit het bloed afkomstig, doch tevens ziet men adventitia-cellen.

In het bijzonder bestrijden Behr en Hadders, dat er in de met het bloote oog waar te nemen kersroode longgedeelten sprake zou zijn van atelectase. De loslating van epitheelcellen geeft volgens hen nooit aanleiding tot verstopping der bronchi, terwijl het macroscopische beeld op doorsnede van de long duidelijk zou wijzen op haemorrhagisch oedeem.

Het totale beeld, dat Behr en Hadders ontwerpen, is in hoofdzaak in overeenstemming met wat onafhankelijk van hen gezien werd door Bieling en Oelrichs⁶⁶, wier beschrijving overigens minder volledig is. Evenmin worden nieuwe gezichtspunten geopend door Nelson en Oliphant⁶⁷, die in Amerika de pathologische anatomie van met den stam PR 8 geïnfecteerde muizenlongen bestudeerden. Zij vermelden, dat zij reeds na één dag beschadiging van bronchus-epitheel (dus als Straub) en exsudaat in de kleinere bronchi waarnamen, terwijl infiltraat in de septa nog ontbrak. Na twee dagen was de epitheelbeschadiging sterker, terwijl nu ook perivasculair oedeem, peribronchiale en perivasculaire infiltraten, voornamelijk van kleine mononucleaire cellen, optraden.

Het zou voorbarig zijn, reeds nu een beslissing te willen geven in de controverse, die er in de beschrijving van het histologische beeld der influenza-muizenlong bestaat. Onze ondervinding is echter, dat zoowel de door Straub beschreven afwijkingen als die, waar Behr en Hadders den nadruk op leggen, kenmerkend zijn voor de experimenteele muizeninfluenza. Zoowel de eerste auteur als de beide laatsten geven processen weer, die in onze praeparaten zijn terug te vinden, en niet zelden in hetzelfde praeparaat.

Hoewel een stelselmatige studie door ons niet is verricht, hebben wij den indruk, dat verschillende virusstammen een eenigszins verschillende reactie in de long kunnen verwekken, terwijl ook de

aard van den muizenstam van invloed op het ziektebeeld kan zijn. Dat Straub zoo beslist een bepaald beeld kon beschrijven, staat wellicht hiermede in verband, dat hij met een bepaalden virusstam (WS) werkte en met muizen van hetzelfde genotype.

De bronchiale veranderingen, die door Straub op den voorgrond zijn gesteld, zijn naar onze ervaring inderdaad in het oog springend en bieden een goed houvast voor de diagnose influenza (fig. 4). De veranderingen in de alveolaire tusschenschotten, die Behr en Hadders beschrijven, zijn al even kenmerkend en wij zijn geneigd met hen in te stemmen, dat door het veelvuldig voorkomen van een diffuse ontsteking van het longparenchym met doordringen van ontstekingsinfiltraat in de alveolen van een zuivere atelectase in de meeste gevallen geen sprake is. Wel is de lucht uit de aangetaste gedeelten verdwenen, maar niet enkel door de verstopping van de bronchi, zooals Straub verklaart.

Wij zouden de kersroode longgedeelten dan ook niet kortweg atelectatisch willen noemen, evenmin echter hyperaemisch-oedemateus, zooals de beschrijving van Behr en Hadders en ook het uiterlijk voorkomen zouden suggereeren. Daarvoor is de werkelijke toestand te ingewikkeld.

Tot slot moge een samenvatting volgen van de voor experimenteele muizeninfluenza kenmerkende verschijnselen, die ook in vriescoupes, zooals wij die tijdens de epidemie gebruikten voor een snelle diagnose, zijn waar te nemen :

- 1e. bronchus-epitheelveranderingen, varieerend tusschen degeneratie, onregelmatige woekering en regeneratie tot een- of meermalig plaveisel- of cilinderepitheel,
- 2e. opvulling en verstopping van de bronchi met necrotische massa,
- 3e. peribronchiale en perivasculaire infiltraten,
- 4e. verbreding van de alveolaire tusschenschotten door ontstekingsinfiltraten en uitgezette bloedvaten,
- 5e. verdwijnen der alveoli, deels door opvulling met vocht of cellig materiaal (waaronder vaak erythrocyten), deels door collaps,
- 6e. hyperaemie, soms gepaard met haemorrhagieën, de laatste vooral bij aan experimenteele influenza gestorven muizen.

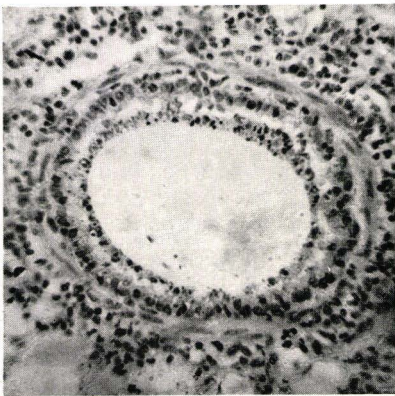
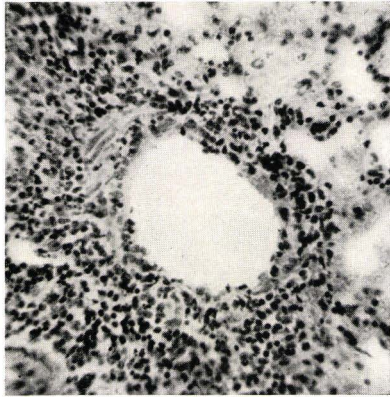
Bepaalde verschijnselen, zooals emphyseem, losraken van bronchus-epitheel en oedeem zijn in vriescoupes niet met betrouwbaarheid vast te stellen.



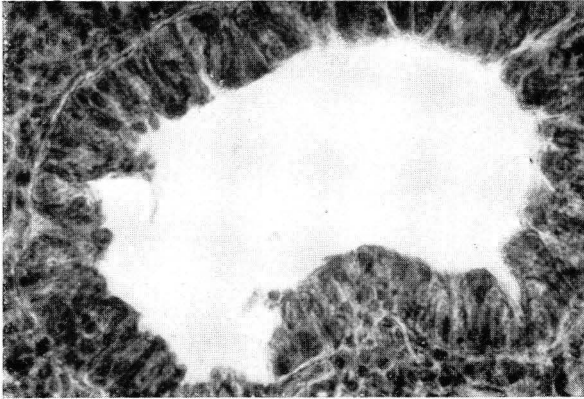
Fig. 4. Histologisch beeld van de normale en de met influenza-virus besmette muizenlong.

Links: Algemeen beeld van de normale muizenlong. De bronchioli bezitten een uit één laag bestaand cilinderepitheel. De alveoli zijn ruim en open. (Zwakke vergroo-ting.)

Rechts: Beeld van de met influen-za-virus geïnfecteerde long (stam Z, muis 3en dag gedood). Het bronchiolusepitheel is grootendeels verdwenen, deels veranderd. Peri-bronchiolair infiltraat. Verdikking van het longinterstitium, deels op-vulling der alveoli. (200 ×)

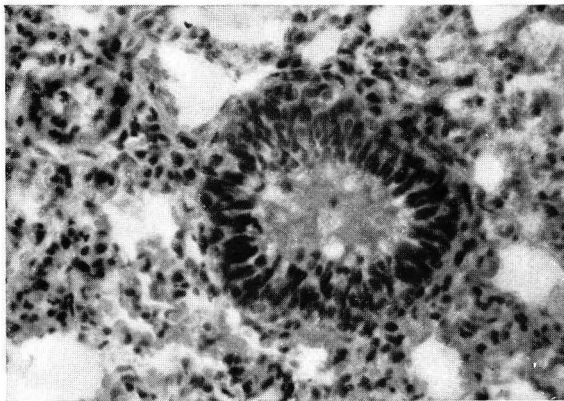
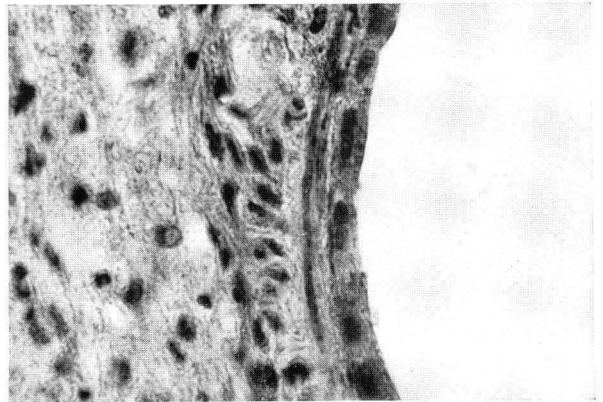


Links: Typisch beeld van degeneratie van bronchiolair epitheel bij een muis, besmet met virus van den Groningschen stam Z, en den 6en dag na infectie gedood. In het lumen kernkruimels en enkele polynucleaire leucocyten. (200 ×)



Gezonde muizenlong.
Bronchiolus met oorspronkelijk uit één cellaag bestaand cylinderepithel. (335 ×)

Metaplastisch plaveisel-epitheel bij een muis, na 3 dagen gestorven aan een infectie met influenza-virus van den Groningschen stam S, 3e muizenpassage. Vriescoupe tijdens epidemie. (500 ×)



Woekering van bronchiolair epitheel bij een met influenza-virus van den stam Z besmette muis, den 6en dag na de infectie gedood. (Middelbare vergrooting.)

De filtratie van het virus. — In den loop der muizenpassages werd, evenals in den loop der frettenpassages, minstens één keer met gefiltreerd materiaal geënt, in casu gefiltreerde longsuspensie, teneinde vast te stellen, dat het werkelijk een filtreerbaar virus was, hetwelk de typische ziekteverschijnselen verwekte. Dat wij deze filtratie niet iederen keer toepasten, had als grond niets van de in het begin wellicht geringe hoeveelheid virus te verliezen. Het is een eisch van de practijk, dat we ons zoo snel mogelijk in het bezit stellen van een virulenten virusstam op het proefdier, en daarvoor

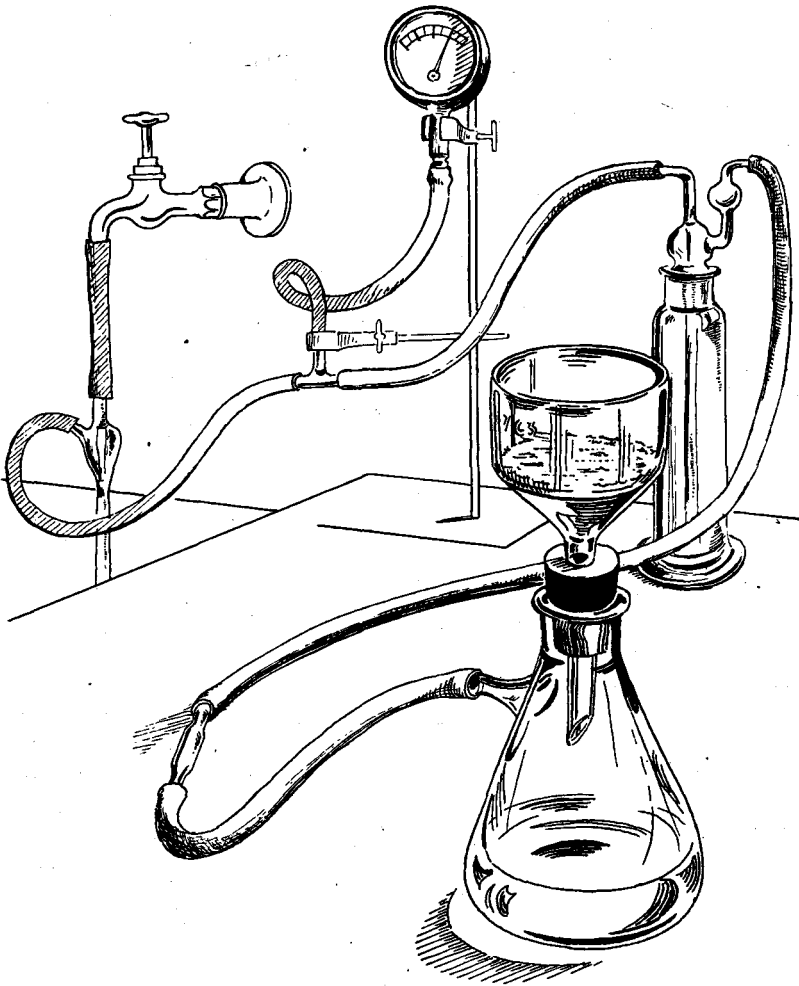


Fig. 5. Voorfiltratie-opstelling

moet een theoretische schoonheidsfout soms op den koop toe worden genomen.

De filtratie geschiedt in twee tempo's, volgens de techniek beschreven door Andrewes en Wilson Smith⁶⁸. Eerst wordt de virushoudende suspensie, na door centrifugeeren (enkele minuten bij laag toerental: 1500 t. p. m.) te zijn gereinigd van zand of glaspoeder en grovere deelen, geclarificeerd door middel van een voorfiltratie. Deze heeft plaats door een glasfilter G 3 van Schott & Gen. in Jena, geprepareerd met een laag „cellulosepap”, bereid met het schraapsel van een Seitz E. K. filter (Entkeimungsschicht). Dit schraapsel wordt in Erlenmeyerkolven met gedestilleerd water tot een pap gemengd en gedurende een uur in stoom gesteriliseerd. Van deze pap wordt telkens een passende hoeveelheid — door de ervaring te leeren — op een steriel glasfilter gebracht en met de waterstraalluchtpomp bij een drukverschil van 200 mm kwik vast aangezogen. Door een goed aangezogen celluloselaag van ongeveer een half tot één millimeter dikte loopt het virushoudende materiaal (neussuspensie van fretten, longsuspensie van muizen) volkomen helder door. Hoewel het aldus bereide filter bij nauwkeurig werken in de meeste gevallen een zeer bacteriearm filtraat geeft, beschouwen we de beschreven werkwijze alleen als vóórfiltratie. Taylor en Dreguss⁶⁹ volstonden in bepaalde gevallen met een filtreertechniek als hier beschreven, met dien verstande, dat zij de Seitz filterpap aanbrachten op een glasfilter G 4.

Bij de door ons toegepaste voorfiltratie moet in het oog gehouden worden, dat niet te groote hoeveelheden achtereen kunnen worden gefiltreerd. De adsorptiemogelijkheid van de celluloselaag is beperkt; heeft deze haar grens bereikt, dan loopt de vloeistof verder ongereinigd door.

De eigenlijke filtratie geschiedt door een membraanfilter. De aanvankelijk in ons laboratorium gebruikte Engelsche collodiummembraanfilters volgens Elford, met een gemiddelde poriëngrootte van $0,66\ \mu$, geleverd door St. Mary's Hospital te Londen, werden gaandeweg vervangen door de filters van de Membranfiltergesellschaft Göttingen, met een maximale poriënwijdte van $1\ \mu$.

De door de Membranfiltergesellschaft in den handel gebrachte membraanfilters volgens Szigmondy-Bachmann⁷⁰ zijn witte celluloidachtige plaatjes, die gemaakt worden door oplossingen van bepaalde cellulosederivaten op een horizontale glazen plaat te laten indrogen. Zij onderscheiden zich van collodiummembranen door grootere vastheid en duurzaamheid. Door de voor-

waarden bij het verdampen van het oplosmiddel te wijzigen, vervaardigt men membranen met een poriënstelsel van elke gewenschte dichtheid. De membraanfilters, die met behulp van een organisch oplosmiddel gevormd worden, zijn niet voor filtratie van stoffen in organische oplosmiddelen geschikt, daar zij dan zelf weer in oplossing zouden gaan. Voor het filtreren van oplossingen, die de gewone membraanfilters aantasten, worden er membranen uit zuivere cellulose samengesteld, de zoogenaamde „cellafilters” volgens Szigmondy-Kratz. Daar bij het influenza-viruswerk steeds waterige oplossingen worden gefiltreerd, konden wij met „membraanfilters” volstaan.

Door proeven, in overleg met de Membranfiltergesellschaft in 1939 in ons laboratorium verricht, is komen vast te staan, dat filters, door de fabriek geijkt op een maximale poriëngrootte van 1μ , het influenza-virus bacterievrij en vlot filtreerden, terwijl bij kleinere maximale poriëngrootte wel steriele filtraten verkregen werden, doch de filtratie zeer langzaam verliep.

Op te merken is, dat er onderscheid moet worden gemaakt tusschen de „maximale” poriëngrootte, waarop de Deutsche filters worden geijkt en de „gemiddelde” poriëngrootte, die bij de Engelse filters wordt aangegeven. Wilson Smith en Andrewes vermelden, dat zij gradocolmembranen volgens Elford gebruikten van een gemiddelde poriënwijdte van $0,66 \mu$. Volgens mededeeling van de Membranfiltergesellschaft komt deze overeen met een maximale poriënwijdte van 1μ , hetgeen met onze ondervinding in overeenstemming is.

Volledigheidshalve vermelden wij nog, dat de membraanfilters bovendien gesorteerd worden naar het aantal seconden, waarin een bepaalde hoeveelheid water onder bepaalde omstandigheden wordt doorgezogen. Wij gebruiken de Deutsche soort 7 Sek. De gel-natuur van de membraanfilters brengt mede, dat zij uitdroging niet verdragen, zonder dat de eigenschappen veranderen. Het is dus noodig ze te bewaren onder water, waaraan een kleine hoeveelheid desinfectans is toegevoegd, om groei van schimmels of bacteriën te voorkomen. Over de waarde van de toe te passen desinfectiemiddelen wordt verschillend geoordeeld: wij legden plaatjes geschuurd koper op den bodem van de voorraadpotjes. Ook worden 1 % formaldehyd of een 0,08 % oplossing van een mengsel, bestaande uit 0,65 g. nipargin en 0,35 g. nipasol, aanbevolen. Onmiddellijk voor het gebruik wordt de membraan in een petrischaal onder aqua dest. liggend, een uur in stroomenden stoom gesteriliseerd, tegelijk met de onderdeelen van de metalen filterhouder. Er

worden filterhouders aanbevolen, die er op gemaakt zijn, dat het toestel in zijn geheel wordt gesteriliseerd. Wij gaven de voorkeur aan een gemakkelijk uitneembaar apparaat (fig. 6 en 7), waarvan de onderdeelen vóór het gebruik met een steriele pincet in elkander worden gezet. Het membraanfilter komt te rusten op een metalen, doorboorden filterplaat; een gummiring wordt bovenop de membraan gelegd om een stevig inklemmen van den rand onder den metalen opzet mogelijk te maken, waarin de te filtreren suspensie wordt gegoten. Het toestel wordt met steriele voorzorgen op een zuigkolf gezet aan de waterstraalluchtpomp. De filtratie heeft plaats bij een drukverschil van 200 mm Hg. Toepassing

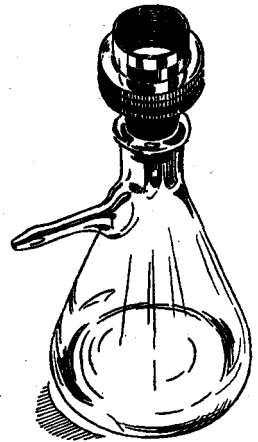


Fig. 6. Toestel voor membraanfiltratie

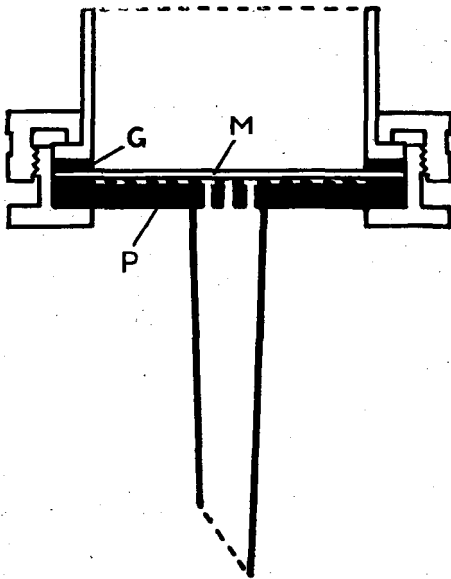


Fig. 7. Doorsnede van den metalen membraanfilterhouder, afgebeeld in fig. 6. Verklaring: Op de metalen filterplaat P (zwart), voorzien van radiaire en concentrische groeven, rust de membraanfilter M. De gummiring G (eveneens zwart aangegeven) voorkomt, dat de membraan bij het vastklemmen in den houder wordt beschadigd.

van een grooter drukverschil heeft geen zin, daar dit door samenpersen van de membraan de doorloop-snelheid vermindert.

Onze filterhouders zijn onderscheidenlijk gemaakt voor membranen van 4 en 6,5 cm doorsnede. De eerste zijn voor het dagelijksch gebruik, dat het filtreren van kleine hoeveelheden (10 tot 20 cm³) meebrengt. De grootere filters dienen voor het filtreren van grootere hoeveelheden, bijvoorbeeld bij vaccinbereiding.

Niet te groote hoeveelheden virushoudend materiaal loopen vlot door; de steriliteit is hoogst betrouwbaar, doch wordt niettemin steeds door enting in serum-bouillon gecontroleerd. De filters zijn herhaalde malen

te gebruiken, indien na de filtratie het neerslag er, onder water, met een fijn penseeltje of met een wat wordt afgeveegd en daarna het filteroppervlak met stroomend water wordt nagespoeld. Gezorgd moet hierbij worden, dat de membraan op een glazen onderlaag rust, daar anders te veel van de elasticiteit zou worden gevergd en er breuken zouden optreden. Voor het hanteeren wordt het best een dekglaspincet gebruikt; in geen geval mag het filteroppervlak met de vingers worden aangeraakt.

Het suspensiemiddel. — Van groot belang voor de filtratie is de aard van het milieu, waarin het virus gefiltreerd wordt. Wilson Smith c.s.⁶⁸ bevelen het suspendeeren in gelijke deelen physiologisch zoutwater en bouillon aan. Elford⁷¹ zegt, dat de ervaring met vira, phagen en proteïnen geleerd heeft, dat Hartley-bouillon van een pH 7,6 een uitermate gunstig milieu is voor de stabiliteit van virussuspensies en dat het tevens een component bevat, die de adsorptie tot een minimum beperkt en aldus het doorgaan door een filter bevordert.

Dat zoutwaterbouillon van een pH 7,6 een gunstiger milieu is voor het influenza-virus dan enkel physiologisch zoutwater, heeft de ervaring ook ons geleerd; het gebruik ervan is, terwille van een langer behoud van een optimale virulentie, als routine aanvaard. Gaat het er echter om, groote hoeveelheden virushoudend materiaal te filtreeren, dan kan toevoeging van bouillon bezwaar opleveren en geven wij de voorkeur aan een suspensie in physiologisch zoutwater van de gunstige pH (7,6). Zulk een suspensie loopt na clarificatie in groote hoeveelheden vlot door de membraan. De bouillon kan dan na de filtratie worden toegevoegd.

De geschiktheid van de door Elford aanbevolen Hartley-bouillon is volgens hem gelegen in de tusschenproducten, welke ontstaan bij een bepaalden graad van weefselafbraak. Onder deze afbraakproducten bevindt zich de component, die de adsorptie beperkt. Indien, zegt hij, de afbraak te ver wordt gevoerd, ontbreekt die component en is de bouillon in geen enkel opzicht superieur aan gewone physiologische zoutoplossing. Wij hebben ondervonden, dat, ook bij eenzelfde pH, bouillon van verschillend maaksel zich ongelijk gedraagt wat betreft de vlotheid, waarmee zij door de membraan loopt. Ieder zal op dit punt zijn eigen ervaringen opdoen en zich daarnaar moeten regelen.

De influenza-virusdeeltjes hebben blijkens filterproeven door membraanfilters van bekende poriënwijdte een doorsnede van $\pm 0,100 \mu$. Het influenza-virus behoort daarmede tot de grootere

virussoorten, die maar even beneden het oplossend vermogen van het microscoop blijven ($0,2 \mu$ bij violet licht). Bij het filtreren spreken wij dan ook niet van ultrafiltratie, welke term beperkt dient te worden tot het scheiden-onder-druk van stoffen in ware oplossing van colloïden, dus tot een bijzonder soort dialyse. De membranen, die hiervoor gebruikt worden, zijn van een veel fijnere porositeit dan de door ons gebruikte filters. De fijnste soorten van de door de Membranfiltergesellschaft in den handel gebrachte „Ultrafeinfilter” en „Ultracellafilter” behooren hiertoe.

Virulentieverlies door filtratie. — De poriënwijsdte van de membraan wordt bepaald, eenerzijds vanwege den eisch, dat er zoo weinig mogelijk virusdeeltjes worden tegengehouden, anderzijds door den eisch, dat met zekerheid een bacterievrij filtraat wordt verkregen.

Bij een gemiddelde poriënwijsdte van $0,66 \mu$ of een maximale van 1μ (zie boven) wordt aan deze beide eischen voldaan.

Een groot verlies aan virus heeft plaats bij de voorfiltratie. Wij zijn er niet in geslaagd een practische methode te vinden, welke ons een geclarificeerde suspensie met onverminderd virusgehalte levert. We hebben getracht na te gaan, welke fracties bij de verschillende werkwijzen: centrifugeeren, voorfiltratie, membraanfiltratie, worden uitgescheiden uit de virussuspensie. Het bleek, dat weefseldeelen en ook bacteriën, afkomstig uit de longen, die echter vaak bacterievrij zijn, door 5 minuten centrifugeeren bij laag toerental (1500 p. min.) worden neergeslagen. Bij de voorfiltratie wordt o.m. een groote hoeveelheid vetbolletjes door het cellulosefilter vastgehouden. Dit is in overeenstemming met de waarneming, dat de eerst melkachtige suspensie waterhelder doorloopt. Het membraanfiltraat onderscheidt zich naar zijn uiterlijk nauwelijks van het voorfiltraat; het is echter volledig vrij van bacteriën.

Naast de vermelde onderzoekingen werden herhaaldelijk virulentietiterproeven gedaan, die aan het licht brachten, dat het belangrijkste virulentieverlies (100- tot 1000voud) geleden wordt door de voorfiltratie, terwijl de membraanfiltratie geen of geen noemenswaard verder verlies teweegbrengt. Wij zijn geneigd hieruit af te leiden, dat zeer veel virusdeeltjes zijn geadsorbeerd aan substanties, die de vetbolletjes omhullen, welke vetbolletjes bij de voorfiltratie worden tegengehouden. Als wij uit een 100- tot 1000-malige reduceering van den virulentietiter mogen besluiten, dat slechts 1 op de 1000, ten hoogste 1 op de 100 virusdeeltjes het voorfilter passeert en dus maar een fractie van het virus in het filtraat terecht

komt, zou het voordeliger zijn om te trachten het virus te verzamelen uit het filterneerslag. Helaas stuitte wij daarbij op de omstandigheid, dat de oplosmiddelen, die het vet moesten verwijderen, de werkzaamheid van ons virus vernietigden.

Op blz. 62 volgen in tabel 2 eenige virulentietiterbepalingen, die het verlies aan virulentie door het filtreren aantoonen, en tevens een bepaling, waaruit blijkt, dat met zoutwaterbouillon als suspensiemiddel een iets hogere virulentiegraad behouden blijft als met enkel physiologisch zoutwater.

Het bewaren van influenza-virus. Drogen in vacuo. — De gemakkelijkste en eenvoudigste wijze van bewaren van virushoudende vloeistoffen is die met vast kooldioxyde bij -76° C. Horsfall⁷² vermeldt, dat op deze manier opgespaarde keelspoelsels van patiënten na 10 maanden nog infectieus waren voor fretten. Turner en Fleming⁷³ stelden vast, dat PR 8-virus, bij de temperatuur van een mengsel van alcohol en vast koolzuur bewaard (-78° C), na 3 jaar geen noemenswaardig virulentietiterverlies had geleden.

Voor ieder laboratorium, dat zich enkele keeren per week vast kooldioxyde kan verschaffen, is het gebruik ervan aan te bevelen, daar er geen bijzondere inrichting voor vereischt wordt. De fraaie, voor dit doel gebouwde kast, welke Horsfall (l.c.) beschrijft, is in beginsel een ouderwetsche ijskist, waarin vast koolzuur de plaats van ijs inneemt.

Een zeer goede wijze van conserveeren is het drogen in vacuo, daar het aldus verkregen praeparat zeer weinig plaats inneemt, niet in de koude bewaard hoeft te worden en gemakkelijk verzendbaar is. Zij eischt echter een uitgebreide apparatuur.

Er zijn zeer vele werkwijzen beschreven, om biologisch materiaal in vacuo te drogen. Een zeer eenvoudige werd aangegeven door Craigie⁷⁴, die serum in een petrischaal in den vacuumexsiccator boven chloorcalcium plaatste en door voortdurend pompen zoo snel liet verdampen, dat de temperatuur onder het vriespunt daalde. Wij hebben deze methode beproefd voor virussuspensies, doch zeer schadelijk voor de oliepomp bevonden, die te veel waterdamp te verwerken kreeg.

Wilson Smith, Andrewes en Laidlaw pasten een gewijzigde methode toe. Zij brachten muizenlongsuspensies of neusafkrabselsuspensies van fretten in kleine buisjes boven phosphor-pentoxyde (P_2O_5) in een exsiccator. Deze werd leeggpompt tot de inhoud van de buisjes bevroor. Daarna werd de exsiccator een nacht in de koelkast gelaten en vervolgens opnieuw uitgpompt. Na

Tabel 2. Virulentietiterverlies van een influenza-muizenlong-suspensie door filtratie.

| Stam WS Virusverduunning | Ongefiltreerd | | Geclarificeerd | | Gefiltreerd | |
|-----------------------------|---------------|-------|----------------|------|-------------|-----|
| 10 ⁻⁸ | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 ⁻⁷ | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 ⁻⁶ | ++ | + | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 ⁻⁵ | +++ | +++ | ++ | + | * | + |
| 10 ⁻⁴ | D++++ | D++++ | * | ++++ | +++ | +++ |

| Stam B 1939 Virusverduunning | Ongefiltreerd | | | Gefiltreerd | | |
|---------------------------------|---------------|-------|------|-------------|-------|----|
| 10 ⁻⁵ | 0 | 0 | 0 | | | |
| 10 ⁻⁴ | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 ⁻³ | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 ⁻² | D++++ | D++++ | ++ | | + | 0 |
| 10 ⁻¹ | * | D++++ | ++++ | + | + | ± |
| 1:1 | D++++ | D++++ | ++ | D++++ | D++++ | ++ |

Virulentietiterverschil tusschen filtraten van influenza-muizenlong-suspensie in NaCl en in bouillon

| Stam WS Virusverduunning | Gefiltreerd in NaCl | | Gefiltreerd in bouillon | |
|-----------------------------|------------------------|-------|----------------------------|-------|
| 10 ⁻⁶ | 0 | 0 | + | + |
| 10 ⁻⁵ | 0 | 0 | + | + |
| 10 ⁻⁴ | ++ | + | ++ | + |
| 10 ⁻³ | ++++ | ++ | ++++ | ++ |
| 10 ⁻² | ++++ | +++ | ++++ | + |
| 10 ⁻¹ | D++++ | D++++ | D++++ | D++++ |

Verklaring. De virulentietiterbepaling van de ongefiltreerde, geclarificeerde en gefiltreerde virussuspensies, volgens de vroeger aangegeven werkwijze, geschiedde door enting van een twee- of drietal muizen (intranasaal 0.05 cm³) met elke suspensieverduunning.

+, ++, +++ = toenemende graden van longaesie.

++++ = volledig aangetaste longen.

D = binnen 6 dagen gestorven.

0 = geen afwijkingen.

* = aan een intercurrente ziekte gestorven.

vier dagen werden de buisjes bij een hoog vacuum dichtgesmolten.

Wij bleven het drogen in den vacuumexsiccator als voorbereiking trouw, doch pompten niet langer dan noodig was om een behoorlijk vacuum te bereiken (enkele mm Hg). Het wegnemen van de waterdamp geschiedde geheel door poedervormig P_2O_5 . Wij vermeden zodoende vocht door de oliepomp te zuigen, daar dit het bereikbare vacuum snel doet terugloopen, waarvoor de pomp herhaaldelijk in revisie moet. Als nadeel van P_2O_5 mag gelden, dat het snel een taai oppervlak vormt, waardoor een verdere wateropneming wordt belemmerd. Flosdorf en Mudd⁷⁵ geven om deze reden de voorkeur aan „drierite”, watervrij calciumsulfaat al of niet met indicator, dat door verhitting bij $180^\circ C$ te regenereren is. Daar het ons echter niet, zooals hun, om het drogen van groote hoeveelheden vloeistof te doen was, werd de mindere geschiktheid van P_2O_5 niet in ernstige mate ondervonden.

Bij het in vacuo insluiten volgden wij in hoofdzaak de in verschillende Nederlandsche laboratoria gebruikte, door Otten⁷⁶ beschreven, werkwijze. Otten's installatie omvat een Cenco-oliepomp, eenige droogflesschen en een glazen ring met aanzetstukken, waaraan de buisjes met het te drogen materiaal worden aangesloten en later met de vlam afgesmolten. Ten einde onder alle omstandigheden zeker te zijn van een zeer hoog vacuum, plaatsten wij tusschen oliepomp en aanzetstuk een kwikdiffusiepompe, welke echter desgewenscht buiten gebruik kon blijven. Indien de oliepomp goed functionneert, hetgeen bevorderd wordt door er een droogtoeren met calciumchloride voor te schakelen, is het bereikte vacuum voldoende (0,01 mm Hg). Bovendien wordt de uit de aansmeltbuizen weggepompte lucht eerst nog over een schuitje met P_2O_5 gezogen. Doordat ons virusmateriaal van te voren in de vacuumexsiccator is gedroogd, mag deze laatste voorzorg bijna overbodig heeten.

Om dezelfde reden hebben wij ook geen behoefte aan een uitvriesvat, dat niet gemist kan worden bij de toestellen, waarmee een groote hoeveelheid vloeibaar biologisch materiaal onmiddellijk via den bevroren toestand kan worden gedroogd en ingesloten. Knox⁷⁷ beschrijft een zoodanig apparaat, dat achtereenvolgens omvat een oliepomp, een kwikpomp, een vat met P_2O_5 en een uitvriesvat met alcohol en vloeibaar kooldioxyde. Greaves en Adair⁷⁸ geven de beschrijving van een droogtoestel met uitvriesinrichting, waarbij de temperatuursdaling door de snelheid der verdamping zelf ontstaat, doch ten deele wordt gecompenseerd door de warmte, welke door het P_2O_5 bij de opneming van de weggepompte waterdamp wordt ontwikkeld. Zodoende wordt een

ongewenschte yerlangzaming van het geheele proces door te diepe afkoeling voorkomen.

De laatste auteurs leggen er den nadruk op, dat het drogen uit den vloeibaren toestand het gevaar medebrengt, dat om het praeparaat een harde schaal ontstaat, welke de latere oplosbaarheid ongunstig beïnvloedt. Deze schaal zou uit ten deele gedenatureerd materiaal bestaan. Het drogen via den bevroren toestand kent dit nadeel niet; er ontstaat een poreuse stof, die zich weer kwantitatief laat oplossen.

Bij de werkwijze, die wij in de practijk ontwikkelden, is van een vloeibaren uitgangstoestand geen sprake. Het fijngeknipte virushoudende materiaal, na vermenging met pyrexglaspoeder, in een mortier tot een uit kleine deeltjes bestaande zalvige massa gewreven, verkeert reeds in een vrij drogen staat. Na een kort verblijf in den exsiccator (één tot enkele uren) wordt een poeder verkregen, waarmee de voorraadbuisjes kunnen worden gevuld. Een dergelijke handelwijze wordt in het algemeen voor virussoorten aangeraden door Kaiser⁷⁹, die het virushoudend weefsel zoo fijn mogelijk knipt, maalt en dan droogt in vacuo, evenals wij, zonder toepassing van lage temperatuur.

De behoefte om snel te werken, bracht ons tenslotte tot de volgende wijze van doen⁸⁰. Het virushoudende materiaal (neusslijmvliezen van fretten, longen van muizen) wordt op smalle strookjes stevig filtreerpapier gebracht, waaraan het vanzelf vastkleeft; het wordt enkele malen ingeknipt om overmatig opzwellen in vacuo te voorkomen. De zoo geprepareerde slijmvliezen en longen laten zich gemakkelijk met de steriele pincet hanteeren; zij worden op een petrischaal in de vacuumexsiccator boven P_2O_5 gedurende eenige uren gedroogd en vervolgens in de voorraadbuisjes gebracht. Deze zijn van te voren uitgegloeid om de binnenwand van alle waterdamp te bevrijden. De buisjes met inhoud worden aan het geheel uit glas bestaande spuitstuk van het hoogvacuumtoestel aangesmolten, leeggepompt en, wanneer het gewenschte luchtledig bereikt is, zonder verwijl afgesmolten.

Om een foutloos aan- en afsmelten mogelijk te maken, moeten buisjes en spuitstuk uit glas met hetzelfde smeltpunt bestaan. Het komt er bovendien op aan, dat bij het aansmelten de hals zoodanig wordt uitgetrokken, dat een niet te nauw lumen overblijft, bij een zoo dik mogelijken wand. Het eerste bevordert de snelheid, waarmee het benoodigde hooge vacuum verkregen wordt; juist bij zeer lagen druk gaat de molèculaire beweging van de lucht een rol spelen en daar deze beweging in alle richtingen plaats heeft,

zijn ruime doorgangen in de hoogvacuumtechniek van groot belang. Het tweede, de dikwandigheid, is van groote beteekenis ter voorkoming van zwakke plekken bij het afsmelten, daar deze later aanleiding geven tot een vaak onzichtbare breuk.

De hoogte van het vacuüm wordt geschat met een hoogfrequentie-apparaat, dat op de exactere MacLeod-manometer de gemakkelijke hanteerbaarheid voor heeft en zich goed leent voor het opsporen van voorkomende lekken.

De volgende tabel (3) toont, dat de virusstam WS, op de laatst beschreven wijze ingesloten, na 2 jaar zijn virulentie vrijwel volledig had bewaard.

Tabel 3. Vergelijking in virulentietiter tusschen versch en in vacuo bewaard influenza-virus.

| Virusverduunning 5% longsuspensie, ongefiltreerd | Uitgangsmateriaal 9 Juli 1940 | Zelfde materiaal bewaard in vacuo 7 Januari 1941 | Zelfde materiaal bewaard in vacuo 8 Mei 1942 |
|--|----------------------------------|--|--|
| 10 ⁻⁶ | + ± | + 0 0 | + + 0 |
| 10 ⁻⁵ | +++ ± | ++ ++ ++ | + + 0 |
| 10 ⁻⁴ | D ++++ +++ | +++ +++ | +++ ++ |
| 10 ⁻³ | D ++++ +++ | D ++++ ++++ | D ++++ D ++++ |
| 10 ⁻² | | D ++++ D ++++ ++++ | D ++++ D ++++ |
| 10 ⁻¹ | | | D ++++ D ++++ |

Verklaring der teekens, zie tabel 2.

Ontsmetting en sterilisatie. — In een influenza-viruslaboratorium zijn uitgebreidere maatregelen tot desinfectie van het gebruikte materiaal vereischt dan in een laboratorium, waar meer gewoon

bacteriologisch werk gedaan wordt. In plaats van voedingsbodems in afgesloten cultuurbuizen en petrischalen treden hier proefdieren met hun eischen van behuizing en verzorging. In plaats van het eenvoudige beënten en overenten met naald en entoog komt het toedienen onder narcose van een entstof, die bereid moet worden uit virushoudende organen door fijnwrijven, centrifugeeren en filtrereen. Het is uiteraard geboden, tijdens deze bewerkingen elke verspreiding van het virus te vermijden; doch even belangrijk is het er voor te zorgen, dat geen twee virusstammen met elkander in aanraking worden gebracht.

Wij behandelen achtereenvolgens de ontsmettingsmaatregelen en de sterilisatie en ten slotte het gescheiden houden van materiaal.

Weerstand van het influenza-virus. — Buiten het organisme onderscheidt het influenza-virus zich geenszins door grooten weerstand. Ostrowskaya, Czalkina en Olechnowitch ⁸¹ hebben den invloed van chemische en physische agentia op het influenza-virus nagegaan en bevonden, dat het virus bij 100° C in 1 minuut vernietigd is, bij 56° C binnen 30 minuten, bij uitdroging (normale temperatuur) in een paar uur. In glycerine kan het bij 2—5° C gedurende 3 maanden bewaard blijven. De gunstigste pH is 7,0 tot 7,5; een zuurder of alkalischer milieu werkt schadelijk. Van de door hen onderzochte stoffen vernietigen aethylalcohol, sublimaat, phenol, chloorwater, formaline, aether en chloroform zeer snel het influenza-virus. Waterstofperoxyde daarentegen en kaliumpermanganaat zouden het weinig aantasten, urotropine in het geheel niet.

Wat phenol betreft, moge vermeld worden, dat Fairbrother en Martin ⁸² het in de verdunning van 0.5 % onwerkzaam bevonden, en het een geschikt conserveeringsmiddel achtten voor influenza-vaccins.

Wells en Brown ⁸³ vonden, dat in de lucht gesuspendeerd influenza-virus niet langer dan één uur in staat is fretten te infecteeren en dat het door ultraviolet licht in 10 minuten gedood wordt.

Belangrijk is de bevinding van Stock en Francis ⁸⁴, dat het influenza-virus bij een pH van 7,5 geïnactiveerd wordt door de vetzuren van zeep. Hiermee kan wellicht ten deele de virusdoodende werking van kresol-zeepoplossing (lysol) worden verklaard, welk ontsmettingsmiddel wij voor het viruswerk van de Engelsche onderzoekers overnamen, terwijl ook het emulgeerend vermogen

van dit middel van beteekenis is, daar het de viruseiwitten in fijn verdeelden en dus aangrijpbaren toestand brengt.

De doeltreffendheid van lysol stelden wij vast in eenige beknopte proeven, waarin lysol tot een verdunning van 1 % gevoegd werd bij een onverdunde virus- (muizenlong) suspensie. Het mengsel werd achtereenvolgens, na een rustperiode van een bepaald aantal minuten, intranasaal geënt bij muizen. Voor de enting werd het 1000 ×, resp. 100 × verdund, om een schadelijke werking van het lysol op de ademhalingsorganen uit te sluiten, welke verdunning bij de berekening van de hoeveelheid virusmateriaal per muis in rekening werd gebracht (tabel 4).

Tabel 4. Desinfecteerende werking van kresol-zeepoplossing 1 % op influenza-virus (WS).

| Virusmateriaal per muis. | | | |
|--|----------------------------------|--|----------------------------------|
| 10 ³ M.I.D. influenza-virus | | 10 ⁴ M.I.D. influenza-virus | |
| Enting na | Influenza-afwijkingen bij muizen | Enting na | Influenza-afwijkingen bij muizen |
| 2 min. | +++ ++ | 5 min. | 0 0 |
| 15 min. | 0 0 | 15 min. | 0 0 |
| 30 min. | 0 0 | 30 min. | 0 0 |
| Contrôle | D ++++ D ++++ | Contrôle | D ++++ D ++++ |

Verklaring. De contrôlemuizen werden geënt met de boven in de kolom vermelde virusdosis, zonder lysol.

Voor verdere toelichting zie tabel 2.

Wij achtten het desinfecteerend vermogen van de kresol-zeepoplossing ten opzichte van het virus hiermee voldoende bevestigd en gaven er de voorkeur aan boven sublumaat en andere desinfectantia, die geen emulgeerend vermogen bezitten.

De maatregelen, welke genomen werden bij de frettenisolatie, zijn reeds in de eerste afdeeling van dit hoofdstuk besproken.

Voor de ontsmetting der frettenkisten, voederbakken en muizen-doozen gebruikten we een lysoloplossing van 10 % en namen een onderdompelingstijd van 24 uur in acht. Deze sterke oplossing wordt aangeraden met het oog op de desinfectie van faeces- en voedselresten. De laboratoriebenedoodigheden, zooals pipetten, centrifugebuizen, petrischalen, mortieren en stampers, worden 24 uur onder lysol 3 % gezet. De werktafels worden na elke werkzaamheid met alcohol ontsmet, de betegelde vloeren dagelijks met lysol-oplossing opgenomen.

Glasfilters G 3 worden na het gebruik niet onder lysol gezet, maar volgens voorschrift van de Schott-fabriek omgekeerd aan de kraan doorgespoten. Vervolgens wordt gedestilleerd water doorgezogen, waarna het filter gereed is voor steriliseering (droog bij 140° C).

Sterilisatie. — Al het glas- en porseleinwerk, dat met het influenza-virus in aanraking gekomen is, wordt, nadat het met lysol ontsmet is, nauwkeurig schoongemaakt en nagespoeld met gedestilleerd water, gedroogd en voor het gebruik gesteriliseerd. Een ruime voorraad steriele petrischalen, centrifugebuizen met wattenprop, pipetten, afzuigkolven, glasfilters, moet steeds aanwezig zijn, wil het werk vlot voortgang hebben. Wij steriliseeren droog gedurende 1 uur bij 140° C.

Membranfilters, metalen filterhouders, doorboorde gummi-kurken worden onmiddellijk voor het gebruik gedurende 1 uur in stroomenden stoom gesteriliseerd. De filterapparatuur wordt steeds bij de proef zelf met behulp van steriele pincetten in elkander gezet en niet in haar geheel gesteriliseerd, zooals bij kaarsfiltratie gebruikelijk is. De onderdeelen zijn zoo gemakkelijk te hanteeren, dat dit geen enkel bezwaar oplevert, terwijl de moeilijkheid om een omvangrijk toestel te steriliseeren omzeild wordt.

Chirurgische instrumenten, scharen, pincetten etc. worden 10 minuten voor ieder gebruik in gedestilleerd water uitgekookt. Na het gebruik worden zij met lysol gereinigd en onder alcohol gelegd. Hetzelfde geldt mutatis mutandis voor injectiespuiten en canules.

Gescheiden houden van materiaal. — Bepaalde voorwerpen, die, practisch gesproken, niet na elk gebruik ontsmet en gesteriliseerd kunnen worden, dienen voor zoover zij bij het werken met verschillende virusstammen gebruikt worden, streng gescheiden te worden gehouden. Hieronder vallen de emaille bakken, afgedekt

door glazen platen, waarin de fretten en de Weckflesschen, waarin de muizen worden genarcotiseerd. Wij volgden den stelregel, dat iedere virusstam zijn eigen narcosepot had, voorzien van etiket met naam en kleur van den stam, met welke kleur ook de dieren, op den rug, worden gemerkt. Wij gebruikten daartoe verdunde oplossing van kleurstoffen, als carbofuchsine, carbolgentiaanviolet, methyleenblauw, malachietgroen en pikrinezuur. Schadelijke invloeden van deze stoffen op de dieren hebben wij nooit waargenomen.

HOOFDSTUK III.

Methodiek der immunologische proeven

Het aantoonen van antilichamen tegen het influenza-virus. — Wij nemen aan, dat de tweevoudige dierproef, in hoofdstuk II beschreven, ons een filtreerbaar virus in handen heeft gegeven, verkregen uit het materiaal van een aan influenza lijdenden patiënt. Dan moet nog het bewijs geleverd worden,

- 1^o dat dit virus identiek is, althans antigene verwantschap vertoont met het influenza-virus, verkregen uit bekende voorafgaande epidemieën, of eventueel een geheel op zichzelf staand influenza-virus is ;
- 2^o dat de patiënt inderdaad een infectie heeft doorgemaakt, welke door het gevonden virus was verwekt.

Beide vragen worden beantwoord langs immunologischen weg.

Ad 1^{um} Nagegaan wordt, of het reconvalescentieserum, gewonnen van het fret, dat de infectie met gefiltreerd virus heeft doorgemaakt, antilichamen bevat tegen een bekenden influenza-virusstam.

Immunologisch onderzoek van het serum van met influenza-virus geënte muizen is om praktische redenen niet gebruikelijk.

Ad 2^{um} Onderzocht wordt :

a of het reconvalescentieserum van den patiënt, die het entmateriaal leverde, een stijging in antilichamentiter toont tegen een bekenden influenza-stam, in vergelijking met serum uit het acute stadium van de ziekte („acuut serum”).

b of het reconvalescentieserum van den patiënt een stijging in antilichamen toont tegen den virusstam, uit den patiënt zelf geïsoleerd, in vergelijking met serum uit het acute stadium van de ziekte.

De immunologische methoden, die ons hierbij ten dienste staan en die haar bruikbaarheid bewezen hebben, zijn onderscheidenlijk :

- I de kruisimmuunproef,
- II de neutraliseeringsproef (muisbeschuttingsproef),
- III de complementbindingsreactie.

I. **De kruisimmuunproef.** — Deze kan alleen dienen om, kwali-

tatief, een antwoord te geven op de allereerst gestelde vraag, of er influenza-virus in het spel is, ja dan neen.

Indien een fret, geënt met patiëntenmateriaal, na hersteld te zijn van de daaropvolgende infectieziekte, immuun blijkt te zijn tegen een enting met bekend influenza-virus, dus gezond blijft, terwijl een contrôlefret typische influenza krijgt, mogen we aannemen, dat het geënte dier een infectie heeft doorgemaakt met een virus, gelijk aan of verwant met het influenza-virus.

Men kan uiteraard bij het fret de immuunproef doen, door het dier na genezing te herinfecteeren met het gebruikte virus. Deze proef geeft uitsluitend aan, dat er virus in het spel is. Meestal mag dit overbodig worden geacht en gaat men direct over tot de kruis-immuunproef.

Muizen, die genezen zijn van een intranasale infectie of die door intraperitoneale of subcutane injecties met het geïsoleerde virus werden geïmmuniseerd, moeten op gelijke wijze onvatbaar blijken tegen intranasale enting met het influenza-virus.

Omtrent de vraag, of zich bij den patiënt tijdens de ziekte immuniteit heeft ontwikkeld tegen het virus, zou door de kruisimmuunproef opheldering te krijgen zijn, door den reconvalescenten patiënt met een bekend influenza-virus te infecteeren en de reactie af te wachten, een proef, die uiteraard niet voor uitvoering in aanmerking komt.

De kruisimmuunproef met fretten en muizen hebben wij tijdens de epidemie van 1941 niet toegepast; zij mag overbodig heeten naast de neutraliseeringsproef, die het voordeel biedt, dat zij kwantitatief kan worden uitgevoerd.

De kruisimmuunproef vond toepassing in de eerste dagen van het influenza-onderzoek; wij herinneren er aan, dat Bijl en Domisse in 1935 langs dezen weg het influenza-virus identificeerden in Nederland. In 1938 pasten Francis en Magill de proef op muizen toe, tot het opsporen van antigene verschillen tusschen een groot aantal influenza-virusstammen (zie Hoofdstuk I).

II. De virusneutraliseeringsproef (v.n.p.). — Deze proef, ook wel kortweg neutraliseeringsproef genoemd en in het laboratorium vaak met muisbeschuttingsproef aangeduid, berust, zooals reeds in Hoofdstuk I is vermeld, op het vermogen van immuunserum, om in vitro het influenza-virus te neutraliseeren.

Op grove wijze, en louter kwalitatief, werd deze proef in het begin van het influenza-onderzoek⁸⁵ toegepast, door een virus-suspensie te vermengen met een gelijke hoeveelheid onverdund

serum en het mengsel gedurende 30 minuten bij 37° C te plaatsen. Daarna werd een groep muizen met het mengsel geënt en het resultaat afgewacht. Na een willekeurig aantal dagen werden de overlevende muizen gedood en werd de graad van eventuele longaesies geschat. Overleven zonder longafwijking beteekende, dat het virus volledig door het serum was geneutraliseerd, dat het entmateriaal dus geen actief virus meer bevatte. Doodgaan op hetzelfde tijdstip als de met virus zonder serum geënte controlemuizen, beteekende, dat het serum in het geheel geen virusneutraliserende werking had uitgeoefend. De tusschen beide uitersten gelegen gevallen waren niet nauwkeurig te interpreteren.

Spoedig werd de proef kwantitatief uitgevoerd²², door de virus-suspensie te mengen met regelmatig toenemende verdunningen van het serum en elk mengsel, na een half uur verblijf bij 37° C of één uur staan bij kamertemperatuur, bij een groep muizen te enten (intranasaal 0,05 cm³). Op deze wijze werd het mogelijk die serumverdunning te bepalen, welke in staat was een virussuspensie van bepaalde sterkte volledig te neutraliseren, en ook die verdunning, welke nog juist een merkbare verzwakking van het virus teweegbracht: m.a.w. de titergrenzen te bepalen.

Vaak zegt men, dat een bepaalde serumverdunning in staat is de muizen te „beschutten” tegen het virus; in overeenstemming met dit spraakgebruik wordt gesproken van de „muisbeschuttingsproef” (mouse protection test). Tegen dezen naam bestaat geen bezwaar, mits men zich er niet door laat suggereeren, dat de muizen beschut worden tegen een daadwerkelijken aanval van het virus. Immers, in het „beschuttende” virus-serummengsel is het virus al van te voren geneutraliseerd en kan dus in het geheel geen aanval uitvoeren.

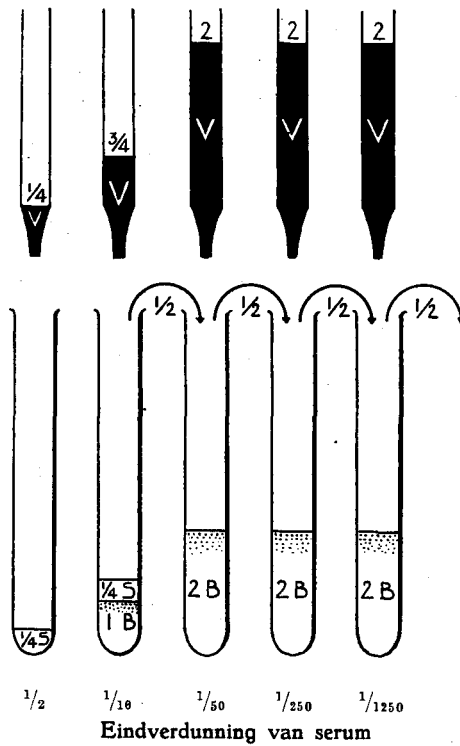
Moesten we aannemen, dat het serum in staat was in vitro het virus geheel te vernietigen, dan ware de term muisbeschuttingsproef wellicht geheel te verwerpen. In overeenstemming met de heerschende opvatting nemen wij aan, dat de virusdeeltjes door de specifieke antilichamen in het serum alleen gebonden worden, zoodat zij potentieel blijven bestaan. Als pleit voor deze opvatting kan worden aangevoerd het recente onderzoek van Taylor⁸⁶, die erin slaagde, door het toepassen van verdunning, het virus weer te scheiden van de neutraliserende antilichamen.

Door ons werd de neutraliseeringsproef als volgt uitgevoerd.

In een rij steriele buisjes werden toenemende verdunningen van het fretten- of patiëntenserum gemengd met gelijke hoeveelheden virussuspensie, zóó, dat de eindverdunningen van het serum waren

1/2, 1/10, 1/50, 1/250, 1/1250. Wij gebruikten het in fig. 8 weergegeven werkschema, waarin de hoeveelheden der reagentia zijn aangegeven in cm³. Het overpipetteeren van 1/2 cm³ der voorgaande serumverduunning naar het volgende buisje geschiedde telkens met een nieuwe pipet. Het laatst werd de virussuspensie bijgedruppeld met een pipet, zonder den wand van de buisjes te raken. Wij namen daarbij zorgvuldig het voorschrift in acht, dat geen virus, onvermengd met serum, aan de wanden mag achter-

Fig. 8. Werkschema voor de neutraliseeringsproef



blijven, daar dit aan de neutraliseering door het serum zou ontsnappen en ten onrechte bij de muis zou kunnen worden ingebracht. De serum-virusmengsels werden 1 uur bij kamertemperatuur gelaten. Vervolgens werd met elke verduunning een drietal muizen intranasaal geënt.

Om goed vergelijkbare uitkomsten te verkrijgen, is het noodig bij het bereiden der serum-virusmengsels een uniforme werkwijze in acht te nemen, terwijl er zooveel mogelijk naar gestreefd moet worden, muizen te gebruiken van gelijk gewicht en deze te enten met een gelijke hoeveelheid materiaal.

Keuze van den influenza-stam. — Als bekende influenza-virus-stam werd gekozen WS (Londen 1933). Deze stam werd, zooals in Hoofdstuk I reeds werd medegedeeld, ook door andere onderzoekers ter vergelijking met de door henzelf geïsoleerde virusstammen gebruikt, zoo door Bijl en Dommisse¹⁹ en Smorodintseff²⁰. Verder zijn te noemen Dujarric de la Rivière³³, Hoyle en Fairbrother³¹, Taylor en Dreguss⁴⁰, die den WS-stam voor hun neutraliseeringsproeven gebruikten.

In ons laboratorium was reeds tijdens de epidemie van 1939 te Groningen de bruikbaarheid van den WS-stam voor het aantoonen van influenza-antilichamen gebleken. Als voorbeeld laten we een dubbele virus-neutraliseeringsproef volgen (tabel 5), waarin de stijging in antilichamentiter van het patiëntenserum B wordt aange-toond, eerst tegen den stam WS en vervolgens tegen den uit het keelspoelsel van denzelfden patiënt geïsoleerden virusstam B 1939. In iedere proef werd serum uit de eerste ziektedagen (B I) ver-geleken met reconvalescentieserum (B II) (tabel 5).

In beide proeven komt een belangrijke titerstijging aan het licht. In proef 1 toont B I een merkbare virusneutraliseerende werking slechts in de verdunning 1/10, in alle hogere verdunningen is het virus onverzwakt in staat om alle muizen binnen 6 dagen te doden. In tegenstelling daarmee is bij B II de virusneutraliseerende werking op te merken tot in de verdunning 1/250, zij het, dat deze niet volledig is. Een 25-voudige stijging in neutraliseerenden titer is in ieder geval vast te stellen. De onregelmatige uitkomst in de ver-dunning 1/1250 is waarschijnlijk aan een slechte enting van de derde muis te wijten.

In proef 2 geeft B I merkbare neutraliseering tot in de verdun-ning 1/250, terwijl B II het virus nog zeer duidelijk neutraliseert bij 1/1250. Een 5-voudige stijging is minstens aanwezig. Een ver-klaring voor den betrekkelijk hoogen antilichamentiter van B I moeten wij hier in het midden laten, doch de vergelijking van de proeven 1 en 2 leert voldoende, dat het WS-virus goed bruikbaar is voor het aantoonen van influenza-antilichamen, ook als deze niet het gevolg zijn van een infectie met den WS-virusstam. Het spreekt vanzelf, dat men bij het gebruik van den WS-stam slechts

Tabel 5. Neutraliseeringsproeven met patiëntensera B tegen de virusstammen WS en B.

| Proef | Serum | Virusstam | Serumverduunningen | | | |
|-------|-------|----------------------------|--------------------|-------|-------|--------|
| | | | 1/10 | 1/50 | 1/250 | 1/1250 |
| 1 | B I | WS (filtraat 1 : 10) | + | D++++ | D++++ | D++++ |
| | | | + | D++++ | D++++ | D++++ |
| | | | 0 | D++++ | D++++ | D++++ |
| | B II | | * | + | ++ | D++++ |
| | | | 0 | 0 | + | D++++ |
| | | | 0 | 0 | + | ++ |
| 2 | B I | B (ongefiltreerd 1 : 1) | + | ++ | ++ | D++++ |
| | | | ± | ++ | + | D++++ |
| | | | ± | ++ | + | D++++ |
| | B II | | ± | ± | ± | ++ |
| | | | 0 | 0 | 0 | + |
| | | | 0 | 0 | 0 | 0 |

Verklaring :

Met elk serum-virus-mengsel werd een groep van 3 muizen geënt.

+, ++, +++ = graden van longlaesies .

++++ = volledig aangetaste longen.

D = binnen 6 dagen gestorven.

0 = geen afwijkingen.

* = intercurrente dood.

die stammen op het spoor komt, die met dezen stam eenige verwantschap hebben. Het voorbeeld van het Lee-virus (zie Hoofdstuk I) toont aan, dat er stammen zijn, die slechts met homologe kunnen worden opgespoord. Het zal zaak zijn in de toekomst dergelijke sterk monovalente stammen mede in de virusneutraliseeringsproeven met reconvalescentieserum op te nemen.

Van den stam WS werd gebruikt een 5 % muizenlongsuspensie, gefiltreerd en 10 maal verdund. Werd serum uitgetitreerd tegen een der nieuw geïsoleerde stammen, dan werd de 5 % muizenlongsuspensie ongefiltreerd en onverdund toegevoegd. Dit geschiedde met het oog op de virulentie dezer stammen, die bij WS ten achter blijft. Filtratie en verduunning zouden hier een virusverduunning leveren, die de controlemuizen niet doodt. Een scherp aflezen van de proef wordt daardoor onmogelijk.

Een nadeel van deze handelwijze is de mogelijkheid, dat de muizen sterven aan een secundaire infectie. In de practijk werd de uitkomst van de proeven evenwel er niet noemenswaard door beïnvloed. Evenmin werd een remmende werking opgemerkt, die de

niet uitgeslingerde bestanddeelen van de virussuspensie op het serum zouden kunnen uitoefenen.

Keuze van de proefmuizen. — Bij de virusneutraliseeringsproef is een kritiek op zijn plaats, welke zich zou richten op het gebruikte muizenmateriaal. Het is ons niet gelukt een stam te verkrijgen van „Swiss”-muizen, welke door Wilson Smith³⁷ bijzonder gevoelig voor het influenza-virus werden bevonden, en welke dan ook door Francis en andere Amerikaansche onderzoekers bij voorkeur werden gebruikt. Zelfs was het niet binnen ons bereik, om met een eigen laboratorium-muizenstam te werken, doch moesten wij de proefdieren grootendeels uit den particulieren handel betrekken. Een ongelijke gevoeligheid van de verschillende individuen voor het influenza-virus was dus te verwachten. Volgens onze langdurige ervaring is zij echter niet hinderlijk, behalve bij sommige oude muizen, die een verminderde vatbaarheid kunnen bezitten. Het ziet er naar uit, dat de individuele en stamverschillen bij muizen in de proeven minder tot uiting komen, dan de onnauwkeurigheden bij de intranasale enting. Zelfs al gelukt het, bij elk lid van een groep muizen van gelijk gewicht een gelijke hoeveelheid virussuspensie in den neus te druppelen, dan is er nog geen zekerheid, dat een gelijk kwantum bij elk tot in de onderste luchtwegen doordringt. Het snelle ademen tijdens de aetherroes, waardoor de muis de suspensie moet insnuiven, doet zich zelfs bij de grootst mogelijke geroutineerdheid van den proefnemer niet bij alle muizen op dezelfde wijze voor. Op hinderlijke manier doen zich juist in dit opzicht rasverschillen onder de muizen gelden. Gekleurde muizen, en ook witt² van ten deele gekleurde ouders, toonen vaak een hevige reactie bij de aethernarcose. Zij komen slechts langzaam onder den invloed en sterven dikwijls plotseling; zij waren uit dien hoofde voor de v.n.p. practisch onbruikbaar. Alhoewel uit genetisch standpunt de albinomuizen, die wij bij voorkeur gebruikten, zeer heterogeen waren, leverden zij voor ons werk een tamelijk gelijk reageerend en betrouwbaar materiaal.

Wij willen niet nalaten ook te wijzen op een voordeel, verbonden aan de heterogene samenstelling van den muizenvoorraad. Mag de kans op het binnensleepen van infectieziekten bij de muizen al verhoogd zijn, de mogelijkheid, dat standvastig optredende afwijkingen na entingen met influenza-virushoudend materiaal veroorzaakt zouden worden door een onder de muizen heerschend endemisch virus, wordt er door uitgesloten. Het is ondenkbaar, dat in alle gevallen, waarin wij muizen van verschillende

herkomst besmetten met entstof, afkomstig van menschen, fretten en gedroogde muizenlongen, opgezonden uit Engeland en Amerika, steeds bij de muizen een eigen virus aanwezig was, dat de typische influenza-verschijnselen nabootste.

Het aflezen van de longafwijkingen. — Tenslotte blijft de moeilijkheid van een juiste waardeering der macroscopisch zichtbare afwijkingen in de longen, welke bij sectie op den 6en dag, of bij eerder sterven aan den dag komen. Nooit mag uit het oog worden verloren, dat deze waardeering niet anders kan zijn dan een benaderende. Immers de „longafwijkingen”, die met de aanduidingen +, ++, +++, ++++ worden opgeteekend — dat zijn dus de kersroode gedeelten, scherp afgescheiden van de normaal uitziende longpartijen — mogen niet gelden als de primaire influenza-afwijkingen zelf, doch veeleer als secundaire verschijnselen, zooals bij de behandeling van de pathologische anatomie in Hoofdstuk II is besproken.

Longen, welke geen kersroode gedeelten laten zien, kunnen microscopisch wel degelijk typische influenza-verschijnselen vertoonen; macroscopisch is de lichte infectie meestal kenbaar aan den emphysemateus gezwollen toestand van de overigens nog normaal gekleurde long. In dit geval en ook wanneer slechts uiterst kleine roode plekken zichtbaar zijn, kan alleen microscopisch onderzoek volledige zekerheid verschaffen. Met vriescoupes kan voor dit doel worden volstaan.

Samenvattend kunnen we de onregelmatigheden bij de aflezing van de virusneutraliseeringsproef (muisbeschuttingsproef) tot de volgende oorzaken terugbrengen:

- 1e, onregelmatigheden bij de intranasale enting,
- 2e, ongelijke gevoeligheid voor het influenza-virus,
- 3e, somtijds moeilijke beoordeeling en schatting van de macroscopisch zichtbare longafwijkingen.

Deze 3 punten te zamen in aanmerking genomen, komen wij tot het besluit, dat wij slechts bij benadering in den omvang der geïnfilteerde longgedeelten een maat mogen zien voor de hoeveelheid intrasaaal ingebrachte influenza-virus. En daar het doel van de virusneutraliseeringsproef hierin bestaat, door enting bij muizen den graad van virusneutraliseering te meten, moeten wij tot de slotsom komen, dat de uitslag dezer proef nooit aan een hoogen eisch van exactheid kan voldoen. Dat de proef in de praktijk niettemin zeer goed bruikbaar is, zal in het vervolg (Hoofdstuk IV) blijken.

III. De complementbindingsreactie (c.b.r.) — Deze proef heeft boven de vorige proeven het voordeel, dat er geen groote aantallen muizen van gelijk gewicht voor noodig zijn. Van alle proeven met het influenza-virus komt de complementbindingsreactie het meest binnen het kader van de gewone immunologische techniek.

De reactie, die al met goed gevolg was beproefd bij de bestudeering van andere virussoorten (vaccinia, herpes, psittacosis) werd voor het influenza-virus het eerst beschreven door Wilson Smith⁸⁷. Als antigeen gebruikte hij cultuurvirus, gekweekt op suspensie van kippenembryonen in Tyrode-oplossing, en daarnaast ook longsuspensie van muizen, die enkele dagen tevoren waren geënt met influenza-virus. Complementbindingsproeven in vergelijking met virusneutraliseeringsproeven leerden hem, dat er niet steeds overeenstemmende resultaten met beide methoden werden bereikt, waaruit hij concludeerde tot een meervoudig karakter van het influenza-virus als antigeen. Op een dergelijk karakter wijst ook de waarneming, dat tot het opsporen van antilichamen in patiëntensera evengoed varkensinfluenza-virus kan worden gebruikt. In de c.b.r. toont dit virus een antigeen te bezitten, dat het gemeenschappelijk heeft met het menscheninfluenza-virus. Opmerkelijk is, dat in de virusneutraliseeringsproef een gemeenschappelijk antigeen niet tot uiting komt. Deze dubbele bevinding is door een onderzoek van Fairbrother en Hoyle⁸⁸ nadrukkelijk bevestigd. In de complementbindingsreactie komt dus een groepsantigeen aan het licht, niet een specifiek antigeen. De reactie is dan ook onbruikbaar gebleken om verschillende menscheninfluenza-virusstammen te onderscheiden. De groepsspecificiteit maakt haar echter des te geschikter om in het algemeen antilichamen tegen influenza A op te sporen, onverschillig door welken stam de infectie werd teweegbracht.

Veronderstelden Hoyle en Fairbrother⁸⁹ reeds, dat het complementbindend antigeen oplosbaar was en afscheidbaar van het virus, de natuur van het antigeen is verder bestudeerd door Lennette en Horsfall⁹⁰. Uit de muizenlongsuspensie konden zij een complementbindend antigeen isoleeren, doordat bij snel centrifugeeren (27000 t.p.m.) het virus in 150 maal grootere mate werd neergeslagen dan het vrije antigeen, terwijl Seitz-filtratie het virus 19000 maal meer verzwakte dan het complementbindend antigeen. Kon dit laatste langs dezen weg vrij van het virus worden verkregen, omgekeerd gelukte het niet, het virus geheel van het complementbindend antigeen vrij te krijgen. De onderzoekers poogden dit te bereiken, door herhaald centrifugeeren (13000

t.p.m.) en door telkens het sediment met fysiologisch zoutwater te wasschen. Door filtratie bepaalden zij de deeltjesgrootte van het complementbindend antigeen op 35 m μ doorsnede of kleiner; zij vonden, dat het bij verblijf in de ijskast bij 4° C in titer achteruitloopt, om welke reden zij aanbevelen het telkens in kleine hoeveelheden uit muizenlong te bereiden, zoo dikwijls als voor de proef noodig is. Zij stelden vast, dat een half uur verhitting op 56° C de activiteit sterk schaadt, terwijl het bij 63° C snel vernietigd wordt. Het complementbindend antigeen was stabiel binnen een bereik van pH 4,6 tot 11,0. Bourdillon en Lennette⁹¹ kwamen langs den weg van kataforese tot de bevinding, dat het zich als een globuline in het electrisch veld beweegt.

De onafhankelijkheid van het complementbindend antigeen zoowel van den infectietiter van het uitgangsmateriaal als van het serumneutraliseerend vermogen, hebben wij in den loop van onze proeven herhaaldelijk ondervonden. Onze resultaten dwongen ons echter niet tot het besluit, waartoe Rickard, Lennette en Horsfall⁹² naar aanleiding van een onderzoek in een Amerikaansche gemeente kwamen, dat er geen betrekking was vast te stellen tusschen de complementbindingsreactie en de neutraliseeringsproef. Een extreme discrepantie als deze onderzoekers waarnamen, werd noch door Smith, noch door Francis⁹³ ondervonden. Belikov⁹⁴ vermeldt als resultaat van een recent onderzoek in Rusland, dat beide proeven als aanwijzing van immuniteit tegen influenza met elkander in de meeste gevallen klopten.

Hoyle en Fairbrother⁹⁵ beschreven goed geslaagde complementbindingsproeven met virus, gekweekt op het chorion-allantoïsvlies van kippenembryonen. De eivliezen werden in vacuo boven calciumchloride gedroogd en bewaard; voor de proef werden ze fijngewreven en met fysiologisch zoutwater in suspensie gebracht. Het aldus verkregen antigeen was aanmerkelijk sterker dan muizenlongsuspensie en vertoonde vrijwel geen anticomplementaire eigenschappen.

Hoyle en Fairbrother (l.c.) namen tevens een zône-verschijnsel waar bij de antigeentitratie, in dien zin, dat niet alleen bij hogere antigeenverduunning de complementbinding uitblijft, maar ook bij een te sterke concentratie, dus ook bij overmaat van antigeen. In dit verband wijzen zij op de noodzakelijkheid van de antigeentitratie, teneinde de minimale hoeveelheid antigeen te vinden, waarbij binding optreedt, daar bij deze hoeveelheid de reactie uiteraard het gevoeligst is.

Bij onze muizenlongsuspensies wees de titratie niet op de aan-

wezigheid van antigeen in overmaat, meestentijds bleek het wenschelijk te werken met de standaard suspensie (5 %), in de verdunning $\frac{1}{2}$.

De techniek van de proef in ons laboratorium, uitgewerkt door Hoek † en Van der Zoo de Jong, wijkt in geen enkel punt belangrijk af van de gebruikelijke, met dien verstande, dat de zoutwater-complement-serum-antigeen-mengsels na 2 uur verblijf in het waterbad van 37° nog een nacht in de ijskast worden gelaten, alvorens het haemolytische systeem wordt toegevoegd. Ons voldeed dit voorschrift van Smith uitstekend; door anderen, met name door Fairbrother en Hoyle, werd het niet steeds in acht genomen.

In de antigeenbereiding bestaan verschillen. De laatstgenoemde auteurs putten uit een voorraad in vacuo gedroogd longmateriaal van aan influenza-infectie gestorven muizen. Een deel hiervan werd voor de proef fijngemaakt, in suspensie gebracht en na krachtig centrifugeeren ongefiltreerd gebruikt. Francis (l.c.) maakte aanstonds een suspensie van eenige honderden geïnfecteerde muizenlongen, centrifugeerde deze krachtig en bewaarde de bovenkomende vloeistof in een thermosflesch bij -80° . Wij bereidden bij elke proef een verse muizenlong-suspensie, aangezien in ons laboratorium het WS-virus bij voortdoring om de 2 dagen op muizen werd gepasseerd. De 5 % suspensie in fysiologisch zoutwater werd gefiltreerd en voor het gebruik met een gelijke hoeveelheid fysiologisch zoutwater verdund.

Van de sera, geïnactiveerd (30 min. bij 56°), werden verdunningen met fysiologisch zoutwater gemaakt volgens de reeks $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$, $\frac{1}{64}$ en $\frac{1}{128}$, telkens tot een volumen van $0,5 \text{ cm}^3$. In elk buisje werd $0,25 \text{ cm}^3$ complement toegevoegd ter sterkte van 3 m.h.d. en vervolgens $0,25 \text{ cm}^3$ antigeen. Een tweevoudige serumcontrôle werd gedaan (verdunning $\frac{1}{4}$) met 2 en 3 m.h.d., eveneens een tweevoudige antigeencontrôle met 2 en 3 m.h.d. Aan ieder buisje werd tenslotte — na incubatie — $0,5 \text{ cm}^3$ haemolytisch systeem toegevoegd. Het haemolytisch systeem werd gemaakt door voor de proef gelijke deelen te mengen van een 5 % schapenbloedlichaampjessuspensie in fysiologisch zoutwater en van amboceptor tot een verdunning van 6 maal den amboceptor-titer (6-voudige overmaat).

Een direct waarneembare uitvlokkingsreactie. — Door Magill en door Francis⁹⁶ werd een „flocculation phenomenon” beschreven, dat optrad in mengsels van sera van influenza-patiënten en in-

fluenza-virus (muizenlongsuspensie). Henle en Chambers⁹⁷ vermelden een soortgelijke reactie tusschen influenza-patiëntensera en allantoisvloeistof van met influenza-virus beënte kippeneieren. Blijkens hun ervaring leent muizenlongsuspensie zich niet tot dit doel. Magill en Francis (l.c.) uitten reeds de veronderstelling, dat het door hen geziene verschijnsel aan een niet specifiek precipitinogeen te wijten was. De vraag, of een reactie van dezen aard voor toepassing bij het bestudeeren van influenza-epidemieën in aanmerking komt, valt op het oogenblik nog niet te beantwoorden.

HOOFDSTUK IV.

De epidemie te Groningen in Januari en Februari 1941.

De taak van ons onderzoek. — De epidemiologie en de klinische verschijnselen van de influenza, die zich in de eerste maanden van 1941 voerde te Groningen, werden bestudeerd door J. A. R. van Bruggen *). Door hem zijn tevens de secundaire bacterieële infecties van de luchtwegen van een aantal influenza-patiënten uit denzelfden tijd nagegaan.

Ons werk bepaalde zich tot het aantoonen van de aanwezigheid van het influenza-virus in materiaal, afkomstig van patiënten, opgenomen in het Algemeen Provinciaal-, Stads- en Academisch Ziekenhuis te Groningen (Interne Cliniek, toen onder leiding van Dr. J. Mulder, en de Afdeeling van den Geneesheer-Directeur, L. J. Zielstra) en in het Diaconessenhuis, tevens van patiënten uit de stadspractijk.

In het immunologisch onderzoek werden bovendien betrokken een aantal sera van patiënten van de Interne Clinieken der Rijks-universiteiten te Utrecht en te Leiden, ons toegezonden door de welwillendheid van de hoogleeraren Prof. Dr. C. D. de Langen en Prof. Dr. W. A. Kuenen.

Het aantoonen van het influenza-virus door fretten-enting. — Gedurende het tijdvak van 9 Januari tot 7 Februari 1941 werden van 13 patiënten deels keelspoelsels, deels sputumsuspensies uit de eerste ziektedagen, geënt op fretten. Tweemaal daags werden de temperaturen rectaal opgenomen en de klinische verschijnselen aangeteekend.

In 5 gevallen trad bij het fret een influenza-infectie op, met kenmerkenden koortstop op den tweeden of derden ziektedag en catarrhale verschijnselen in den neus, soms gepaard met conjunctivitis. In 4 dezer gevallen werden in het fretten-reconvalescentie-serum door middel van de virusneutraliseeringsproef antilichamen tegen den influenza-virusstam WS aangetoond. In het 5e geval kon geen serum worden verkregen.

*) Publicatie in bewerking.

In twee andere gevallen waren de symptomen bij het fret onduidelijk, doch bevatte het fretten-reconvalescentieserum antilichamen tegen het influenza-virus (WS), zoodat aangenomen moet worden, dat deze dieren subclinisch een influenza-infectie hebben doorgemaakt. In de 6 overblijvende gevallen vertoonde het fret geen enkele reactie. De frettenproef leverde in deze gevallen geen enkele aanwijzing: een koortstop deed zich niet voor, noch traden ziekteverschijnselen op, terwijl in het fretten-reconvalescentieserum geen antilichamen tegen het influenza-virus (WS) konden worden aangetoond. Het immunologische onderzoek bracht echter bij 2 van de patiënten een zeer duidelijke stijging in antilichamen-titer tegen het influenza-virus aan het licht, zoodat in beide gevallen van een mislukte fretten-enting kan worden gesproken.

Hier komt naar voren, dat, terwijl een positieve fretten-enting ons in staat stelt, binnen enkele dagen de vermoedelijke diagnose virus-influenza te stellen, een negatief uitgevallen fretten-enting ons niet noodzaakt de mogelijkheid van virus-influenza uit te sluiten.

Terwijl de zichtbaar optredende virus-infectie van het fret een bevestiging door het aantoonen van influenza-antilichamen in het frettenserum noodig heeft, kan het uitblijven van de uiterlijk zichtbare teekenen van infectie eerst dan als negatief worden geduid, wanneer behalve in het frettenserum, ook in het patiënten-reconvalescentieserum de antilichamen tegen het influenza-virus blijken te ontbreken. Het is duidelijk, dat in het laatste geval de frettenproef geen enkel voordeel heeft opgeleverd; met het immunologische onderzoek van het patiëntenserum had kunnen worden volstaan. Wij moeten echter in aanmerking nemen, dat dit onderzoek eerst 12 tot 14 dagen na het begin der ziekte kan worden ingezet, daar, volgens Francis, Magill, Beck en Rickard³² het reconvalescentieserum eerst dan een voldoende mate van antilichamen tegen het virus bevat. Bedenken wij nu nog, dat het aflezen van de neutraliseeringsproef eerst 6 dagen na het begin van deze proef gebeurt, dan loopen wij met onze vaststelling van het al of niet aanwezig zijn van virus-influenza, 2½ week achter de feiten aan, terwijl een positieve reactie van het fret zich binnen 48 uur na enting kan voordoen! De korte duur der influenza-epidemieën, die zich in een bepaald gebied veelal binnen de 6 weken afspelen, dwingt ons ertoe, naar de snelste werkwijze te grijpen, dus naar de fretten-enting, die door de immunologische contrôle, welke er op volgt, niets aan betrouwbaarheid te wenschen overlaat.

Gedurende den loop van de epidemie werd de van de Engelsche onderzoekers Wilson Smith c.s. overgenomen methode, om het fret te enten met keelspoelsel, vervangen door het enten met in een weinig steriele zoutsolutie gesuspendeerd sputum, opgegeven door den patiënt in de eerste ziektedagen. (Over de behandeling van het sputum, zie Hoofdstuk II).

Deze verandering voldeed ons goed, zoodat wij het verzamelen van keelspoelsels, waarin het virus uiteraard in sterk verdunden vorm voorkomt, voortaan nalieten. Wij kwamen uit practische overwegingen tot deze methode, welke intusschen al eerder was toegepast door Hoyle en Fairbrother³¹. Gedurende de influenza-epidemie te Manchester in 1937 entten zij fretten zoowel met „zoutwater-bouillonspoelsels der bovenste luchtwegen” als met „materie, direct opgehoest uit de trachea”. Dit laatste materiaal gaf de beste uitkomsten; bij de spoelsels waren de resultaten veel minder mooi. Wij zouden geneigd zijn hun uitspraak, zij het in minder sterken vorm, te bevestigen; nochtans zonder het feit, dat van de 4 entingen, die wij verrichten met keelspoelsel, er 1 negatief bleef, terwijl van 6 sputum-entingen er eveneens 1 negatief verliep, als statistisch bewijs te kunnen aanvoeren. Het materiaal voor deze 10 entingen was steeds afkomstig van patiënten, die zeker aan influenza leden.

Een argument voor de doeltreffendheid van het enten met sputum zien wij in het feit, dat bij een patiënt (S) het nog op den vijfden ziektedag gelukte het virus uit het sputum op een fret over te brengen. Dit dier vertoonde daarbij een sterke en snelle koortsreactie (fig. 20, S I). Daarentegen was de koortsreactie bij het met keelspoelsel van den derden ziektedag geënte fret trager in het verschijnen (fig. 13).

Het sputum van influenza-lijdens is dikwijls etterig door secundaire infectie. In ongecompliceerde gevallen ziet men echter even zoo vaak, dat de patiënten een dun, iets slijmerig, grijswit sputum opgeven. Bij nader onderzoek hiervan blijkt, dat het sputum rijk is aan gedesquameerd epitheel. Leucocyten zijn zeer schaarsch aanwezig, ook ontbreekt een bepaalde bacterieele flora. Dit beeld pleit er voor, dat bij den mensch het epitheel der lagere luchtwegen, evenals bij de muis, door het virus verwoest wordt en loslaat.

Daar het virus, naar vrij algemeen wordt aangenomen, woekert in het epitheel zelf, is het verklaarbaar, dat een dergelijk met epitheelcellen beladen sputum sterk virushoudend is en dat het virus zelfs nog laat in het beloop van de ziekte erin aangetoond kan worden. Onze ervaring met sputum-entingen bevestigt het vermoeden, dat

bij den mensch een descendeerende infectie vanuit de nasopharynx naar trachea en bronchi in vele gevallen van influenza plaats heeft. Wij zullen daarom in het vervolg aan entingen met sputum van influenza-lijders de voorkeur geven boven die met keelspoelsels.

Wij laten een overzicht van de fretten-entingen volgen (tabel 6).

Tabel 6. Overzicht van de gevallen, waarin het influenza-virus werd aangetoond (Januari—Februari 1941).

| Patient | Bij fret geënt materiaal | Klinische verschijnselen bij fret | Antilichamen in frettenserum (v.n.p.) | Stijging van antilichamen in patiëntenserum | |
|------------------|--------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|---|-----------------|
| | | | | (v.n.p.) | (c.b.r.) |
| D. | keelssp. | + | + | + ¹⁾ | + ¹⁾ |
| S. | keelssp. | + | + | + | + |
| S. ²⁾ | sputum | + | + | + | + |
| Kin. | sputum | + | + | + | + |
| Z. | sputum | + | + | + | + |
| Kru | sputum | + | + | geen serum | |
| Dijk | keelssp. | ± | + | geen serum | |
| Bri | sputum | ± | + | geen serum | |
| Mey | keelssp. | 0 | 0 | + | + |
| Smi | sputum | 0 | 0 | + | + |

v.n.p. = virusneutraliseeringsproef.

c.b.r. = complementsbindingsreactie.

¹⁾ = alleen reconvalescentieserum onderzocht; hooge titer.

²⁾ Het geldt hier de tweede enting met materiaal van denzelfden patiënt S, zoodat het aantal der in den tekst besproken gevallen er niet door vermeerderd wordt.

Beoordeeling van de frettenproef. — In de figuren 9 tot en met 14 worden van een aantal der geënte fretten de temperatuurkrommen met de klinische symptomen weergegeven. Wij laten van deze proeven de beoordeeling volgen.

De eerste betreft een van de geheel negatief uitgevallen onderzoekingen (niet in de overzichtstabel opgenomen), die als tegenstelling tot de positieve resultaten leerzaam is.

Fig. 9. Patiënte Sto. Virusneutraliseeringsproef (v.n.p.) met frettenserum negatief, evenzoo met patiëntenserum. Voorbeeld van enting met keelspoelsel van een patiënte, die geen virus-infectie heeft doorgemaakt. De temperatuurcurve van het fret heeft een atypisch verloop. Zij vertoont ongewone stijgingen en dalingen, misschien tengevolge van een door de enting ingebrachte of gewekte bacterieele infectie. Geen ziekteverschijnselen der bovenste luchtwegen; een week na de enting diarrhee, die dagen aanhoudt.

F. 2. Sto. (keelspoelsel)

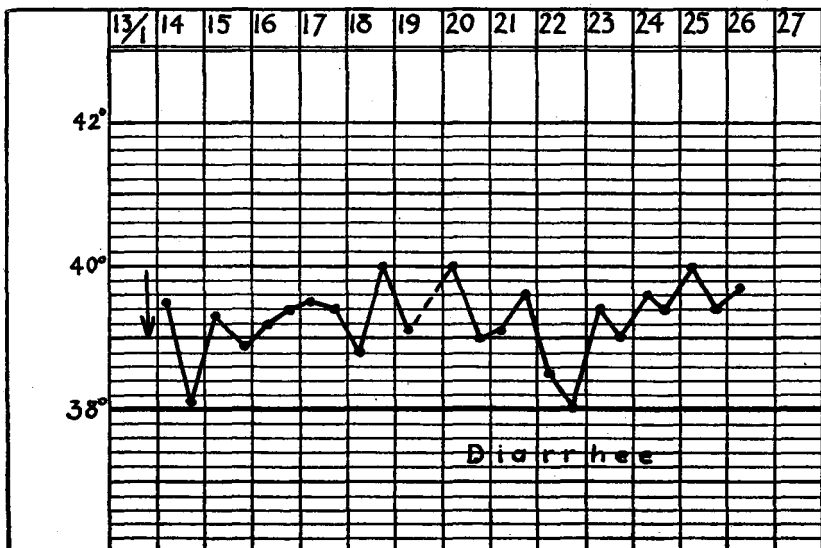


Fig. 9

F. 15. Smi. (sputum)

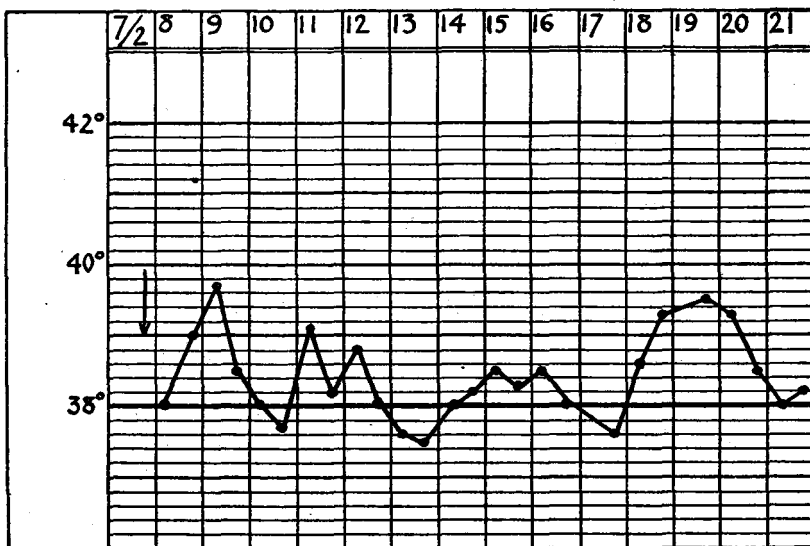


Fig. 10

F. 13, Bri. (sputum)

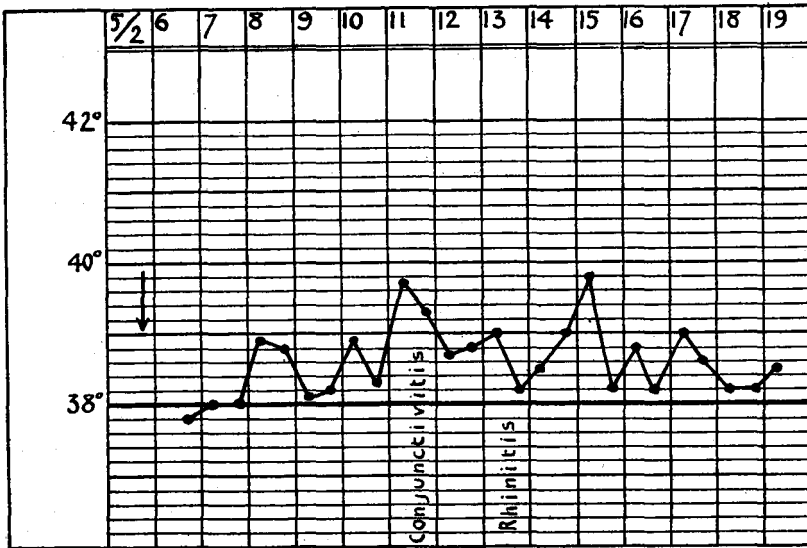


Fig. 11

F. 7, Dijk. (keelspoelsel)

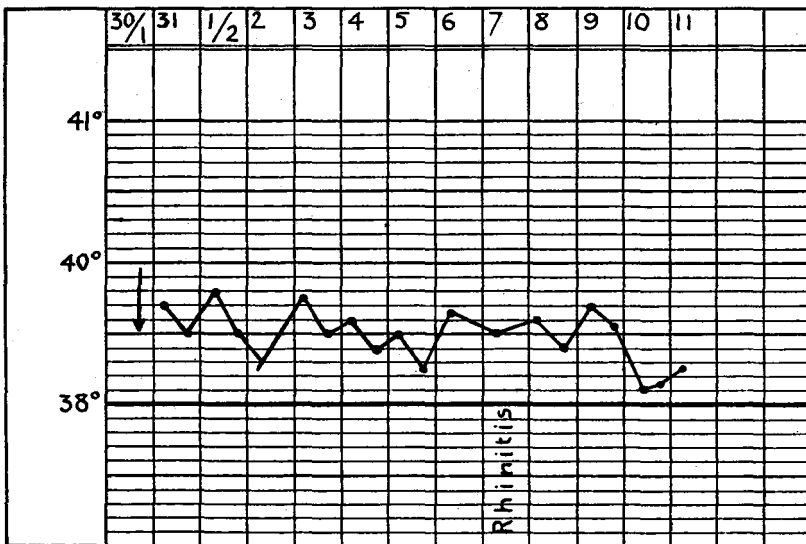


Fig. 12

Het late optreden van dit symptoom, dat niet behoort bij het symptomencomplex van de fretteninfluenza en het trage optreden van temperatuursverhoogingen pleiten tegen influenza-virusinfectie.

Fig. 10. Patiënte Smi. V.n.p. met frettenserum negatief, met patiëntenserum positief. Voorbeeld van een mislukte enting met sputum van een patiënte, die lijdende was aan virus-influenza. De temperatuurcurve bootst op zwakke wijze een influenza-top na; overige symptomen van fretten-influenza doen zich niet voor. Later een nieuwe, nu geheel atypische, temperatuurstijging. Geen klinische influenza bij het fret aanwezig geacht.

Fig. 11. Patiënt Bri. V.n.p. met frettenserum positief. Patiëntenserum niet verkregen. Voorbeeld van een zeer lichte infectie bij het fret. De temperatuur beweegt zich de eerste vijf dagen binnen de normale grenzen, later volgen eenige stijgingen. Eerst later doen zich ook symptomen voor, welke in het klinische beeld der fretteninfluenza passen. Het vertraagde in deze reactie zou ons er van terughouden het oordeel: virusinfectie, te vellen.

Fig. 12. Patiënte Dijk. V.n.p. met frettenserum positief. Patiëntenserum niet verkregen. Duidelijk voorbeeld van een subclinische infectie bij het fret. De temperatuur vertoont in het geheel geen opvallende stijging. Eerst op den negenden dag is het fret licht benauwd en niest, doch is spoedig weer normaal. Een diagnose laat zich op deze gegevens niet stellen.

Fig. 13. Patiënt S. V.n.p. met frettenserum en met patiëntenserum positief. Voorbeeld van een geslaagde enting met keel-spoelsel. Een typische influenza-koortstop vertoont zich op den derden dag na de enting, gevolgd door een even typische scherpe daling op de volgende dagen; gelijktijdig treden onmiskenbare teekenen op van rhinitis: vuile neus, moeilijk ademen en hevig niezen. Deze symptomen handhaven zich tot op den 6en dag. Later niest het dier nog herhaaldelijk, hoewel het uiterlijk weer normaal is. In dit geval laat de diagnose influenza zich reeds op den derden dag na enting met vrij groote zekerheid stellen.

Fig. 14. Patiënte Kin. V.n.p. met frettenserum en met patiëntenserum positief. Voorbeeld van een geslaagde enting met sputumsuspensie. De typische koortstop doet zich reeds op den tweeden dag na enting voor en is zeer hoog. Gelijktijdig is het dier zeer benauwd, hijt en niest voortdurend. In den avond wordt

Fret 8, S. (keelspoelsel)

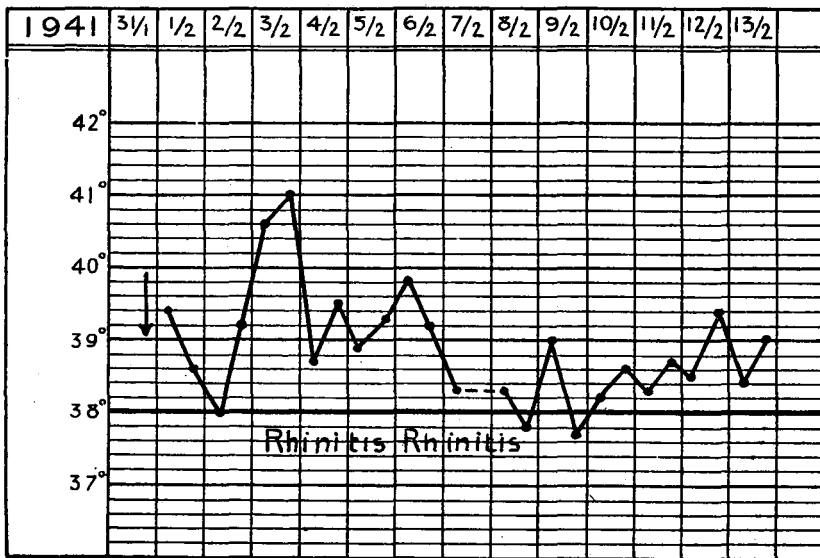


Fig. 13

Fret 11, Kin. (sputum)

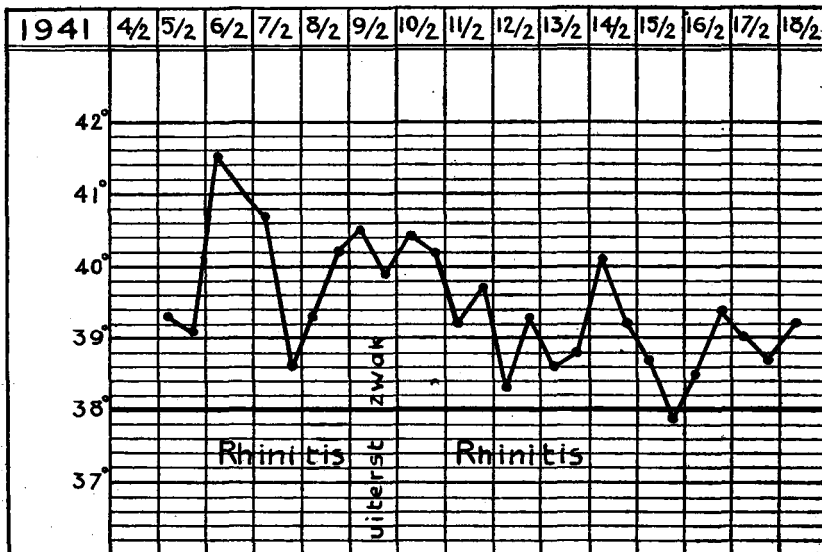


Fig. 14

zelfs bloed uitgeniesd. De volgende dagen komt er dikke etter uit den neus, waardoor een korst om den snuit ontstaat. Het dier neemt sterk in gewicht af, vreet niet, ademt met moeite. Nog op den 7en dag ligt het te snuiven met verstopten neus. Den 9en dag is de neus weer schoon en eet het fret weer behoorlijk. De temperatuur, die na de typische scherpe daling op den derden dag weer omhoog geloopt en later weer gezakt is, bereikt een nieuwen top op den 10en dag, waaraan we geen wezenlijke beteekenis zouden willen toekennen, al is hij bij de fretteninfluenza niet vreemd. De diagnose virus-influenza was in dit geval reeds op den tweeden dag te stellen, met een aan zekerheid grenzende waarschijnlijkheid.

Wij willen met de gegeven voorbeelden volstaan. De eerste vier toonen de moeilijkheid van beoordeeling in die gevallen, waarin die reactie op de enting niet snel en krachtig is. De beide laatste geven een bevredigend beeld van op tijd en snel optredende verschijnselen, kenmerkend voor een in alle opzichten geslaagde frettenproef.

Onderzoek der frettensera. — Als contrôle op de fretten-entingen volgden na 14 dagen de virusneutraliseringsproeven met de frettensera; van 12 dezer proeven geven wij het protocol weer (tabel 7). Behalve de positieve, met uitzondering van Z, worden ter vergelijking 4 negatieve uitgevallen proeven vermeld. De sera werden getitreerd tegen den virusstam WS (laboratoriumstam), gefiltreerd en 10 maal verdund. Over de keuze van dezen stam zie men Hoofdstuk III.

Het heerschende gebrek aan flinke aantallen muizen van gelijk gewicht belette ons verder te gaan dan de verdunningen 1/2, 1/10, 1/50. Dit leverde het nadeel op, dat de titergrens in een aantal gevallen niet volledig werd bereikt.

Niettemin treedt het verschil tusschen neutraliseerende sera en die, welke in het geheel geen virusneutraliseerend vermogen aan den dag legden, zeer duidelijk naar voren.

Tot de negatieve groep behooren zonder eenigen twijfel de frettensera Mey, Sto, Eck, Koo. De sera Web en Smi brachten slechts een spoor van verzwakking van het virus teweeg in de verhouding 1 : 2 (serumverdunding 1/2). De genoemde 6 proeven werden als negatief beschouwd; in tabel 6, die betrekking heeft op de frettenproef, staan Mey en Smi vermeld als geen antilichamen bezittende tegen het influenza-virus.

Tabel 7. Neutraliseeringsproeven met frettersera tegen den virusstam WS (filtraat 10 × verdund).

| Fretterserum, benoemd met letters van den patiënt (verg. tabel 6) | Serumverdunning | | |
|--|--------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| | 1/2 | 1/10 | 1/50 |
| D | 0 0 0 | + + ± | D +++++ D +++++ +++ |
| S | 0 0 0 | 0 0 * | * D +++++ +++ |
| Kin | 0 0 0 | 0 + + | +++ +++ +++ |
| Kru | 0 0 0 | ++ ± 0 | ++ ++ + |
| Dijk | 0 0 0 | + + ± | D +++++ ++++ +++ |
| Bri | 0 0 0 | ++ ++ + | D +++++ ++++ + |
| Mey | D +++++ +++ +++ | D +++++ +++ +++ | D +++++ +++ ++ |
| Smi | +++ +++ ++ | D +++++ D +++++ +++ | |
| Sto | D +++++ D +++++ ++ | D +++++ D +++++ +++ | D +++++ +++ +++ |
| Eck | ++++ ++++ +++ | ++++ ++++ +++ | D +++++ D +++++ D +++++ |
| Web | +++ +++ + | D +++++ D +++++ +++ | D +++++ D +++++ ++++ |
| Koo | D +++++ D +++++ ++ | D +++++ D +++++ ++ | D +++++ D +++++ +++ |

In scherp contrast hiermede staan de frettersera D, S, Kin, Kru, Dijk, Bri, die in de verhouding 1 : 2 het virus geheel neutraliseerden en in de verhouding 1 : 10 in belangrijke mate. In de verhouding 1 : 50 treedt bij deze sera in de meeste gevallen geen sterke mate van neutralisatie aan den dag, hetgeen erop wijst, dat de antigenen verwantschap niet zeer groot is tusschen het virus van de epidemie 1941 en den virusstam WS.

Wij waren in de gelegenheid 2 der positieve sera, S en Z, te titreren tegen den eigen virusstam, zooals later zal worden behandeld. Uit overwegingen van zuinigheid moesten wij de titratie van één dezer sera, Z, tegen WS laten uitvallen, zoodat deze in de tabel 7 niet voorkomt.

Er mag nog aan herinnerd worden, dat de sera Dijk en Bri afkomstig waren van fretten, die klinisch geen duidelijke verschijnselen vertoonden.

Het isoleeren van een drietal virusstammen. — In drie gevallen, waarin de ziekteverschijnselen van het fret, geënt met materiaal van den patiënt, ons zeer kenmerkend toeschenen, sloegen wij den weg in, die leidde tot het isoleeren van den virusstam. Deze weg verschilde in elk der 3 gevallen in details. De figuren 15, 18 en 19 geven van elk der gevallen een schematische voorstelling.

Toelichting bij fig. 15. Het keelspoelsel van patiënt D werd op 24 Januari ten avond geënt bij een fret (F. D I). Deze vertoonde een kenmerkende influenza-infectie, waarvan de symptomen verkort zijn aangeduid op de temperatuurlijst (fig. 18). Op het hoogtepunt van de infectie, dit was in den avond van den 2en dag na enting, werd het fret gedood; een suspensie van de neusslijmvliezen werd geënt bij een volgend fret (F. D II), dat eveneens typisch ziek werd. Dit werd den ochtend van den 3den dag na enting gedood; de suspensie der neusslijmvliezen werd ongefiltreerd bij het derde fret (F. D III) geënt en gefiltreerd bij het vierde fret (F. D III fi). Dit laatste fret was tevens contrôledier, ter aantooning van de filtreerbaarheid van het ziekteverwekkend agens. Het werd in leven gelaten en leverde het reconvalescentieserum, dat in de virusneutralisatieproef werd onderzocht op influenza-antilichamen. Fret D III, met ongefiltreerd materiaal geënt, werd op het hoogtepunt der ziekte gedood ten behoeve van de viruspassage op de muis. Een aantal blinde muispassages bleek noodig, alvorens de muizen stierven aan influenza-pneumonie. Teneinde ons ervan op de hoogte te stellen, dat het van het fret afkomstige (veronderstelde) virus in de muizenlong wel aanwezig

Patiënt D (keelspoelsel, 24 Januari 1941).

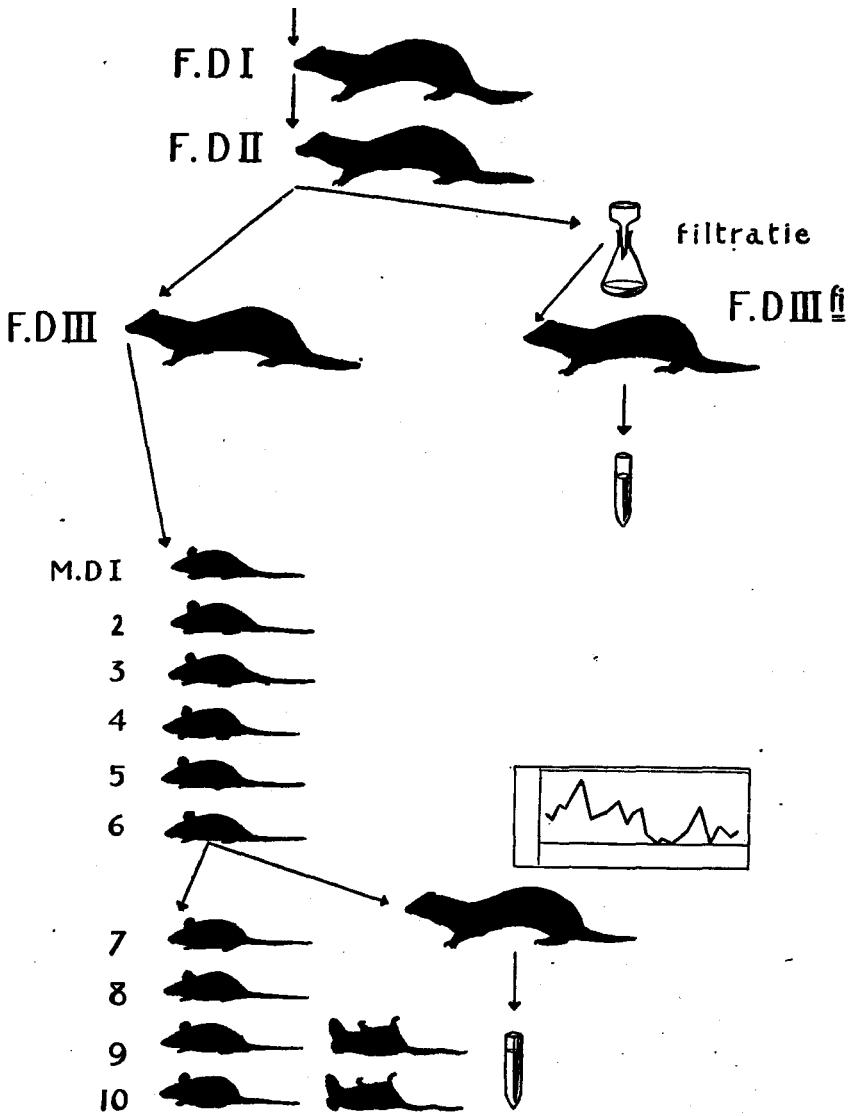


Fig. 15. Het isoleeren van den virusstam D.

Fret DI, II,

III. keelsp. (gefiltreerd met *).

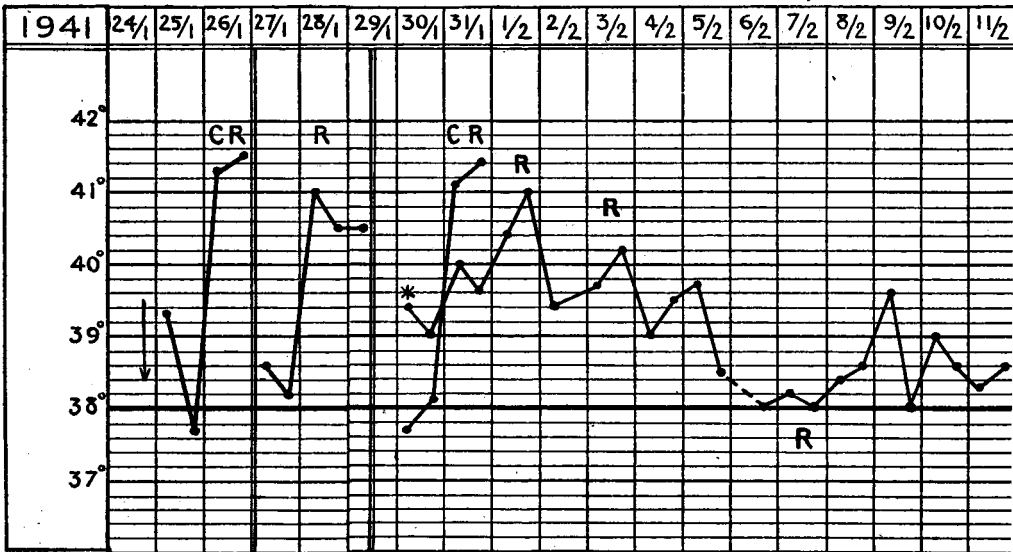


Fig. 16

C = conjunctivitis R = rhinitis

was, werd met een longsuspensie van de zesde muizenpassage een nieuw fret geënt. Dit reageerde prompt met een koortstop en catarrhale verschijnselen van den neus (fig. 17), hetgeen op de tegenwoordigheid van het influenza-virus wees. In de neutraliseeringsproef toonde het serum van dit fret een antilichamentiter, overeenkomstig met die van het „filtraat-fret" (F. D III fi). Getroost vervolgden we de muispassages, die inderdaad na 8 keer plaats gehad te hebben, sterfgevallen begonnen op te leveren. Op dit moment kon het virus beschouwd worden als te zijn aangepast aan de muizenlong. Het toonde zich voortaan in staat, ongefiltreerd toegediend, de dieren binnen 6 dagen aan experimenteele influenza te doen sterven.

Met behulp van vriescoupes, later door celloidinecoupes bevestigd, werden de patholoog-anatomische afwijkingen nagegaan en kenmerkend bevonden. Van dit oogenblik af konden we zeggen den influenza-virusstam D te hebben geïsoleerd.

Het reconvalescentieserum van patiënt D had een hoogen neutraliseerenden titer tegen den virusstam WS, hetgeen bleek zoowel in de v.n.p. (tabel 12, no. 3) als bij de c.b.r. (tabel 16, D). Het serum uit het acute stadium der ziekte ging verloren.

F.D. III M.6 (muizenlongsuspensie)

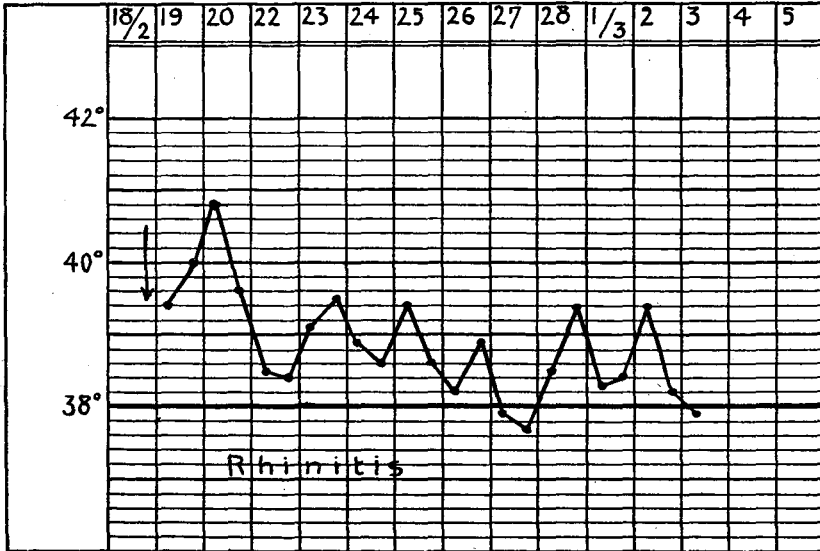


Fig. 17

Voor den bioloog moge het onbevredigend zijn, om een virus geïsoleerd te hebben in den vorm van een geïnfecteerde muizenlong, welke immers nog talrijke andere bestanddeelen bevat dan het virus, in de praktijk is deze vorm van afzondering voldoende. De geïnfecteerde muizenlong levert na in suspensie te zijn gebracht en gefiltreerd, een specifiek ziekteverwekkend agens voor muis en fret. Voor het immunologisch onderzoek is deze vorm van isoleering bevredigend. Immers de geïnfecteerde muizenlong levert in suspensie een specifiek antigeen, volkomen bruikbaar voor de opwekking en de aantooning van specifieke antilichamen, niet alleen tegen het influenza-virus in het algemeen, doch ook tegen afzonderlijke influenza-virusstammen in het bijzonder.

De schema's weergevende de isolering van de virusstammen S (fig. 18) en Z (fig. 19) en de bijbehorende temperatuurlijsten (figuren 20 en 21) spreken na het reeds over stam D gezegde voor zich zelf. Er zijn wisselingen in het aantal der gebruikte passagefretten, om redenen van bijkomstigen aard, die, uiteraard subjectief, leiden tot het uitvoeren van meer of minder passages. Er was ook verschil in het aantal muizenpassages, noodig tot het verkrijgen van letale influenza-infecties, uiteraard buiten invloed van den proefnemer.

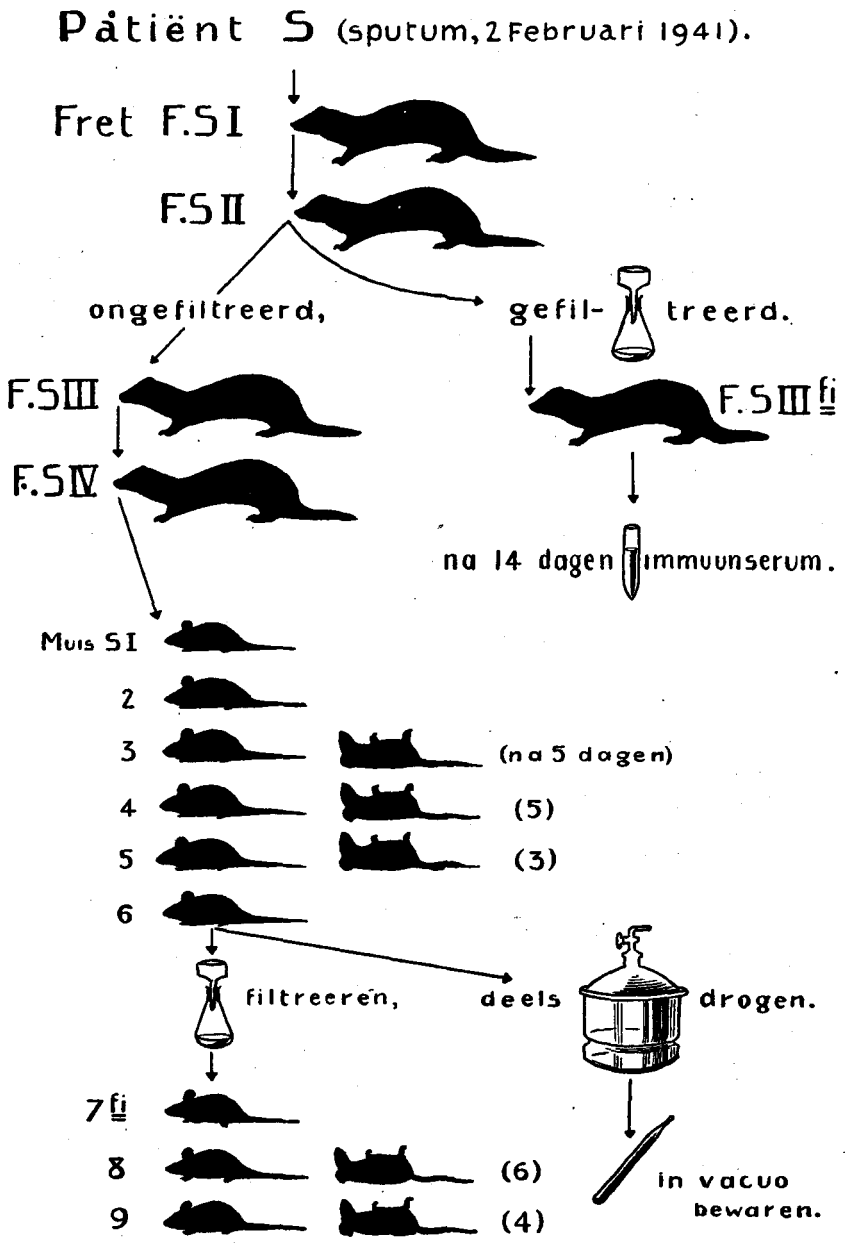


Fig. 18. Het isoleeren van den virusstam S.

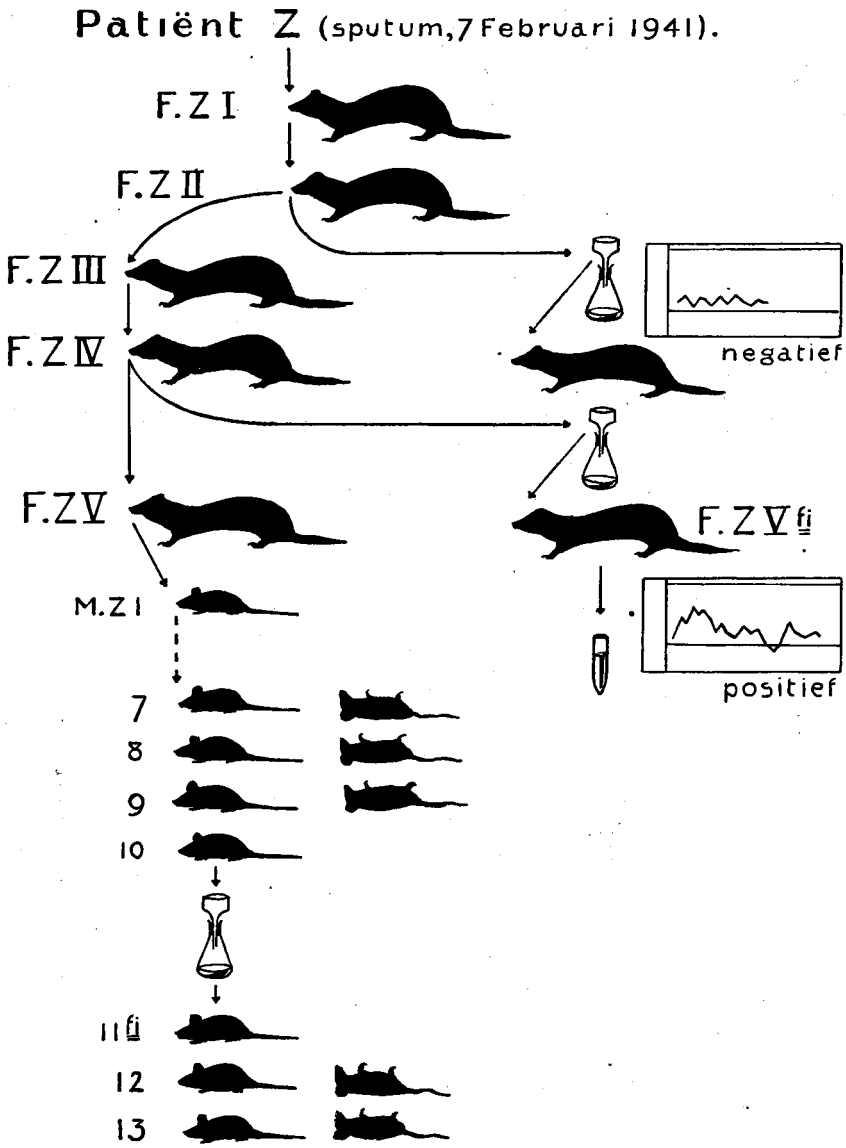


Fig. 19. Het isoleeren van den virusstam Z.

Fret S I, II, III, IV, (sputum)

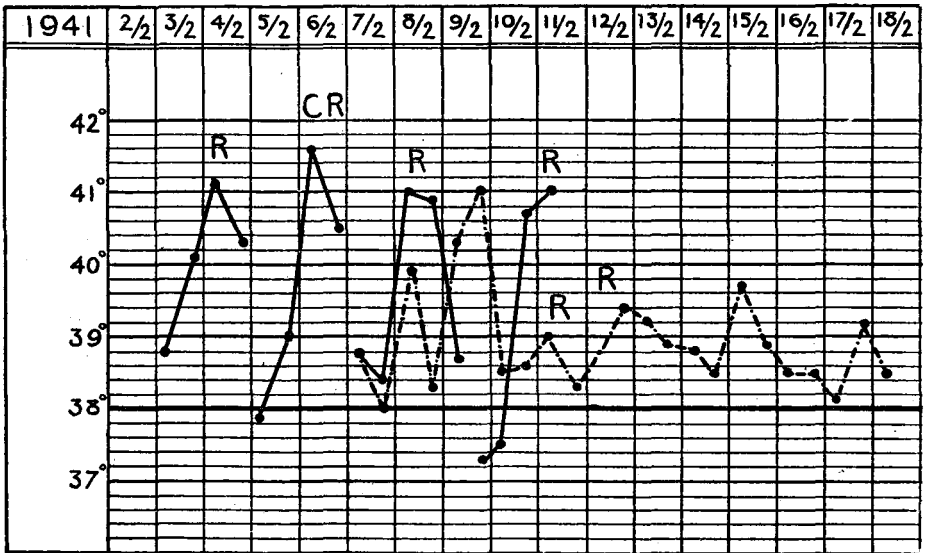


Fig. 20.

Fret S III gefiltreerd (— — —)

De patiëntensera S en Z toonden een sterke stijging van antilichamen tegen den eigen stam in de v.n.p. (tabellen 9 en 10) en tegen den stam WS in de c.b.r. (tabel 15, no. 6 en 7).

In het geval Z werd twee maal neusmateriaal van een fret gefiltreerd toegediend, n.l. van het 2e en 4e passagefret. Het filtraat van fret II bevatte, blijkens het uitblijven van eenige reactie bij het geënte contrôlefret, geen virus. Het filtraat van fret IV verwekte bij het tweede contrôlefret echter typische experimenteele influenza. Tenzij er in het eerste geval een misenting in het spel zou zijn, een mogelijkheid, die nooit geheel mag worden uitgesloten, moeten wij dezen gang van zaken zoo verklaren, dat de virussuspensie, afkomstig van fret II, te zwak was om filtratie te verdragen. Bij fret IV zou dan het virus zich zoodanig aan het frettenorganisme hebben aangepast, dat een grootere virulentie werd bereikt, hetgeen ook het doel is van de herhaalde frettenpassage.

Wat wij de grootere virulentie noemen, kan zoowel berusten op toeneming van de virulentie der virusdeeltjes als op toeneming van het aantal dezer deeltjes. De vermindering in virulentie, welke plaats heeft bij filtratie (zie Hoofdstuk II), wijst wel op deeltjesvermindering, hetgeen ons toestaat te veronderstellen, dat viru-

Fret Z I, II, III, IV, V, (sputum)

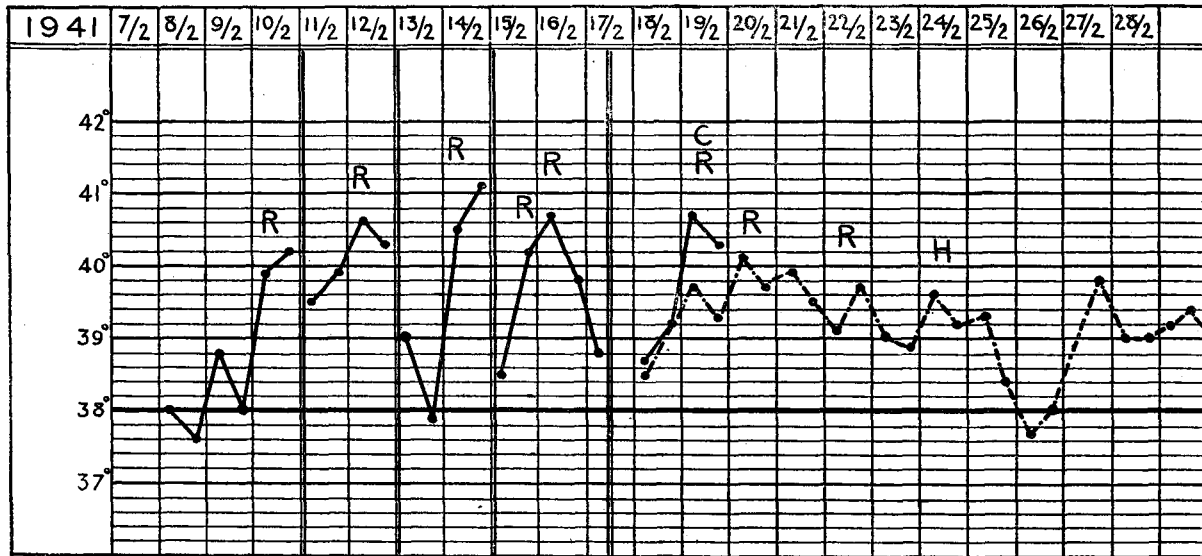


Fig. 21.

Fret V, gefiltreerd (---)

tentietoening op vermeerdering van het aantal der viruselementen zou berusten. Een besluit kan hierover nog niet genomen worden.

Het drogen en in vacuo bewaren van het virushoudend materiaal is, evenals het filtreeren en het winnen van immuunserum, schematisch voorgesteld. Niet aangegeven is, dat van elke frettenpassage neusslijmvliesmateriaal werd geconserveerd. Het ononderbroken gunstige verloop der passages noopte ons echter niet, om op dit materiaal terug te grijpen.

Wij zinspeelden op een subjectief element in het beoordeelen van de verschijnselen bij de passagefretten. Dit heeft ons in een vierde geval (Kru) het in handen krijgen van den virusstam belet. Gekomen tot de derde frettenpassage, achtten we de ziekteverschijnselen niet overtuigend genoeg en staakten de proef. Het reconvalescentieserum van het laatste fret toonde evenwel naderhand een behoorlijken immuuntiter, zoodat een virusinfectie ongetwijfeld aanwezig moet zijn geweest.

Virulentie der nieuwe virusstammen. — De stam D toonde zich, zooals ook uit de moeilijke aanpassing op de muis reeds bleek, weinig virulent voor dit proefdier. In den loop der muizenpassages was de hoogste verdunning, in staat om longafwijkingen te verwekken, 10^{-3} (d.i. een ongefiltreerde muizenlongsuspensie, 1000 maal verdund). De op dezelfde wijze, dus eveneens ongefiltreerd, bepaalde virulentietiter van den stam WS bedraagt 10^{-7} .

De stammen S en Z waren sterker virulent voor muizen; ze gaven ongefiltreerd in de verdunning 10^{-5} nog juist zichtbare afwijkingen.

Van den stam Z verrichten wij een vergelijkende virulentie-titerproef, voor en na filtratie. De tabel 8 geeft het virulentieverlies aan: van 10^{-5} op 10^{-2} .

Immunologisch onderzoek van patiëntensera, met behulp van de virusneutraliseeringsproef (v.n.p.). — Het onderzoek met behulp van de v.n.p. strekt zich uit over de sera van een 43-tal patiënten, te verdeelen in de groep van hen, wier keelspoelsels of sputa geënt waren bij fretten en de veel grootere groep van hen, van wie enkel het serum werd onderzocht.

Het onderzoek met behulp van de complementbindingsreactie, dat verricht werd door W. Hoek †, strekte zich slechts ten deele uit over hetzelfde patiëntenmateriaal. We zullen de uitkomsten ervan uitsluitend als controle op eigen onderzoek aanhalen.

Naar de plaats van herkomst valt het onderzochte materiaal

Tabel 8. Virulentietiter van stam Z, ongefiltreerd en gefiltreerd.

| Virusverduunning | Ongefiltreerd | | Gefiltreerd | |
|------------------|---------------|---------|-------------|-----|
| 10 ⁻⁶ | 0 | 0 | | |
| 10 ⁻⁵ | + | + | | |
| 10 ⁻⁴ | ++ | + | | |
| 10 ⁻³ | D +++++ | ++++ | 0 | 0 |
| 10 ⁻² | D +++++ | D +++++ | + | 0 |
| 10 ⁻¹ | D +++++ | D +++++ | + | ± |
| 1 | | | D +++++ | +++ |

uiteen in 3 groepen : Groningen en omgeving, Utrecht en omgeving en Leiden en omgeving. Wij laten hier een enkel serum uit Amsterdam buiten beschouwing. Wat de data betreft, blijven alle ziektegevallen binnen de maanden Januari en Februari van 1941, met uitzondering van 3 Groningsche gevallen, die vielen in Maart en begin April van dat jaar.

Wat den aard van het ziekteproces aangaat, valt op te merken, dat in Januari en begin Februari voornamelijk sera werden onderzocht, afkomstig van patiënten met ongecompliceerde influenza, terwijl in den verderen loop van Februari hoofdzakelijk aandacht werd geschonken aan sera van patiënten met complicaties in de diepere luchtwegen. Uit Utrecht en Leiden werden uitsluitend sera van zulke patiënten opgestuurd.

In de v.n.p. werden de sera getitreerd tegen een 10 maal verdund filtraat van den virusstam WS, met uitzondering van de sera S en Z, die werden getitreerd tegen de uit het sputum dezer patiënten geïsoleerde virusstammen.

Onderzoek van reconvalescentieserum naast serum uit het acute stadium. — De fraaiste en zekerste uitkomsten kunnen van de v.n.p. verwacht worden, als ze verricht wordt met 2 sera van denzelfden patiënt, n.l. het serum uit de eerste ziektedagen (acuut serum) en het reconvalescentieserum, genomen 10 tot 12 dagen later. In het eerste serum, dat nog als normaal beschouwd mag

worden, komen weinig of geen antilichamen voor tegen het virus, dat de acute infectie veroorzaakt; deze worden eerst gevormd in den loop van het herstel. In het geval van een influenza-virus-infectie moet er dus een stijging in antilichamentiter in het reconvalescentieserum zijn waar te nemen in vergelijking met die van het serum uit de eerste ziektedagen van den patiënt. Immers het geval kan zich voordoen, dat antilichamen reeds in het begin van de ziekte aanwezig zijn als overblijfsel van een immuniteit, opgedaan tengevolge van een vroeger doorgemaakte infectie.

Serumtitraties tegen den eigen virusstam. — Twee keer werden patiëntensera getitreerd tegen den virusstam, welke uit het materiaal van den patiënt zelf was geïsoleerd; het waren de gevallen S en Z. Deze proeven vormen hier den sluitsteen van het onderzoek. De uitkomsten zijn vervat in de tabellen 9 en 10, waarin de patiëntensera (acuut I en reconvalescentie II) naast de frettensera voorkomen, die in dezelfde proef onderzocht werden.

Tabel 9. Neutraliseeringsproef met frettensera en patiëntensera S tegen virusstam S (ongefiltreerd 5 % muizenlong-suspensie).

| Antiserum | Virusstam | Serumverduunning | | | |
|--|------------------------------------|------------------|---------|------|-------|
| | | 1/2 | 1/10 | 1/50 | 1/250 |
| Fret S (a), geënt met keelspoelsel | S (ongefil- treerd 1 : 1) | 0 | 0 | * | + |
| | | 0 | 0 | ± | 0 |
| | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Fret S (b), geënt met sputum | | 0 | 0 | + | +++ |
| | | 0 | 0 | + | ++ |
| | | 0 | 0 | + | + |
| Patiënt S I (31-1-'41) | | ± | D +++++ | | |
| | | 0 | D +++++ | | |
| | | 0 | D +++ | | |
| Patiënt S II (14-2-'41) | | | 0 | ± | + |
| | | | 0 | 0 | + |
| | | | 0 | 0 | 0 |

(a) De temperatuurlijst van dit fret is weergegeven in fig. 13.

(b) Van dit fret vindt men de temperatuurkromme in fig. 20 als Fret S III gefiltreerd.

Tabel 10. Neutraliseeringsproeven met frettensera en patiëntensera Z tegen virusstam Z (ongefiltreerd 5 % muizenlongsuspensie).

| Antiserum | Virusstam | Serumverduunning | | | | |
|----------------------------|-----------------------------|------------------|------|---------|-------|--------|
| | | 1/2 | 1/10 | 1/50 | 1/250 | 1/1250 |
| Fret Z | Z | | 0 | 0 | 0 | ++ |
| | | | 0 | 0 | + | ++ |
| | | | 0 | 0 | + | ++ |
| Patiënt Z I (7-2-'41) | Z (ongefiltreerd 1:1) | 0 | +++ | D +++++ | | |
| | | 0 | +++ | D +++++ | | |
| | | 0 | ++ | D +++++ | | |
| Patiënt Z II (17-2-'41) | Z | | 0 | 0 | 0 | +++ |
| | | | 0 | 0 | + | ++ |
| | | | 0 | ± | + | + |

Beoordeeling.

In beide proeven bezitten de reconvalescentiesera, zowel van de patiënten als van de fretten, een zeer veel hooger titer dan de patiëntensera uit de eerste ziekte-dagen. De titergrens werd in geen van beide proeven bereikt; in het geval S is een 25- tot 125-voudige stijging vast te stellen, in het geval Z een 125-voudige.

Van patiënt D, van wien de virusstam eveneens geïsoleerd werd, raakte het serum uit het begin van de ziekte verloren bij het uitvoeren van de complementbindingsreactie, zodat een proef als met de stammen S en Z niet kon worden genomen.

Serumtitraties tegen den stam W.S. — Tabel 11 geeft het protocol van de virus-neutraliseeringsproeven met de twee sera van een aantal andere patiënten weer.

Tabel 11. Virusneutraliseeringsproeven met patiëntensera tegen den virusstam WS (filtraat 10 × verdund).

| Patiëntens- serum | Serumverduunning | | | | |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | 1/2 | 1/10 | 1/50 | 1/250 | 1/1250 |
| Kin I (5-2-'41) | | +++ +++ ++ | D ++++ +++ +++ | D ++++ D ++++ | |
| Kin II (24-2-'41) | | 0 + 0 | +++ +++ ++ | D ++++ D ++++ +++ | ++++ ++++ +++ |
| Mey I (17-1-'41) | ++ + + | D ++++ ++++ ++++ | D ++++ D ++++ D ++++ | | |
| Mey II (8-2-'41) | 0 0 0 | + + ± | +++ +++ +++ | D ++++ D ++++ D ++++ | D ++++ D ++++ D ++++ |
| Smi I (7-2-'41) | + + 0 | +++ ++ * | D ++++ D ++++ ++++ | | |
| Smi II (17-2-'41) | 0 0 0 | ± 0 0 | + + 0 | ++++ ++++ +++ | D ++++ D ++++ ++ |
| Doe I (11-2-'41) | + + ± | D ++++ ++++ +++ | D ++++ D ++++ D ++++ | D ++++ D ++++ D ++++ | |
| Doe II (24-2-'41) | | + 0 0 | ++ + ± | D ++++ D ++++ +++ | D ++++ D ++++ D ++++ |
| Bos I (10-2-'41) | D ++++ D ++++ D ++++ | D ++++ D ++++ D ++++ | D ++++ D ++++ D ++++ | D ++++ D ++++ D ++++ | |
| Bos II (25-2-'41) | ± 0 0 | ++ ++ + | D ++++ D ++++ D ++++ | * * * | |

I = acut serum.

II = reconvalescentieserum.

Beoordeeling.

Serum Kin. Het verschil in neutraliseerenden titer tusschen de sera I en II komt vooral in de verdunning 1 : 10 duidelijk tot uiting. Hoewel de proef in de laagste verdunning 1 : 2 niet is uitgetzet,

is een stijging van ongeveer 5 maal met voldoende zekerheid aangetoond.

Serum Mey. Het verschil in virusneutraliseerenden titer tusschen de sera I en II springt in het oog. Mey II geeft in de verdunning 1 : 50 een weliswaar zwakke, maar toch merkbare bescherming. In de verdunning 1 : 10 is de bescherming aanmerkelijk, terwijl zij bij verdunning 1 : 2 volledig is. Vergelijken we deze uitkomsten met die van Mey I, dan valt een stijging in virusneutraliseerenden titer van 5 of 25 maal vast te stellen. Dit wijst zeker op het doormaken van een influenza-virusinfectie.

Serum Smi. Duidelijke titerstijging van 25 maal.

Serum Doe. Ook titerstijging van 25 maal.

Serum Bos. Stijging tusschen 5 en 25 maal.

In alle vijf gevallen is dus een duidelijke, veelal sterke stijging in antilichamentiter vast te stellen, waarmee het doormaken van een influenza-infectie is bewezen.

Onderzoek van reconvalescentiesera naast een standaardserum.

— In de overige gevallen hadden we niet het geluk over het acuut serum te beschikken, zoodat uitsluitend het reconvalescentieserum voor titratie in aanmerking kwam. Wij namen aan, dat er hoogstwaarschijnlijk een influenza-virusinfectie was doorgemaakt, indien het serum een antilichamentiter bereikte, geheel of nagenoeg geheel overeenkomend met die van een standaardserum, afkomstig van een volstrekt zeker positief geval. Wij kozen daartoe het reconvalescentieserum van den patiënt S, die het uitgangsmateriaal heeft geleverd voor de isolatie van den virusstam van dien naam (S).

Thans volgt het protocol van een zevental proeven, die op deze wijze werden uitgevoerd (tabel 12). In de meest rechtsche kolom is de neutraliseerende titer weergegeven in een fractie van dien van het standaardserum. Wij noemen deze fractie titerverhouding.

Tabel 12. Neutraliseeringsproeven met patiëntensera tegen den virusstam WS (filtraat 1 : 10).

| Patiëntens- serum | Serumverduunningen | | | | | Titer- verhouding |
|--|--------------------|----------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------|
| | 1/2 | 1/10 | 1/50 | 1/250 | 1/1250 | |
| Standaard- serum S II (14-2-'41) | 0 0 0 | 0 0 0 | + 0 0 | ++ ++ ++ | D +++++ D +++++ ++++ | S |
| 1. Eck (29-1-'41) | | ++ ++ 0 | D +++++ ++++ ++++ | D +++++ D +++++ ++++ | | S/25 |
| 2. Web (29-1-'41) | + + 0 | +++ ++ + | D +++++ ++++ ++ | D +++++ D +++++ ++++ | | S/25 |
| 3. D (14-2-'41) | 0 0 0 | 0 0 0 | + + 0 | ++++ ++++ +++ | D +++++ ++++ ++++ | < S |
| 4. Swe (10-2-'41) | | ++ ++ ++ | D +++++ D +++++ ++++ | * D +++++ ++++ | | S/25 |
| 5. Lan (22-2-'41) | | 0 0 0 | ± 0 0 | + + ± | | S |
| 6. Zwa (4-4-'41) | | ± 0 0 | + + ± | ++++ ++++ + | | S/5 |
| 7. Wes (24-2-'41) | | 0 0 0 | ++ 0 0 | ++++ ++ ++ | D +++++ D +++++ D +++++ | S |

Beoordeeling.

De sera 3, 5 en 7 bereiken een titer, overeenkomend met dien van het standaardserum; zij zijn als positief te beschouwen. Serum 6 is iets zwakker positief, terwijl 1, 2 en 4, welke een minstens 25 maal zwakkeren titer bereiken dan het standaardserum, veilig als negatief beschouwd mogen worden. De geringe neutraliseerende werking, die deze sera niettemin vertoonen, zou kunnen wijzen op een zeer zwakke infectie, of wel op een immuniteit, overgebleven uit een influenza, die in het verleden werd doorgemaakt.

Een volgende groep sera werd eveneens vergeleken met standaardserum S II. Dit bereikte in deze proeven een hooger titer dan in de vorige, klaarblijkelijk ten gevolge van een geringere

virulentie van het virusfiltraat. Een dergelijk verschil kan zich in de praktijk van het virusonderzoek gemakkelijk voordoen; het is uiterst moeilijk steeds een virussuspensie van gelijke sterkte voorradig te hebben. Vandaar dat men bij elke neutraliseeringsproef het standaardserum opnieuw moet laten medelopen (tabel 13).

Tabel 13. Neutraliseeringsproeven met patiëntensera tegen den virusstam WS (filtraat 1 : 10).

| Patiënten-serum | Serumverduunningen | | | Titer-verhouding |
|------------------------------------|--------------------|----------------|-------------------------|------------------|
| | 1/10 | 1/50 | 1/250 | |
| Standaard-serum S II (14-2-'41) | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | S |
| 1. Gri (3-2-'41) | + 0 0 | * +++ ++ | +++ +++ ++ | S/25 |
| 2. Pie (14-2-'41) | 0 0 0 | * ++ + | D +++++ +++++ +++ | S/25 |
| 3. Fra (25-2-'41) | 0 0 0 | 0 0 0 | ± ± 0 | < S |
| 4. Vri (1-3-'41) | 0 0 0 | 0 0 0 | + 0 0 | < S |
| 5. Klo (11-3-'41) | 0 0 0 | + 0 0 | + + + | < S |

Beoordeeling.

De sera 3, 4 en 5 bereiken een titer, welke het standaardserum nabijkomt; zij mogen als positief gelden. De sera 1 en 2 zijn minstens 25 maal zwakker en worden negatief gerekend.

In de tot hertoe gegeven tabellen werden de Groningsche gevallen behandeld; het onderzoek van de sera uit Utrecht en Leiden is samengevat in tabel 14.

Tabel 14. Neutraliseeringsproeven met patiëntensera tegen den stam WS (filtraat 1 : 10).

| Patiëntens- serum | Serumverduningen | | | Titer- verhouding |
|--------------------------------|---------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------|
| | 1/10 | 1/50 | 1/250 | |
| Standaard- serum | 0 | + | ++ | S |
| S II (14-2-'41) | 0 | + | ++ | |
| | 0 | 0 | ++ | |
| 1. H. de B. (7-3-'41) | ++++ ++++ +++ | D +++++ D +++++ ++++ | D +++++ D +++++ ++++ | O |
| 2. H. v. d. H. (27-2-'41) | 0 0 0 | 0 0 0 | + 0 0 | > S |
| 3. G. R. (28-2-'41) | 0 0 0 | ± ± 0 | ++ ++ ++ | S |
| 4. C. v. d. W. (28-2-'41) | 0 0 0 | 0 0 0 | + 0 0 | > S |
| 5. A. Ma. (28-2-'41) | ± ± 0 | ++ + + | D +++++ ++++ +++ | S/5 |
| 6. H. O. (28-2-'41) | 0 0 0 | + + + | +++ +++ ++ | < S |
| 7. C. E. P. (28-2-'41) | + 0 0 | ++ + + | +++++ +++ ++ | < S |
| 8. A. M. (28-2-'41) | 0 0 0 | + + 0 | +++ +++ ++ | < S |
| Standaard- serum S II | | 0 0 0 | ++ + 0 | S |
| 9. S. O. (1-3-'41) | 0 0 0 | 0 0 0 | + 0 0 | > S |
| 10. J. v. d. Pl. (28-2-'41) | 0 0 0 | 0 0 0 | + 0 0 | > S |
| 11. G. P. (28-2-'41) | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 | > S |
| 12. J. W. (3-3-'41) | ++ + + | +++ +++ +++ | D +++++ D +++++ D +++++ | S/25 |
| 13. J. G. (3-3-'41) | 0 0 0 | + 0 0 | ++ + + | S |
| Standaard- serum S II | | + 0 | +++ +++ | S |
| 14. J. K. (3-3-'41) | +++ ++ + | D +++++ D +++++ ++++ | D +++++ D +++++ D +++++ | S/25 |
| 15. G. v. D. (3-3-'41) | + 0 0 | D +++++ +++ +++ | D +++++ D +++++ D +++++ | S/25 |
| 16. W. C. (3-3-'41) | + + 0 | ++ + + | +++ +++ ++ | < S |
| 17. D. G. (3-3-'41) | + 0 0 | + + + | +++ * * | < S |

Beoordeeling.

Een vijftal sera: 2, 4, 9, 10 en 11 toonen een hooger titer dan het standaardserum; ze zijn sterk positief. De sera 3 en 13 komen met het standaardserum in titer nagenoeg overeen; ze zijn positief.

De sera 5, 6, 7, 8, 16 en 17 mogen slechts als zwak positief gelden, vooral die, welke in de verdunning 1 : 10 nog niet volledig neutraliseerden. De vraag, of de desbetreffende patiënten een influenza-virusinfectie hebben doorgemaakt, moet in de gevallen 5, 7, 16 en 17 veiligheidshalve met „dubieus” beantwoord worden.

De sera 1, 12 en 14 en 15 geven in geen enkele verdunning een belangrijke neutralisatie; zij worden als negatief beschouwd.

Het nadeel, dat de proeven alleen met het reconvalescentieserum opleveren, in vergelijking met die waar ook het acute serum onderzocht kan worden, springt in het oog. Hier is geen directe aflezing mogelijk, doch zijn wij aangewezen op een schatting. Niettemin komen de verschillen tusschen positieve en negatieve sera duidelijk naar voren. In de minder duidelijke gevallen moet de conclusie in het midden gelaten worden.

Wij moeten ons met het onvermijdelijke tevreden stellen. Het zal altijd tijdens een influenza-epidemie zoo gaan, dat naast gevallen, die klinisch aanstonds als influenza worden herkend, zich, vooral in den verderen loop der epidemie, gevallen van pneumonieën voordoen, waarvan het aetiologische moment gezocht moet worden in een aanval van influenza, die echter niet onder de aandacht van den arts kwam. In al deze gevallen zal men nooit over een serum uit de eerste ziektedagen beschikken. Ook al wordt bij een dergelijken patiënt aanstonds bij de opneming vena-punctie gedaan en later opnieuw tijdens het herstel, dan beschikt men daarmee nog niet over twee sera, waarin een stijging in antilichamentiter tegen influenza is te verwachten. Beide sera bevatten een gelijken immunotiter, omdat zij beide ten opzichte van de influenza-infectie reconvalescentieserum zijn.

De complementbindingsreactie (c.b.r.). — Deze gaf in de betrekkelijk weinig gevallen, waarin zij werd verricht, een bevestiging van de neutralisatieproef. Er was echter één uitzondering. Bij patiënt Web gaf de v.n.p. een negatieve uitkomst, ook bij herhaling. De c.b.r. leverde daarentegen een positieven uitslag. Dit was het eenige geval van een afwijkende uitkomst der beide immunologische werkwijzen. Wij wijzen erop, dat anderen bij een meer uitgebreid onderzoek ook wel op gebrek aan overeenstemming tusschen beide proeven zijn gestuit. (Zie Hoofdstuk III.)

Wij geven de protocollen van een aantal proeven weer, mede als voorbeelden van de aflezing (tabel 15). Ook hier levert de dubbele proef, met acuut en reconvalescentieserum, een direct afleesbaar titerverschil op, terwijl de reactie, alleen met een reconvalescentieserum, verricht moet worden in vergelijking met een erkend positief standaardserum.

Wij herinneren eraan, dat complementbinding het uitblijven der haemolyse ten gevolge heeft; dat dus het uitblijven der haemolyse en de mate van dat uitblijven de mate van complementbinding weerspiegelt, en daarmee tot op zekere hoogte de sterkte van de antigeen-antilichamenreactie. Wat wij in de proef aflezen is het uitblijven der haemolyse, ook wel genoemd de remming. De afnemende graden van remming worden aangegeven met de teekens + + + +, + + +, + + en +, waarin het eerste teeken volledig uitblijven der haemolyse beteekent en het laatste een niet volledige opheldering. Het teeken — beteekent volledige haemolyse.

Tabel 15. Complementbindingsproeven met dubbele patiëntensera.

| Sera | Serumverduunningen | | | | | | Antigeencontrole | | Serumcontrole | |
|----------|--------------------|------|------|------|------|------|------------------|----------|---------------|----------|
| | 1 | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 2 m.h.d. | 3 m.h.d. | 2 m.h.d. | 3 m.h.d. |
| 1. Eck I | ++++ | ++++ | +++ | + | — | — | — | — | ++++ | ++++ |
| Eck II | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 2. Sto I | +++ | ++ | + | + | — | — | + | — | — | — |
| Sto II | +++ | ++ | + | + | — | — | + | — | — | — |
| 3. Web I | +++ | ++ | + | + | — | — | + | — | + | — |
| Web II | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | +++ | + | — | + | — |
| 4. Mey I | + | + | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Mey II | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | — | — | — | — | — |
| 5. Koo I | +++ | + | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Koo II | +++ | + | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 6. S I | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| S II | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | — | — | — | — |
| 7. Z I | ++ | ++ | + | — | — | — | — | — | + | — |
| Z II | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | + | — | — | — | — |
| 8. Gri I | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Gri II | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

Beoordeeling.

1. Eck. Met serum I wordt in een reeks verdunningen remming der haemolyse verkregen, hetgeen wijst op verdwijning van complement. Daar echter ook de serumcontrôle (waarin het antigeen als reagens is weggelaten) volledige remming geeft, moet een specifieke complementbinding uitgesloten worden.

Het tweede serum geeft in het geheel geen remming der haemolyse, vertoont dus geen complementbinding. Hier is geen specifieke antigeen-antilichamenreactie aanwezig, hetgeen het besluit wettigt, dat de patiënt niet lijdend is geweest aan een influenza-virusinfectie, wat in overeenstemming is met de uitkomst van de v.n.p.

2. Sto. De sera I en II vertoonen beide remming tot in het vierde buisje. Mocht dit al op een specifieke complementbinding wijzen, dan is deze bij het eerste serum in gelijke mate op te merken als in het tweede, hetwelk t.o.v. het eerste volgens de proef niet als reconvalescentieserum mag gelden. Er zou hier sprake kunnen zijn van antilichamen, overgebleven uit een vorige influenza-infectie. Hoe dit zij, de uitkomst van de proef (c.b.r.) is in overeenstemming met de v.n.p., en evenzeer met de frettenproef, die geen acute influenza aan het licht bracht.

In deze en de volgende proef, die gelijktijdig genomen werden, valt een geringe remming in de antigeencontrôle op te merken, en wel bij 2 m.h.d. Bij 3 m.h.d. trad deze remming niet meer op en daar de hoofdproef met 3 m.h.d. genomen werd, zal de invloed op den uitslag daarvan, hoewel aanwezig, niet van doorslaande beteekenis zijn geweest.

3. Web. Hoewel serum I een ongewoon hooge en naar het schijnt specifieke remming vertoont, toont het tweede een belangrijke stijging van de remming, hetgeen op een specifieke antigeen-antilichamenreactie kan wijzen. Echter is deze uitkomst niet in overeenstemming met de v.n.p.

De proeven 2 en 3, hoewel niet fraai wegens de remming in de antigeencontrôle, vermelden we toch uitvoerig, om op eenige moeilijkheden, die zich bij de complementbindingsreactie voordoen, den nadruk te leggen. Zoo doet zich bij 3. Web een lichte remming voor, zoowel in de antigeen- als in de serumcontrôle bij het gebruik

van 2 m.h.d. complement. Daar in de hoofdproef 3 m.h.d. werd toegepast, en bovendien de aspecifieke remmingen zich zowel bij I als bij II voordoen, wordt de aflezing van de hoofdproef er niet door belemmerd.

4. Mey. Voorbeeld van een fraai positief uitgevallen proef. Zeer belangrijke titerstijging bij serum II, tot in de verdunning 1/16. Overeenkomst met v.n.p.

5. Koo. Voorbeeld van een goede, negatief uitgevallen proef; geen titerstijging. V.n.p. niet verricht.

6. S. Zeer hoge titer van serum II; serum I volledig negatief. Overeenstemming met v.n.p.

7. Z. Belangrijke titerstijging, overeenkomstig v.n.p.

8. Gri. Geen titerstijging, overeenkomstig v.n.p.

Thans volgen een tweetal proeven met enkele reconvalescentiesera, naast S 2 als standaardserum (tabel 16).

Tabel 16. Complementbindingsproeven met reconvalescentiesera naast een standaardserum.

| Sera | Serumverduunningen | | | | | | Antigeen- controle | | Serumcontrole | |
|------|--------------------|------|------|------|------|------|-----------------------|------------|---------------|------------|
| | 1 | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 2 m. h. d. | 3 m. h. d. | 2 m. h. d. | 3 m. h. d. |
| S II | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++ | — | — | + | — |
| D | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | — | — | — | — |
| Kin | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | — | — | — | — | + | — |

Beoordeeling.

D. Hooge titer van complementbindende antilichamen. Nog fraaier was de proef geweest, indien het serum in hogere verdunningen was uitgezet, zoodat een titergrens was bereikt.

Kin. Antilichamen duidelijk aanwezig, zij het ook, dat de titer belangrijk lager is dan bij het standaardserum. Voor de remmingen

in de serumcontrôle bij 2 m.h.d. geldt mutatis mutandis het gezegde bij serum 3 Web van de voorgaande tabel.

In het volgende overzicht worden de uitkomsten der bovenvermelde immunologische proeven met die der frettenproef samen-gevat en het besluit of het influenza-virus al dan niet als aetiologische factor opgevat moet worden, afgelezen. (Tabel 17.) Volledigheidshalve worden als aanvulling tevens de gevallen opgenomen, alle afkomstig uit Groningen, waarbij Van Bruggen met behulp van de v.n.p. de pathogene werking van het influenza-virus kon bewijzen.

Het bereikte en het bereikbare. — In 26 van de 43 door ons onderzochte gevallen kon dus de op klinische gronden geuite diagnose influenza worden bevestigd. In 10 gevallen kon de afwezigheid van het influenza-virus, c.q. van antilichamen ertegen, worden vastgesteld. In de overige 7 gevallen moest de conclusie dubieus luiden. In 17 der aanvullende gevallen kon de klinische diagnose serologisch worden bevestigd. Het is duidelijk, dat het besluit dan het meest overtuigend is, als alle proeven (fretenting en drievoudig immunologisch onderzoek) gezamenlijk in dezelfde richting wijzen. Dit neemt niet weg, dat iedere proef op zichzelf haar speciale beteekenis heeft.

Wij willen echter ons onderzoek allerminst volledig noemen; met name is het te betreuren, dat niet steeds naast de virusneutraliseeringsproef de complementbindingsreactie werd uitgevoerd. Om technische redenen kon deze reactie niet in het gewenschte tempo voortgang vinden. Bovendien moest bij een honderdtal serumparen (acuut en reconvalescentie), die we buiten de behandelde hadden verzameld, noodgedwongen zelfs de v.n.p. achterwege blijven. Ten aanzien van het zeer fraaie materiaal, dat ons ter beschikking stond, is het werk een „romponderzoek” gebleven.

Wij wijzen er met nadruk op, dat een volledig uitgevoerd serum-onderzoek voor influenza de beschikking eischt over honderdtallen proefmuizen per week en over een laboratoriumorganisatie, welke toelaat, dat ettelijke malen per week een reeks complementbindingsproeven wordt verricht. Wie in aanmerking neemt, wat een wekelijksche uitvoering van de Wassermannreactie voor menig laboratorium beteekent, zal dezen eisch niet geringschatten.

Zonder dat aan de hoogste eischen voldaan wordt, is slechts een oriënteerend onderzoek mogelijk. De v.n.p. kan zoo noodig met beperkte aantallen muizen in slechts enkele verdunningen (1/10,

Tabel 17. Overzicht van alle gevallen uit de epidemie van Januari—Februari 1941, welke op het influenza-virus als pathogene factor werden onderzocht.

| Patiënt. | Clinische influenza? | Diagnose van het longproces | Ziekte opge- wekt bij fret | Antilichamen in | | | Uitslag van het onder- zoek naar influenza- virus |
|---------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------------------|-------------------|---------------|----------|---|
| | | | | fretten- serum | patiëntensrum | | |
| | | | | | v. n. p. | v. n. p. | |
| D. | + | bronchitis | + | + | + | + | Bevestigend |
| S | + | | + | + | + | + | |
| Kin | + | | + | + | + | + | |
| Z | + | | + | + | + | + | |
| Kru | + | pneumonie | + | + | geen serum | | |
| Dijk | + | | ± | ± | geen serum | | |
| Bri | ? | pneumonie | ± | + | geen serum | | |
| Mey | + | bronchitis | 0 | 0 | + | + | |
| Smi | + | | 0 | 0 | + | * | |
| Hui | + | | * | * | + | * | |
| Kra | ? | bronchitis | * | * | + | * | |
| Lan | + | pneumonie | * | * | + | * | |
| Doe | + | | * | * | + | * | |
| Bos | + | | * | * | + | * | |
| Fra | ? | croup. pneumonie | * | * | + | * | |
| Vri | ? | bronchitis | * | * | + | * | |
| Klo | + | pneumonie | * | * | + | * | |
| Zwa | ? | empyeem | * | * | + | * | |
| Wes | ? | pneumonie | * | * | + | * | |
| H. v. d. H | + | pneumonie | * | * | + | * | |
| G. R | + | bronchopneumonie | * | * | + | * | |
| C. v. d. W | + | lob. pneumonie | * | * | + | * | |
| S. O | + | bronchopneumonie | * | * | + | * | |
| J. v. d. P | + | pneumonie | * | * | + | * | |
| G. P | ? | bronchopneumonie | * | * | + | * | |
| J. Gl | + | croup. pneumonie | * | * | + | * | |
| Web | + | | 0 | 0 | 0 | + | Twijfelachtig |
| A. Ma | + | pleuritis sicca | * | * | ± | * | |
| H. O | + | lob. pneumonie | * | * | ± | * | |
| C. E. P | + | bronchopneumonie | * | * | ± | * | |
| A. M | + | pleur. exsudaat | * | * | ± | * | |
| W. C | ? | bronchopneumonie | * | * | ± | * | |
| D. G | + | bronchopneumonie | * | * | ± | * | |
| Sto | + | | 0 | 0 | 0 | 0 | Ontkennend |
| Eck | ? | | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Koo | + | | 0 | 0 | * | 0 | |
| Gri | ? | empyeem | * | * | 0 | 0 | |
| Swe | ? | empyeem | * | * | 0 | * | |
| Pie | — | pneumonie | * | * | 0 | * | |
| H. d. B | ? | | * | * | 0 | * | |
| J. W | ? | bronchopneumonie | * | * | 0 | * | |
| J. K | + | bronchopneumonie | * | * | 0 | * | |
| G. v. D | ? | bronchopneumonie | * | * | 0 | * | |
| Aanvulling : | | | | | | | |
| Gr | + | bronchitis | * | * | + | * | Bevestigend |
| E. K | + | angina | * | * | + | * | |
| M. S | + | | * | * | + | * | |
| J. Ja | + | | * | * | + | * | |
| M. D | + | | * | * | + | * | |
| M. B | + | angina | * | * | + | * | |
| A. V | + | | * | * | + | * | |
| J. W | + | | * | * | + | * | |
| J. P | + | bronchitis | * | * | + | * | |
| G. D | + | | * | * | + | * | |
| J. K | + | | * | * | + | * | |
| W. J. B | + | | * | * | + | * | |
| J. J | + | | * | * | + | * | |
| J. N | + | | * | * | + | * | |
| W | + | bronchopneumonie | * | * | + | * | |
| B | + | bronchopneumonie | * | * | + | * | |
| A. S | + | | * | * | + | * | |
| J. M. W | + | | * | * | ± | * | Twijfelachtig |

Verklaring: * proef niet verricht. + uitslag positief. ± uitslag twijfelachtig. 0 uitslag negatief.

1/50) worden uitgezet ; de c.b.r. kan geleidelijk volgen, wat echter de moeilijkheid meebrengt van het deugdelijk bewaren der sera. Voor een volledig onderzoek moet echter meer uitgebreid en meer tegelijkertijd verricht kunnen worden. Ons werk is dus in vele opzichten slechts wegwijzend. Juist in het begin van 1941 beleefden we de ineenstorting van de muizenmarkt als gevolg van den oorlog. Pijnlijk wreekte zich, dat er nooit voorzien was in een proefdierenkwekerij voor wetenschappelijke doeleinden, onafhankelijk van den particulieren handel. Zonder de instelling daarvan zal in Nederland een meer dan oriënteerend onderzoek op een gebied als dat der influenza nooit kunnen worden verricht.

HOOFDSTUK V.

Antigene structuur van de in Groningen geïsoleerde influenza-virusstammen

Inleiding. — In Hoofdstuk I werd beschreven, hoe Francis en Magill in Amerika en Wilson Smith en Andrewes in Engeland de antigene structuur bepaalden van een aantal influenza-virusstammen. In Hoofdstuk III werden de immunologische werkwijzen, tot dit doel toegepast, nader toegelicht.

Wij bepaalden ons bij het onderzoek naar de antigene structuur der in Groningen geïsoleerde virusstammen tot de virusneutraliseringsproef, die, met name in de hand der Engelsche onderzoekers, geschikt was gebleken om scherpe antigene verschillen aan het licht te brengen.

De specifieke influenza-virusstammen. — In den loop van 1940 voerden wij een uitvoerige analyse uit van den in 1939 te Groningen geïsoleerden stam B, waarvan de uitkomst reeds in het kort werd gepubliceerd (Mulder en Bijlmer, ³⁹). Van dit onderzoek, dat de inleiding vormt tot het virus-onderzoek in 1941, laten wij thans een uitvoeriger verslag volgen.

De stammen, waarmee wij den stam B vergeleken, waren WS (Londen 1933), Talmey (Chatham 1937), Gatenby (Windsor 1937) en Christie (Shorncliffe 1937), welke door de Engelsche onderzoekers (Wilson Smith en Andrewes ²⁹) als specifieke stammen waren gekenschetst.

Met den stam WS werd sedert 1937 in ons laboratorium gewerkt; in het begin van 1940 ontvingen wij van dr. Wilson Smith en dr. Andrewes de stammen Talmey, Gatenby en Christie. Wij lieten deze stammen eenige malen over muizen passeeren, om de virulentie voor deze proefdieren na te gaan. Volgens een begeleidende mededeeling van dr. Andrewes was Talmey „tamelijk virulent”, hoewel 1000 maal zwakker dan WS, terwijl Gatenby en Christie zoo weinig virulent waren, dat het filtraat slechts nu en dan bij muizen aansloeg. Wij bevonden alle stammen in ongefiltreerden toestand in staat om bij geregelde muizenpassages de contrôlemuizen binnen 6 dagen te doodén. De stam Talmey werd na een twaalfstal passages gefiltreerd en het filtraat op een drietal

muizen geënt. Hiervan stierf er slechts één binnen 6 dagen met volledig aangetaste longen; de beide andere vertoonden bij sectie op den zesden dag geen afwijkingen, die na korteren of langeren tijd tot den dood zouden leiden. Wij besloten hieruit, dat in onze handen deze stam te weinig virulent was, om gefiltreerd te kunnen worden gebruikt in de neutraliseeringsproef. Van filtrering van de andere stammen, die volgens de Engelsche onderzoekers minder virulent waren dan Talmey, werd afgezien.

Wij bereidden fretten-antisera tegen de 5 stammen, welke in de analyse werden opgenomen, door een vijftal fretten onderscheidenlijk nasaal te enten met 0,5 tot 1,0 cm³ van een 5 % muizenlong-suspensie van elken stam, van WS gefiltreerd en 10 maal verdund, van de overige stammen ongefiltreerd. Na 14 dagen werd van deze fretten serum gewonnen (zie Hoofdstuk II), hetgeen na inactiveren gedurende een half uur bij 56° C voor de proeven gebruikt werd. De inactivering heeft beteekenis als lichte desinfectie. Ook zijn volgens Engelsche en eigen ervaring niet geïnactiveerde sera van fretten soms zeer toxisch voor muizen. Het complement speelt in de v.n.p., voor zoover bekend, geen rol.

Kritiek op de kruisneutraliseeringsproef. — Kruisneutraliseeringsproeven behoeven een kritiek ten opzichte van de vraag, in hoeverre men met vergelijkbare grootheden werkt. Men heeft te doen met neutraliseeringen van virusstammen van zeer uiteenlopenden virulentietiter door sera van verschillend hoogen immuuntiter. Toch zal men moeten trachten in de proeven zoowel de homologe immuuntiters als de virulentie der gebruikte virussuspensies zoo min mogelijk uiteen te doen loopen. Nu is het practisch ondoenlijk van alle in een proef gebruikte stammen den virulentietiter gelijktijdig te meten. We moeten afgaan op eerder verrichte bepalingen en blijven afhankelijk van mogelijke schommelingen, die de stammen van passage tot passage vertoonen. Als gemiddelde virussterkte kozen wij, gelijk reeds gezegd, het 10 maal verdunde filtraat van den stam WS, hetgeen neerkomt op een 1000- tot 10.000-voudig verzwakte standaardsuspensie van dezen stam (zie Hoofdstuk II). Deze verdunning komt in virulentie ongeveer overeen met de andere door ons gebruikte en geïsoleerde stammen, die na lang centrifugeeren (bij laag toerental) ongefiltreerd werden gebruikt. Wij mogen aannemen, dat het groote verschil tusschen WS en de overige stammen door deze wijze van doen is opgeheven; de verschillen tusschen deze stammen onderling blijven bestaan. Moge het theoretisch al zeer goed

mogelijk zijn om ook deze verschillen door passende verdunningen te nivelleren, practisch is dit, bij de omslachtheid, welke aan deze proeven reeds eigen is, niet goed uitvoerbaar.

Onmogelijk is het ook de fout, die ontstaat door het gebruik van zwak neutraliseerende sera, te vermijden. Men moet trachten steeds sera in voorraad te hebben met een goeden titer, liefst met een volledige neutraliseerende werking in de verdunning 1/250 tegen het homologe virus; dit gelukt echter niet altijd. Het gebruik van een zwak serum, dat een zwakken titer ten opzichte van den eigen stam bezit, heeft tot gevolg, dat de kruisneutraliseering van dezen stam door een heteroloog serum relatief hoog lijkt. Als de hooge heterologe neutraliseering merkbaar lager blijft dan de op zichzelf zwakke homologe, dan is het verschil uiteraard slechts klein. In een dergelijk geval moet aan een op deze wijze verkregen klein titerverschil (de „titerverhouding” in de tabellen) groote beteekenis worden toegekend, daar het verschil in antigene structuur er zeer bepaald in wordt weerspiegeld.

Ook bij het gebruik van een ongewoon sterk virus wordt de neutraliseerende titer van het homologe serum gedrukt, zoodat voor heterologe sera dezelfde overweging geldt als in het geval van een zwak homologoog serum.

De vraag, in hoeverre de waarde van het influenza-virus als antigeen gemeten kan worden aan de virulentie, moeten wij in het midden laten. Van het complementbindend antigeen is bewezen, dat het niet identiek is met het virus als zoodanig (zie Hoofdstuk III); omtrent den aard van het antigeen, dat zich in de neutraliseeringsproef met de antilichamen van het serum verbindt, zijn nog geen nadere onderzoekingen verricht.

Kruisneutraliseeringsproeven met den specifieke stam WS. —

Allereerst voerden we van den stam WS een antigeen-analyse uit ten opzichte van de drie andere toegezonden specifieke stammen, teneinde ons van de specifieke verschillen te vergewissen en de zekerheid te verkrijgen, dat de door ons bereide sera betrouwbaar waren. Tabel 18 geeft den uitslag van de verrichte virusneutraliseeringsproeven weer. De virusstam WS werd gefiltreerd toegepast en tien maal verdund; de stammen Talmey (Tal), Gatenby (Gat) en Christie (Chr) werden ongefiltreerd in de oorspronkelijke 5 % muizenlongsuspensie gebruikt, welke gedragslijn ons door de zwakke virulentie dezer stammen in vergelijking met WS werd voorgeschreven.

Tabel 18. Kruisneutraliseeringsproeven van den stam WS (gefiltreerde 5 % muizenlongsuspensie 1 : 10) met de stammen Tal, Gat en Chr (ongefiltreerde 5 % muizenlongsuspensie).

| Antiserum serum tegen | Virus-stam | Serumverduunningen | | | | Contrôle-entingen | Titer-verhouding |
|-----------------------|---------------------------|--------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------|
| | | 1/10 | 1/50 | 1/250 | 1/1250 | | |
| WS (homoloog) | WS (filtraat 1 : 10) | | 0 0 0 | 0 0 0 | ++ + ± | D ++++ D ++++ D ++++ | 1 |
| Tal | | + 0 0 | ++ + + | D ++++ ++ ++ | D ++++ D ++++ ++ | | 1/25 |
| Gat | | 0 0 0 | + ± ± | +++ ++ + | D ++++ D ++++ +++ | | 1/25 |
| Chr | | | + 0 0 | ++ + + | D ++++ +++ ++ | | > 1/25 |
| Tal (homoloog) | Tal (ongefiltreerd 1 : 1) | | ± 0 0 | D ++ ++ 0 | D ++++ +++ ++ | D ++++ D ++++ +++ | 1 |
| WS | | + ± | D ++++ +++ ++ | D ++++ ++++ +++ | | | 1/25 |
| Gat (homoloog) | Gat (ongefiltreerd 1 : 1) | | * 0 0 | ± 0 0 | +++ ++ + | D ++++ D ++++ D ++++ | 1 |
| WS | | ++++ + + | D ++++ D ++++ D ++++ | D ++++ D ++++ D ++++ | | | 1/125 |
| Chr (homoloog) | Chr (ongefiltreerd 1 : 1) | | 0 0 0 | ++ + ± | +++ ++ ++ | D ++++ D ++++ ++++ | 1 |
| WS | | +++ ++ + | D +++ +++ 0 | D ++++ +++ +++ | +++ +++ ++ | | 1/125 |

Aflezing van de proeven.

Noch de sera Tal, Gat en Chr tegen den virusstam WS, noch het serum WS tegen de stammen Tal, Gat en Chr bereiken een neu-

traliseerenden titer, hooger dan $1/25$ van die der homologe sera. Hiermee is bevestigd, dat er slechts een zeer geringe verwantschap in antigene structuur bestaat tusschen WS en de andere specifieke stammen.

Antigene structuur van den stam B 1939. — In tabel 19 wordt de antigeen-analyse gegeven van den stam B 1939, in vergelijking met de genoemde vier specifieke stammen. De stam B was gedurende talrijke muizenpassages matig virulent gebleven voor deze proefdieren; het filtraat was weliswaar in staat muizen te doden doch niet met een zoodanige zekerheid, dat wij het in de v.n.p. met goed gevolg konden toepassen. De stam B werd dus evenals de stammen Tal, Gat en Chr ongefiltreerd gebruikt, de stam WS, zooals altijd gefiltreerd en 10 maal verdund. Ten einde mogelijke bacterieele verontreiniging tot een minimum te beperken, werden de ongefiltreerde muizenlongsuspensies een half uur bij 3000 toeren per minuut gecentrifugeerd.

Tabel 19. Kruisneutraliseeringsproeven tusschen den stam B (ongefiltreerd) en de stammen WS (filtraat 1 : 10), Tal, Gat, Chr (ongefiltreerd).

| Antiserum | Virus-stam | Serumverduunning | | | | Contrôle-entingen | Titer-verhouding | |
|----------------|---------------------------|------------------|---------|---------|---------|-------------------|------------------|------|
| | | 1/10 | 1/50 | 1/250 | 1/1250 | | | |
| B (homoloog) | B (ongefiltreerd 1 : 1) | 0 | * | + | +++ | | 1 | |
| | | 0 | 0 | 0 | ++ | | | |
| | | 0 | 0 | 0 | ++ | | | |
| WS | B (ongefiltreerd 1 : 1) | ± | + | D +++++ | D +++++ | | 1/25 | |
| | | ± | + | +++ | D +++++ | | | |
| | | 0 | ± | ++ | D +++++ | | | |
| B (homoloog) | B (ongefiltreerd 1 : 1) | | ± | 0 | ++ | D +++++ | 1 | |
| | | | 0 | 0 | ++ | | | |
| | | 0 | 0 | + | | | | |
| Tal | | | 0 | ± | D +++++ | | D +++++ | 1/25 |
| | | | 0 | 0 | D +++++ | | D +++++ | |
| Gat | | | 0 | + | D +++++ | | D +++++ | 1/25 |
| | | 0 | ± | D +++++ | D +++++ | | | |
| Chr | | 0 | 0 | D +++++ | D +++++ | 1/5 | | |
| | | ± | ± | + | + | | | |
| WS (homoloog) | WS (filtraat 1 : 10) | | 0 | 0 | + | | 1 | |
| | | | 0 | 0 | ± | | | |
| | | | 0 | 0 | ± | | | |
| B | B (ongefiltreerd 1 : 1) | 0 | + | * | D +++++ | | 1/25 | |
| | | 0 | + | +++ | D +++++ | | | |
| | | 0 | 0 | ++ | +++ | | | |
| Tal (homoloog) | Tal (ongefiltreerd 1 : 1) | | 0 | 0 | D +++++ | D +++++ | 1 | |
| | | | 0 | 0 | ++ | | | |
| B | | | 0 | + | * | | D +++++ | 1/5 |
| | | 0 | + | D +++++ | D +++++ | | | |
| Chr | | 0 | 0 | D +++++ | D +++++ | D +++++ | 1 | |
| | | 0 | 0 | D +++++ | D +++++ | | | |
| Gat (homoloog) | Gat (ongefiltreerd 1 : 1) | | 0 | 0 | D +++++ | D +++++ | 1/25 | |
| | | | 0 | 0 | D +++++ | | | |
| | | | 0 | 0 | D +++++ | | | |
| B | B (ongefiltreerd 1 : 1) | 0 | D +++++ | D +++++ | D +++++ | | 1/25 | |
| | | 0 | D +++++ | D +++++ | D +++++ | | | |
| | | 0 | ++ | D +++++ | +++ | | | |
| Chr (homoloog) | Chr (ongefiltreerd 1 : 1) | 0 | 0 | ± | ++ | D +++++ | 1 | |
| | | 0 | 0 | ± | + | | | |
| | | 0 | 0 | 0 | + | | | |
| B | B (ongefiltreerd 1 : 1) | 0 | 0 | + | ++ | D +++++ | 1 | |
| | | 0 | 0 | ± | ++ | | | |
| | | 0 | 0 | ± | ++ | | | |

Aflezing van de proef.

WS en Gat kunnen wij van de nadere verwantschap met B uitsluiten, aangezien noch de sera dezer stammen tegen B, noch het serum B tegen deze stammen WS en Gat een neutraliseerenden titer bereiken, hooger dan $1/25$ van den homologen titer.

Tusschen B en Tal bestaat een eenigszins grootere gelijkenis. Het serum B heeft een titerverhouding van $1/5$ tegenover Tal, doch het Tal-serum toont een geringer neutraliseerend vermogen tegenover B (titerverhouding $1/25$). Slechts in één richting wijst de proef dus op eenige verwantschap.

Tusschen B en Chr gaat de gelijkenis zoover, dat het B-serum het Chr-virus evengoed neutraliseert als het homologe Chr-serum zelf dit doet. (Titerverhouding 1.) Een herhaling van de proef in beide richtingen bevestigde deze uitkomsten. Wij mogen hieruit besluiten tot een belangrijken graad van verwantschap tusschen beide stammen. In Hoofdstuk I werd over deze antigene gelijkenis reeds gesproken in verband met in 1939 elders onderzochte stammen.

Vergelijking der virusstammen van 1941 onderling. — In het verslag der virusneutraliseeringsproeven met de nieuw geïsoleerde virusstammen vermeldde wij reeds, dat de frettersera S en D den WS-stam weliswaar neutraliseerden, doch niet tot een zoo hoogen titer, dat wij daaruit tot een nauwe antigene verwantschap met dezen Engelschen specifieke stam durfden besluiten (Hoofdstuk IV).

Alvorens de plaats van de nieuw geïsoleerde stammen ten opzichte van die uit vorige epidemieën nader op te helderen, leek het ons van belang eerst na te gaan, of de stammen van 1941 onderling verschillen in antigene structuur vertoonden, dan wel van serologisch standpunt een eenheid vormden. A priori was geen der beide alternatieven uit te sluiten, immers 3 der 4 Engelsche specifieke stammen werden tijdens dezelfde periode van 1937 afgezonderd.

Behalve over onze eigen Groningsche stammen S, D en Z, beschikten we over een te Leiden door Van den Hoven van Genderen in het Instituut voor Praeventieve Geneeskunde geïsoleerden influenza-virusstam, in ons schema met L aangeduid.

Wij gebruikten voor ons onderzoek frettersera, nieuw bereid, tegen de vier genoemde stammen. Sera, die wij reeds sinds eenigen tijd bezaten, werden uitgeschakeld. Sedert het winnen van sera tegen deze stammen tijdens de epidemie was geruime tijd verlopen en wij wilden in navolging van Wilson Smith en Andrewes²⁹,

voor de antigeen-analyse geen sera gebruiken, welke meer dan 3 maanden oud waren.

De bereiding der frettensera geschiedde als volgt. In vacuo bewaard muizenlongmateriaal der te onderzoeken stammen werd in suspensie gebracht met zoutwaterbouillon en met deze suspensies werden groepen van 4 muizen intranasaal geënt. Een aantal muizenpassages werd uitgevoerd, teneinde de stammen op hun maximale virulentie te brengen, welke geoordeeld werd bereikt te zijn, wanneer de contrôlemuizen regelmatig op den 4en of 5en dag stierven aan experimenteele influenza-pneumonie. Van de long-suspensie der passagemuizen van elken stam werd dan 0,5 tot 1,0 cm³ bij een fret onder aethernarcose in den neus gedruppeld. Voor den stam L gebruikten we een nieuw fret; dit reageerde met de typische verschijnselen van de experimenteele fretteninfluenza. Voor de stammen D, S en Z gebruikten wij fretten, die tijdens de epidemie reeds met deze virusstammen geënt waren (de met filtraat geënte contrôlefretten uit de figuren 16, 20 en 21), welke dieren, na met het merk van hun stam te zijn voorzien, in leven waren gelaten. Ten tijde van de herenting (5 maanden na de eerste infectie) bleek de immuniteit zoo ver geweken, dat de fretten opnieuw reageerden met typische influenza-verschijnselen, geenszins zwakker dan de eerste keer. Op den 12en tot 14en dag na de enting werd van deze dieren immuunserum gewonnen.

Met deze sera voerden wij achtereenvolgens neutraliseeringsproeven uit tegen de virusstammen D, S en Z (5 % muizenlong-suspensie, ongefiltreerd). Op deze wijze werd bij dit drietal stammen een volledige analyse uitgevoerd, terwijl die van L niet gekruist geschiedde en bijgevolg oriënteerend bleef (tabel 20). In de meest rechtsche kolom der tabel wordt de uit de proef af te lezen titer-verhouding ten opzichte van den homologen titer, welke 1 wordt gesteld, aangegeven. De voorlaatste kolom geeft de uitkomst van de contrôle-enting met den virusstam (5 % suspensie, ongefiltreerd) telkens bij een groep van 3 muizen weer.

Tabel 20. Kruisneutraliseringsproeven van de frettersera D, S, Z, (L) met de virusstammen D, S, Z (5 % suspensie, ongefiltreerd).

| Antiserum | Virus-stam | Serumverduunning | | | | Contrôle-enting | Titer-verhouding |
|-----------------|-----------------------------|------------------|------|---------|---------|---------------------------|------------------|
| | | 1/10 | 1/50 | 1/250 | 1/1250 | | |
| D (homoloog) | D (ongefiltreerd 1:1) | 0 | 0 | ++ | * | D +++++ D +++++ +++ | 1 |
| | | 0 | 0 | + | ++ | | |
| | | 0 | 0 | + | + | | |
| | | 0 | 0 | + | + | | |
| S | | 0 | 0 | ± | ++ | | 1 |
| | | 0 | 0 | 0 | + | | |
| | | 0 | 0 | 0 | + | | |
| Z | | 0 | 0 | + | ++ | | 1 |
| | | 0 | 0 | + | + | | |
| | | 0 | 0 | 0 | + | | |
| L | | | 0 | ± | + | | 1 |
| | | | 0 | 0 | + | | |
| | | | 0 | 0 | + | | |
| S (homoloog) | S (ongefiltreerd 1:1) | 0 | 0 | 0 | ++ | D +++++ D +++++ ++ | 1 |
| | | 0 | 0 | 0 | + | | |
| | | 0 | 0 | 0 | ± | | |
| | | 0 | 0 | 0 | ± | | |
| D | | 0 | 0 | + | D +++++ | | 1/5 |
| | | 0 | 0 | + | ++ | | |
| | | 0 | 0 | 0 | ++ | | |
| Z | | 0 | ± | + | D +++++ | | 1/5 |
| | | 0 | 0 | 0 | +++ | | |
| | | 0 | 0 | 0 | ++ | | |
| L | | 0 | 0 | + | ++ | | 1 |
| | | 0 | 0 | 0 | + | | |
| | | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| Z (homoloog) | Z (ongefiltreerd 1:1) | | 0 | ++ | D +++++ | D +++++ D +++++ +++ | 1 |
| | | | 0 | ++ | D +++++ | | |
| | | | 0 | + | +++ | | |
| D | | | 0 | D +++++ | D +++++ | | 1/5 |
| | | | 0 | +++ | ++++ | | |
| | | | 0 | ++ | ++++ | | |
| S | | | ± | + | ++ | | >1 |
| | | | 0 | + | ++ | | |
| | | | 0 | 0 | + | | |

Aflezing van de proeven.

Het eerste, dat in elk der drie proeven in het oog springt, is de betrekkelijke hoogte niet zeer uiteenlopende titer, waartoe de verschillende sera de onderzochte virusstammen neutraliseeren; een onderscheid tusschen heterologe en homologe sera treedt niet zeer duidelijk aan het licht.

De verschillen, welke zijn op te merken, lijken eerder het gevolg te zijn van een grootere sterkte van het serum S in het algemeen, dan van een specifieke eigenschap van dat serum. Immers S toont in elk der drie proeven niet alleen een bijzonder hoog neutraliseerend vermogen, maar de virusstammen D en Z worden door S zelfs sterker geneutraliseerd dan door de homologe sera. Dat dit verschijnsel niet veroorzaakt wordt door een te geringe virulentie dezer stammen, toonen de uitkomsten der contrôle-entingen.

Ook Wilson Smith en Andrewes²⁹ spreken bij hun anti-geen-analyse ervan, dat een bepaald fret een ongewoon potent serum kan leveren, hetgeen een factor is, die het aflezen van de proeven bemoeilijkt. Ongetwijfeld zou een zekerder uitslag te verkrijgen zijn, indien meer fretten van denzelfden stam werden geënt en aldus verschillende parallelproeven konden worden verricht. Volgens de genoemde auteurs geven dergelijke proeven meestal overeenstemmende uitkomsten, doch waar verschillen voorkomen, laten zij toe een gemiddelde te bepalen voor de opstelling van den uiteindelijke uitslag. Een dergelijk gemiddelde is betrouwbaarder dan de uitkomst bij een enkel fret; bij gebrek aan fretten konden wij echter niet tot deze uitvoerige werkwijze overgaan.

Verrichtten wij met de stammen D, S en Z tenminste één volledige kruisneutraliseeringsproef, met den Leidschen stam L bleef de analyse eenzijdig, daar muizengebrek ons niet toeliet ook dezen stam aan te houden. Het onderzoek van het serum L, hoewel onvolledig, wijst intusschen niet op een antigene structuur, welke belangrijk atwijkt van die der Groningsche stammen.

Samenvattend, meenen wij uit de verrichte proeven te mogen besluiten, dat de drie te Groningen in 1941 geïsoleerde influenza-virusstammen geen zoodanige verschillen in antigene structuur toonen, welke ons zouden noodzaken tot het aannemen van onderlinge specifieke verschillen. De 3 stammen schijnen integendeel een serologische eenheid te vormen. Ook mag besloten worden, dat de te Leiden geïsoleerde stam waarschijnlijk niet buiten deze eenheid staat.

Antigene structuur van stam Z 1941. — Het gebleken gemis aan serologisch onderscheid tusschen de Groningsche stammen van 1941 ontsloeg ons van de noodzakelijkheid, om elk dezer stammen met de van elders herkomstige specifieke influenza-stammen te vergelijken. Wij konden als proefobject een willekeurigen eruit nemen en kozen den stam Z, omdat deze een stabiele virulentie bezat.

Daar slechts weinig muizen tot onze beschikking stonden, moesten we een uiterst beknopt werkplan volgen. Wij bereidden frettersera tegen den stam Z zelf en tegen de vier specifieke stammen WS, Tal, Gat en Chr. In afwijking van onze gebruikelijke werkwijze entten wij fretten met suspensie, bereid met in vacuo bewaard materiaal der stammen (gedroogde muizenlongen), zonder deze eerst eenige keeren over muizen te doen passeeren. De reactie van de dieren was zeer teekenend voor experimenteele fretten-influenza bij de stammen Z, WS en Gat; de reactie bij Tal en Chr was minder sterk. Daar alleen de stammen Z en WS in het vervolg op muizen gebracht konden worden, werden slechts de frettersera Z en WS op antilichamen tegen den eigen stam gecontroleerd. Er moet dus in aanmerking worden genomen, dat aan de proeven met de antisera Tal, Gat en Chr slechts een betrekkelijke, een waarschijnlijke waarde mag worden toegekend.

De eerste proef bestond hierin, dat nagegaan werd of een der specifieke antisera een belangrijken neutraliseerenden titer zou vertoonen tegen den virusstam Z. Was dit het geval, dan mocht een nadere verwantschap van den betreffenden specifieke stam met Z worden aangenomen, welke nader zou worden getoetst door de kruisneutraliseeringsproef (antiserum Z tegen den specifieke virusstam). De specifieke stammen, welker antisera geen neutraliseerenden titer van belang tegen Z zouden toonen, konden verder buiten beschouwing worden gelaten.

Uitslag der proeven.

Tabel 21a geeft de besproken proef weer, welke geen enkele verwantschap van de vier specifieke stammen met Z aan het licht bracht. Alle sera toonen een minstens 25 maal lageren titer dan het homologe serum Z; alleen WS en Chr geven in de verdunning 1/10 een goed merkbare neutraliseering. Wij herhaalden de proef nog eens met de sera WS en Chr en namen wegens de eerder gebleken overeenkomst tusschen Chr en den Groningschen stam B 1939, ook dezen laatste erin op. Deze herhaling (tabel 21b) bracht geen nieuw gezichtspunt naar voren, tenzij wellicht een

Tabel 21 (a, b, c). Neutraliseeringsproeven met specifieke antisera tegen den virusstam Z 1941 (5 % muizenlongsuspensie). Kruisneutraliseeringsproef met den stam WS (filtraat 10^{-1}).

| Antiserum | Virus-stam | Serumverduunningen | | | | Contrôle-enting | Titer-verhouding |
|-----------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------|
| | | 1/10 | 1/50 | 1/250 | 1/1250 | | |
| a | Z (homoloog) | 0 0 0 | 0 0 0 | * + 0 | +++ ++ ++ | D ++++ D ++++ D ++++ | 1 |
| | WS | + + 0 | +++ ++ + | D ++++ D ++++ +++ | D ++++ D ++++ D ++++ | | 1/25 |
| | Tal (ongefiltreerd 1:1) | +++ +++ | D ++++ D ++++ | * D ++++ D ++++ | +++ +++ + | | 1/125 |
| | Gat | D ++++ ++ + | D ++++ D ++++ ± | D ++++ D ++++ ++++ | D ++++ ++++ 0 | | < 1/125 |
| | Chr | + + ± | D ++++ +++ 0 | +++ +++ ++ | D ++++ ++++ 0 | | 1/25 |
| b | Z (homoloog) | | 0 0 0 | NIET VERRICHT | | D ++++ D ++++ | 1 |
| | Chr | + + + | D ++++ D ++++ D ++++ | | | | 1/25 |
| | B | | ++ ++ + | | | | 1/5 |
| | WS | D ++++ D ++++ D + | D ++++ D ++++ D ++++ | | | | 1/25 |
| c | WS (homoloog) | | 0 0 0 | + + + | | D ++++ D ++++ | 1 |
| | Z (filtraat 1:10) | + + 0 | +++ +++ +++ | D ++++ +++ +++ | | +++ | 1/25 |

zekere gelijkenis tusschen Z en B, welke wij helaas niet verder konden bestudeeren. Een laatste proef (tabel 20c), waarin de antisera WS en Z werden getitreerd tegen den virusstam WS, bevestigde de geringe verwantschap van Z met WS. Deze proef mag vergeleken en aangevuld worden met de in Hoofdstuk IV voorkomende neutraliseeringsproeven met de frettersera D en S (tabel 7), waarin het WS-virus wel in zoodanige mate wordt geneutraliseerd, dat tot de aanwezigheid van influenza-antilichamen moet worden besloten, doch niet in een zoodanige hoogte, dat een nadere stamverwantschap mag worden aangenomen.

Ondanks de groote mate van onvolledigheid, waaraan ons onderzoek mank gaat, durven wij toch met waarschijnlijkheid te besluiten tot de afwezigheid van een nadere verwantschap van de Groningsche virusstammen van 1941 met de Engelsche specifieke stammen. Daar deze specifieke stammen zich als bijzondere eenheden onderscheiden temidden van een groot aantal intermediaire en zelfs onspecifieke stammen (Wilson Smith en Andrewes²⁹), hoeft deze uitkomst ons niet te verwonderen. De vraag mag gesteld worden of het raadzaam is, later het verrichte onderzoek op dezelfde wijze, maar meer gedetailleerd over te doen. Zeker zal het gewenscht zijn de Groningsche stammen nog te vergelijken met eventueel elders gevonden nieuwe stammen. Echter is te verwachten, dat het door Wilson Smith en Andrewes naar aanleiding van één enkel, zij het ook uitgebreid, onderzoek in 1938 opgestelde schema nog belangrijke veranderingen zal ondergaan.

Ten slotte wordt in een schema (tabel 22) het totaal der verrichte antigeen-analysesanschouwelijk voorgesteld.

Besluit. — Ten aanzien van de Groningsche stammen kan dus samenvattend vastgesteld worden, dat de stam B 1939 overeenkomt met stam Christie (Shorncliffe 1937) en dat de stammen D, S en Z onderling gelijk zijn en niet gelijk zijn aan den stam WS (Londen 1933) en waarschijnlijk niet ondergebracht kunnen worden in de andere Engelsche specifieke stammen, Talmey (Chatham 1937), Gatenby (Windsor 1937) en Christie.

Tabel 22. Schema der verrichte antigeen-analyses.

| Antiserum | Virusstam | | | | | | | | |
|-----------|-----------|------|------|-------|-------|-----|---|-------|---|
| | B | WS | Tal | Gat | Chr | S | D | Z | L |
| B | 1 | 1/25 | 1/5 | 1/25 | 1 | | | 1/5 | |
| WS | 1/25 | 1 | 1/25 | 1/125 | 1/125 | | | 1/25 | |
| Tal | 1/25 | 1/25 | 1 | | | | | 1/125 | |
| Gat | 1/25 | 1/25 | | 1 | | | | 1/125 | |
| Chr | 1/5 | 1/25 | | | 1 | | | 1/25 | |
| S | | | | | | 1 | 1 | 1 | |
| D | | | | | | 1/5 | 1 | 1/5 | |
| Z | | 1/25 | | | | 1/5 | 1 | 1 | |
| L | | | | | | 1 | 1 | | |

Verklaring.

De verwantschap van B, gemeten door den neutraliseerenden titer van B-serum tegen andere virusstammen, is af te lezen in de horizontale kolom naast B.

De verwantschap van B, gemeten door den neutraliseerenden titer van andere immuunsera tegen den virusstam B, is af te lezen in de verticale kolom onder B.

Zoo ook die der andere stammen. De heterologe neutraliseering is steeds uitgedrukt in fracties van de homologe, welke in alle gevallen gelijk 1 is gesteld.

HOOFDSTUK VI.

Immunotherapie en -prophylaxe.*)

Het verwekken van immuniteit bij fretten. — Reeds in de eerste publicatie, die Wilson Smith, Andrewes en Laidlaw deden over hun geslaagde poging om fretten te infecteeren met influenza-virus, werd vermeld, dat de fretten, die zich hersteld hadden van de ziekte, „zonder onderscheid immuun bevonden werden tegen een volgende infectie met denzelfden virusstam”. In de eerstvolgende jaren werd juist de hierop berustende kruisimmunoproef met fretten gebruikt, om in nieuwe gevallen de aanwezigheid van het influenza-virus aan te toonen.

Met het oog op de mogelijkheid van een vaccintherapie bij den mensch, had het vraagstuk van de immuniteit bij het fret van meet af aan de volle belangstelling.

In 1935 publiceerden Smith, Andrewes en Laidlaw⁹⁸ een nader onderzoek over dit onderwerp. Zij toonden aan, dat fretten gedurende 3 maanden na een doorgemaakte infectie volkomen onvatbaar zijn voor herinfectie, en dat gedurende de volgende maanden de vatbaarheid terugkeert. Na 6 tot 7½ maand is de immuniteit verdwenen, alhoewel antilichamen tegen het influenza-virus nog in de circulatie zijn aan te toonen. In dit stadium kunnen subcutane injecties van influenza-virus de immuniteit herstellen.

Dit laatste is zeer merkwaardig, aangezien bij normale fretten met subcutane injecties van influenza-virus geen volkomen immuniteit tegen intranasale injectie is te bereiken, evenmin met intraperitoneale. Wel treden er in dat geval antilichamen op en doen zich bij herinfectie slechts lichte ziekteverschijnselen voor. Ook wordt onvatbaarheid verkregen tegen aantastingen der longen, zelfs als rechtstreeks geënt wordt met een voor fretten zeer virulent pneumotroop virus.

Francis en Magill⁹⁹ bevestigden deze bevindingen; zij namen waar, dat herstelde fretten 3 tot 5 maanden immuun bleven en stelden vast, dat een gedeeltelijke onvatbaarheid daarna overbleef, die na 16 maanden en in één geval zelfs na twee jaar nog kon worden aangetoond. Belangrijk was de ontdekking, dat gedurende

*) Een volledige en overzichtelijke bespreking van de vaccinatieproeven tegen influenza-virus, bij dieren en menschen verricht, vindt men van de hand van J. van den Hoven van Genderen in het Maandschrift voor Kindergeneeskunde, Sept. 1941, Jaarg. X, no. 12.

dezen tijd de dieren weliswaar experimenteel, door enting in den neus, te infecteeren waren, doch dat zij volkomen bestand bleken tegen de meer natuurlijke wijze van besmetting door contact. Belangrijk was ook hun bevinding, dat intranasale enting met een minimale virusdosis bij versche fretten, gevolgd door een lichte infectie, een even hoogen antilichamentiter, gepaard met onvatbaarheid, verwekte als een zware infectie, en dat een subclinische infectie een krachtige immuniteit tengevolge had, al was deze korter van duur dan die, welke volgt op een zwaren aanval.

Door een nader kwantitatief onderzoek stelde Francis¹⁰⁰ vast, dat er een zekere evenredigheid bestaat tusschen de sterkte van de infectiedosis en den graad van immuniteit, welke er op volgt, en ook ten aanzien van den duur van de onvatbaarheid. Francis vestigt de aandacht op zijn bevinding, dat na herinfectie een versnelde vorming van antilichamen zich voordoet, welke uitloopt op een aanmerkelijk hooger titer dan na de eerste — en meer ernstige infectie — werd bereikt.

Bij subcutane vaccinatie werd evenzeer een betere, zij het ook een niet volkomene, onvatbaarheid bereikt, naarmate sterkere virusdoses werden ingespoten. Nooit echter bereikt de behandeling op deze wijze, ook niet met een 100- of meervoudige infectiedosis, de volkomen onvatbaarmaking, welke door intranasale enting met één enkele infectiedosis wordt bereikt.

Dat een subclinische infectie voldoende is om fretten een krachtige immuniteit te geven, werd bevestigd door Burnet¹⁰¹. Werkend met een op kippenembryovliezen gekweekten virusstam, gelukte het hem, hoewel zichtbare ziekteverschijnselen niet te voorschijn kwamen, bij fretten (en muizen) onvatbaarheid tegen herinfectie met een voor fretten virulenten stam op te wekken.

In verband met de moeilijkheid om fretten door de gebruikelijke wijzen van vaccinatie tegen influenza te beschermen, is de recente mededeeling van Horsfall en Lennette¹⁰² merkwaardig, dat een mengvaccin, bestaande uit de vira van influenza en hondenziekte (distemper), de fretten beter beschermt dan influenza-vaccin alleen. De schrijvers veronderstellen, dat het influenza-virus onder invloed van het andere virus zou zijn gemuteerd. Wij zouden liever willen denken aan de mogelijkheid, dat de immuniteit bevorderd wordt door een aspecifieke prikkeling van het afweersysteem.

In het algemeen kunnen wij zeggen, dat de totnogtoe bij fretten opgedane ondervinding weliswaar geen volstrekt vertrouwen wetigt in de waarde van actieve immuniseering tegen influenza, maar toch wel een hoopgevend uitzicht opent. Immers zooals Wilson

Smith in zijn verschillende publicaties over dit onderwerp suggereert, verkeerden de meeste mensen in een toestand, die een parallel vertoont met dien van een fret met een rest van immuniteit (basal immunity), overgehouden uit een vorige epidemie, waarin een klinische of subclinische (contact-) infectie werd doorgemaakt. Op grond van de overgebleven immuniteit zou, evenals bij het fret, een zeer goed en snel gevolg van een actieve herimmuniseering mogen worden verwacht.

Vaccinatieproeven met muizen. — Reeds in 1935 werd door Wilson Smith, Andrewes en Laidlaw⁹⁸ vastgesteld, dat met subcutane injecties van levend virus bij muizen een zekere immuniteit tegen herinfectie kon worden bereikt. Francis en Magill⁹⁹ verkregen een zeer goede immuniteit met een subcutane injectie, als die gevolgd werd door een intraperitoneale. Shope¹⁰³ vond het merkwaardige verschijnsel, dat muizen subcutaan te immuniseeren waren met varkens-influenza-virus, afkomstig van passagemuizen, doch niet met varkensvirus als dit over fretten gegaan was, of direct van het varken afkomstig was. Fretten waren op hun beurt langs dezen weg enkel te immuniseeren met varkensvirus, dat fretten reeds gepasseerd was, terwijl voor varkens de herkomst van het virus geen verschil maakte. De herkomst heeft bij fretten en muizen evenmin betekenis, indien de injecties intraperitoneaal in plaats van subcutaan worden toegediend, welke techniek dan ook in het vervolg der proefnemingen bij voorkeur werd toegepast.

In 1937 publiceerden Andrewes en Wilson Smith⁶⁸ nadere proeven over de actieve immuniseering van muizen. Zij pasten de vermelde werkwijze van Francis en Magill toe: de muizen kregen een inspuiting van 0,2 cm³ gefiltreerde virushoudende muizenlongsuspensie subcutaan en 14 dagen later een injectie van 0,5 cm³ intraperitoneaal. Weer 14 dagen na deze behandeling werden zij op onvatbaarheid onderzocht door een intranasale enting met 0,05 cm³ virusfiltraat. Gedurende den daaropvolgenden tijd werden de muizen geobserveerd: de gestorvenen werden onderzocht op longlaesies; de overlevenden na 14 dagen gedood en eveneens onderzocht.

De uitkomsten waren als volgt: de dubbele, subcutane en peritoneale, vaccinatie met 14 dagen tusschenruimte gaf een krachtadiger immuniteit dan een enkele subcutane; langer dan 6 weken bleef echter de onvatbaarheid in vollen omvang niet bestaan. Na 16 weken was er nauwelijks eenige immuniteit over, hetgeen evenmin

het geval was bij muizen, die een reële intranasale infectie hadden doorgemaakt en genezen waren. De natuurlijke immuniteit bleek evenmin als de experimenteele van blijvenden aard te zijn.

Een afzonderlijke studie werd door Andrewes en Wilson Smith¹⁰⁴ gewijd aan verschillende factoren, die de immunisatie kunnen beïnvloeden. Zij vonden voor het menscheninfluenza-virus, wat Shope reeds gevonden had voor het varkensvirus, namelijk dat muizen niet te immuniseeren waren met virus, afkomstig van fretten. Ook bij andere virussoorten (hondenziekte, lymphocyttaire choriomeningitis) was gebleken, dat vaccins, gewonnen van een vreemde diersoort, minder werkzaam waren dan een vaccin, afkomstig van gelijksoortige dieren. Laidlaw en Dunkin¹⁰⁵ schreven het verschijnsel hieraan toe, dat het afweerorganisme geblokkeerd werd door de veelheid van antigenen, die met een soortvreemd vaccin werden ingebracht.

Nu deed zich echter het feit voor, dat fretten zich intraperitoneaal wel lieten immuniseeren met muizenvirus. De auteurs besluiten, dat hier twee factoren in het spel zijn: virusbron en virulentietiter. Het muizenvirus was, gemeten door intranasale enting bij muizen, belangrijk virulenter dan het frettenvirus, en deze hogere virulentiegraad zou dan samengaan met een sterker immuniseerend vermogen, zoodat het nadeel van de soortvreemde mengsels zou worden overschaduwd.

Bij hun vaccinatieproeven met muizen hadden Andrewes en Wilson Smith⁶⁸ den indruk gekregen, dat met formaldehyde (1 : 5000 en ook 1 : 10.000) geïnactiveerd virus een even werkzaam vaccin was als niet geïnactiveerd. Bij hun nieuwe onderzoek bleek, dat de waarde van het antigeen in zekere mate door het formoliseeren werd verminderd. De gedachte is opgekomen, dat de sterkere werking van levend vaccin hieraan zou kunnen liggen, dat het zich in het organisme vermenigvuldigt. Andrewes en Smith⁶⁸ willen dit echter niet aannemen, omdat, gelijk zij reeds eerder aantoonde, de immuniteit evenredig is met de ingespoten hoeveelheid levend virus. De waarneming, gedaan door Rickard en Francis¹⁰⁶, van longlaesies bij muizen, die intraperitoneaal groote virusdoses hadden ontvangen, een waarneming, welke door Van den Hoven van Genderen¹⁰⁷ werd bevestigd, leek hun geen reden om aan te nemen, dat onder gewone omstandigheden een ingespoten vaccin zich vermeerderd. Het geringere antigene vermogen van geïnactiveerd vaccin schrijven zij eerder toe aan de aggregatie, welke de virusdeeltjes bij het formoliseeren of verhitten ondergaan.

Het vraagstuk van de kwantitatieve verhouding tusschen de immuniseerende virusdosis en de verwekte immuniteit is in bijzonderheden bestudeerd door Francis¹⁰⁰. Hij vaccineerde muizen met 3 wekelijksche intraperitoneale injecties van 0,5 cm³ muizenlongsuspensie in verschillende verdunningen en kwam tot de opmerkenswaardige slotsom, dat muizen intraperitoneaal gevaccineerd met onverdund virus, ook immuun werden tegen een intranasale infectie met onverdund virus, terwijl vaccinering met verdund virus onvatbaar maakte tegen infecties met dezelfde virusverdunning, en niet tegen een sterkere concentratie. Uit het aldus vastgestelde feit, dat er een drempel is voor den graad van immuniteit, verwekt door een bepaalde virussterkte, leidt Francis af, gelijk Andrewes en Wilson Smith⁶⁸ al op minder exacte gronden deden, dat het virus, dat bij de intraperitoneale inspuiting wordt ingebracht, zich niet in het organisme vermenigvuldigt.

Dat de graad van bereikte immuniteit bij muizen afhankelijk is van de hoeveelheid intraperitoneaal ingespoten virus, werd bevestigd door Hare¹⁰⁸, die tevens een optimale dosis vaststelde.

Het verschil in antigene waarde tusschen actief en geïnactiveerd virus is bij muizen kwantitatief nagegaan door Eaton¹⁰⁹. Hij noemt als minimale immuniseerende dosis van actief influenza-virus 250 M.L.D., en van geformaliseerd virus 8000 M.L.D., hetgeen een 32-voudige verzwakking beteekent in antigene waarde. Eaton waagt opnieuw de veronderstelling, dat het levende virus zich wellicht in het organisme vermenigvuldigt, steunend op zijn eigen waarneming, dat zeer groote, intraperitoneaal ingespoten virus-hoeveelheden in staat waren zelfs muizen te doden met uitgebreide aandoening van de longen. Rickard en Francis namen in dat geval, wel longlaesies doch nooit sterfgevallen waar, Van den Hoven van Genderen zag wel een enkelen doodelijken afloop. Anderzijds stelt Eaton op grond van kwantitatieve proeven vast, dat verschillende chemicaliën het antigene vermogen van het vaccin in verschillenden graad beschadigen, zoodat de opvatting, dat ook formaldehyde een deel van het antigeen buiten werking stelt, de meest voor de hand liggende verklaring lijkt.

Verskillende bronnen voor vaccinbereiding. — In de totnogtoe vermelde proeven werden vaccins gebruikt van verschillenden oorsprong. Andrewes en Wilson Smith werkten met suspensies van muizenlongen, al of niet gefiltreerd, Francis ten deele met muizenlongsuspensies, bij hoog toerental gecentrifugeerd, ten

deele met weefselkweekvirus (op „minced chick embryo”), bij laag toerental bevrijd van weefselcellen, Burnet met virus, gekweekt op de chorion-allantoismembraan van kippen-embryonen. Fairbrother en Martin⁸² vermelden, dat een „verhitte suspensie van elementair-lichaampjes” bij muizen zeer goed voldoet als vaccin. Zij verkrijgen dit praeparaat door de oorspronkelijke, bij laag toerental van orgaanpartikeltjes gezuiverde, muizenlongsuspensie bij hoog toerental (13.000 t. p. m.) te centrifugeeren en het sediment met zoutwater te wasschen. Deze bewerking wordt nog één keer herhaald. Het inactiveren gebeurt 30 minuten bij 57° C. Als desinfectans wordt 0,5 % phenol toegevoegd, nadat was aange-toond, dat phenol in deze concentratie geen eigen werking op het influenza-virus uitoefende. Een groot voordeel van het aldus bereide vaccin is de groote houdbaarheid. Na 6 maanden bleek het immuniseerend vermogen nauwelijks verminderd. De duur van de bij muizen opgewekte onvatbaarheid was niet langer dan die, welke reeds door Andrewes en Smith⁶⁸ was vastgesteld. De lange houdbaarheid van het vaccin is intusschen een belangrijke vooruitgang tegenover het geformoliseerde vaccin van beide laatstgenoemde auteurs. Deze geven op, dat het, bewaard bij — 2° C, slechts ten deele gedurende 2 maanden zijn werkzaamheid bewaarde.

Als bezwaar tegen muizenlongsuspensies als vaccin werd door Andrewes en Wilson Smith⁶⁸ al aangevoerd, dat andere virussoorten konden worden binnengesleept, vooral het virus van de choreo-meningitis van Traub, dat ook pathogeen voor den mensch is. Ook de aanwezigheid van muizenproteïnen in het vaccin werd als nadeel gevoeld. Het gelukte hun echter niet een meer gereinigd praeparaat te maken, dat nog belangrijke werkzaamheid vertoonde.

De elementair-lichaampjessuspensie van Fairbrother en Hoyle beteekent een belangrijke vooruitgang, doch zij kan enkel bereid worden in laboratoria, welke in het bezit zijn van een ultracentrifuge.

Dit bezwaar kleeft niet aan het op eivliezen gekweekte virus volgens Burnet¹⁰¹, dat reeds in kleine hoeveelheden toegepast bij muizen en fretten, krachtige immuniteit verwekt en bovendien het voordeel heeft, dat het voor deze dieren niet pathogeen meer is. Evenals het weefselkweekvirus volgens Magill en Francis¹¹¹ levert het een bacterievrij vaccin, dat met minder waarschijnlijkheid dan muizenlongsuspensies andere pathogene virussoorten zal bevatten. Tegenover de elementair-lichamensuspensie hebben beide het nadeel, dat vreemde weefselproteïnen, afkomstig van de mui-

zenlong dan wel van het kippenembryo, mede in suspensie gaan, zoodat aangenomen mag worden, dat door aspecifieke antigenen beslag kan worden gelegd op een deel van het afweermecanisme. Deze beschouwing blijft intusschen volkomen theoretisch, daar een aspecifieke prikkeling van dit mechanisme misschien de productie van influenza-antilichamen zou kunnen verhoogen. Zoolang wij den waren aard van de hierbij betrokken processen niet kennen, moet de practijk uitmaken, welk vaccin het meest aanbevelenswaardig is.

Specificiteit van het influenza-virus als antigeen. — In Hoofdstuk I werden de kruisimmuniseeringsproeven vermeld, die Francis en Magill met muizen verrichtten, teneinde den invloed vast te stellen van stamverschillen op de bereikte immuniteit. Zij stelden de volgende feiten vast.

1e. Vaccineering van muizen met een bepaalden virusstam geeft volkomen immuniteit tegen dezen stam, terwijl tegen andere stammen onvolkomen immuniteit — in verschillenden graad — optreedt.

2e. Herhaalde en voortgezette immuniseering verwekt immuniteit ook tegen heterologe virusstammen.

3e. Als gevolg van een doorgemaakte infectie treedt een bredere kruisimmuniteit op als door vaccinatie.

Tot gelijke bevindingen kwam Burnet¹¹², bij vaccinatie van muizen met eivlies-virus.

Wilson Smith en Andrewes²⁹ bestudeerden de kruisimmuniteit bij fretten. Bij reconvalescence fretten trad zeer krachtige (hoewel minder langdurige) onvatbaarheid op tegen heterologe virusstammen, terwijl vaccinatieproeven erop wezen, dat sterker dan bij muizen, bij fretten een belangrijke mate van heterologe immuniteit wordt verkregen. (Zie Hoofdstuk I.) Wel verdween deze immuniteit sneller dan de homologe.

De onderzoekers hebben zich afgevraagd, op welke wijze het bezwaar der stamspecificiteit bij het vaccineeren zou kunnen worden ondervangen. Herhaling der behandeling is één middel. Een ander zou zijn het gebruik van een vaccin, bestaande uit een mengsel van verschillende virusstammen. Wilson Smith wijst op het gevaar, dat op deze wijze het meest werkzame antigeen zou worden verdund. Met het oog op de gebleken evenredigheid tusschen virussterkte en immuniteit neigt men er toe om in vaccinatieproeven aan een stam van buitengewone virulentie (WS) den voorkeur te geven, liefst gemengd met een polyvalenten, zoo viru-

lent mogelijken stam, waarvoor de Engelsche onderzoekers den stam PR 8 van Francis hebben gekozen.

Vaccinatieproeven bij menschen. — De ervaringen, opgedaan bij fretten en muizen, deden reeds de moeilijkheden verwachten, waarop het vaccineeren van menschen zou stuiten. Bij den korten duur der immuniteit en de stamspecificiteit van het virus komt nog de omstandigheid, dat influenza-epidemieën plotseling optreden en kort duren, zoodat de kans groot is, dat men met de vaccinatie te laat komt, terwijl de vaccineering een eenigszins langen tijd van te voren van geringe waarde belooft te zijn. De totnutoe gedane proeven laten nog geen uiteindelijk oordeel toe.

Francis en Magill¹¹³ vaccineerden 23 vrijwilligers met 4 subcutane inspuitingen van levend weefselcultuurvirus, met dien verstande, dat de eerste 3 malen met tusschenruimten van 1 week 0,5, 1,0 en 1,0 cm³ werden ingespoten en 2 of 3 weken later 2,0 cm³. Bij alle proefpersonen kon in den loop der vaccinatie een sterke stijging in antilichamentiter worden aangetoond, welke echter na verloop van 5 maanden weer neiging tot daling vertoonde. Daar echter in het tijdsverloop, waarin de proef genomen werd, geen influenza-epidemie optrad, kon niet worden nagegaan, in hoeverre de hooge antilichamentiter samenging met een feitelijke onvatbaarheid.

Chenoweth, Waltz, Stokes en Gladen¹¹⁴ hadden het geluk een proef op groote schaal te kunnen nemen op het juiste oogenblik, namelijk kort voor een epidemie. Zij vaccineerden 110 personen met menscheninfluenza-virus en 138 met varkensinfluenza-virus. Zij beschikten over een contrôle-groep van 550 personen. Het vaccin bestond uit een Berkefeld V-filtraat van muizenlong-suspensie. Het vaccineeren geschiedde met 3 wekelijksche doses van 0,5, 1,0 en 1,0 cm³ onderhuids. Bij het intreden van de epidemie werd van de met menscheninfluenza-virus behandelde groep 3,6 % met duidelijke ziekteverschijnselen als patiënt opgenomen, tegen 13,7 % en 12,5 % van de beide andere groepen. Een duidelijke aanwijzing ten voordeele van de vaccineering met menscheninfluenza-virus ligt daarin zeker opgesloten; het was, naar Dochez in de vergadering, waarin het onderzoek het eerst werd medegedeeld, opmerkte, het eerste positieve resultaat, bereikt bij menschen met een virus van een infectie der bovenste luchtwegen.

Een meer gewaagde wijze van immuniseeren werd toegepast door Smorodintseff¹¹⁵, die 72 vrijwilligers grootè hoeveelheden levend influenza-virus in fijn verdeelden toestand liet inademen.

Van hen kreeg 20 % lichte influenza-verschijnselen ; bij hen werd ook een duidelijke stijging in antilichamentiter waargenomen. Bij de overige proefpersonen, voor wie het fretten- en muizenvirus niet pathogeen bleek, was eveneens een stijging op te merken. Of er onvatbaarheid was ontstaan tegen epidemisch optredende influenza, kon niet worden vastgesteld.

Chalkina ¹¹⁶ herhaalde deze proef en vond tevens, dat subcutane injectie van muizen- en frettenhersenenemulsie (4 cm³) een stijging in antilichamentiter kan bewerken.

Burnet ¹¹⁷ poogde vrijwilligers intranasaal te vaccineeren met eivliesvirus, doch kon langs dezen weg zelfs geen toeneming van antilichamen verkrijgen. Francis ¹¹⁸ entte 11 personen intranasaal met weefselkweekvirus en kreeg slechts bij één vermeerdering van antilichamen.

Een proef op het juiste moment werd in Januari 1937 genomen door Taylor en Dreguss ⁶⁹. Zij vaccineerden een groep van 306 personen met geformoliseerd (1 : 5000) gradocollfiltraat van muizenlongsuspensie. Bij de epidemie, welke volgde, werd van deze groep 4,6 % ziek, terwijl van een iets grootere contrôlegroep 6 % influenza kreeg. De auteurs trekken zelf het besluit, dat het verschil niet opvallend is. Zij isoleerden uit deze epidemie 5 verschillende virusstammen en zoeken het geringe gevolg der vaccinatie te verklaren door het verschil in antigene structuur dezer stammen met den WS-stam, dien zij voor het vaccin gebruikten.

De Engelsche onderzoekers, die zich van het begin af met vaccinatieproeven bezighielden, kwamen, voorzoover de berichten ons hebben bereikt, nog niet tot een geslaagde poging. Nadat Andrewes en Wilson Smith ⁶⁸ in een voorloopige proef hadden aangetoond, dat met subcutane injecties van geformoliseerde muizenlongsuspensie een stijging in antilichamentiter was te bereiken, vaccineerden zij in den winter van 1936—1937 groote groepen vrijwilligers ⁷, ³⁰. De epidemie viel echter te vroeg in, enkele dagen na de vaccinatie ; bovendien bleef het ziektecijfer onder de contrôle-groepen te laag.

Meer bijtijds geschiedde de vaccinatie door Stuart-Harris, Wilson Smith en Andrewes in den winter van 1938—1939 ³⁷; de geringe hevigheid van de epidemie maakte echter ook toen de uitkomst onduidelijk.

Een recente proef wordt gemeld door Dalldorf en Whitney ⁵⁶, die in December 1940 te New-York 415 personen op een personeel van 826 menschen vaccineerden met een vaccin, bereid met een kippenembryonenkweek van influenza-virus. Zij konden bij de

gevaccineerde groep een stijging in influenza-antilichamen vaststellen; met een bescherming tegen de in Januari 1941 optredende influenza bleek deze echter niet gepaard te gaan. Wel namen zij kenteekenen waar, dat het verloop der infectie gunstig werd beïnvloed.

Serumbehandeling — Een poging om influenza-patiënten met serum te behandelen dateert reeds uit 1919. McGuire en Redden¹¹⁹ spoten bij lijders aan influenza-pneumonie groote hoeveelheden reconvalescentenserum in. Dit werd gewonnen door een herstellenden patiënt tweemaal 500 cm³ bloed af te nemen met twee dagen tusschenruimte. Het serum werd vermengd met 1,5 % trikresol, in ampullen van 120 cm³ ingesloten en in deze hoeveelheden intraveneus ingespoten met tusschenpoozen van 8 tot 16 uur, in totaal 300 tot 600 cm³ per persoon. Het resultaat wordt als volkomen bevredigend opgegeven; bij de gewone behandeling van de influenza-pneumonieën beliep de sterfte 28 %, bij tijdige behandeling met serum 0 %. De beterschap trad onmiddellijk in.

De behandeling werd toegepast in het marinehospitaal te Chelsea; het is de vraag, of deze werkwijze zou zijn toe te passen in een andere omgeving, want teneinde een voldoende hoeveelheid serum te verkrijgen, moest van 500 donores elk 1000 cm³ bloed worden afgenomen.

De proefneming van McGuire en Redden, door Béclère¹²⁰ in de latere jaren opnieuw onder de aandacht gebracht, geschiedde in het tijdvak, dat het influenza-virus nog niet was ontdekt en dat een serologische contrôle op de aanwezigheid van het virus nog niet bestond, dus het bewijs, dat een echte influenza in het spel was, nog niet geleverd kon worden. Wel was dit het geval tijdens de proef van Hare¹²¹, die dezelfde methode toepaste bij twee gevallen van influenza-pneumonie. Het serum werd gewonnen bij reconvalescente patiënten van ongecompliceerde influenza. In beide gevallen werd na de seruminjectie een snel intredende beterschap vastgesteld. De toegediende hoeveelheden waren telkens 10 cm³, bij den eersten patiënt tweemaal toegepast met de tusschenruimte van 4 uur, bij den tweeden tweemaal met de tusschenruimte van 2 dagen. Van de donores werd 100 cm³ bloed afgenomen. Hoewel de proef erop zou kunnen wijzen, dat de door McGuire en Redden ingespoten hoeveelheden onnoodig groot zijn, was het aantal patiënten te klein om een zekere conclusie toe te laten.

Hare⁶⁰ bestudeerde ook het gevolg van passieve immunisering bij muizen. Hij behandelde de proefdieren met een enkele intraperi-

toneale inspuiting van 1 cm³ frettenimmuunserum en nam een beschermende werking waar tegen lichte virusdoses, welke kort na de inspuiting intranasaal werden toegediend (bijna volkomen bescherming tegen 10 M.L.D.). Ook intraperitoneale inspuiting van immuunserum, 24 uur na de inspuiting met virus had een merkbaren invloed in gunstigen zin op het verloop van de infectie. Hare legt er echter den nadruk op, dat tegenover een infectiedosis van meer dan 10 M.L.D. weinig van deze serumbehandeling kan worden verwacht.

Een andere weg is ingeslagen door Smorodintseff¹²². Door hem en zijn medewerkers werd, tijdens de influenza-epidemie van 1939 te Moskou, een proef ondernomen, die in breedte van opzet te vergelijken was met die van McGuire en Redden. Hun serumbehandeling bestond in het doen inademen van fijn verstoven anti-influenza-serum, gewonnen van paarden, stieren en varkens. De seruminalatie werd therapeutisch toegepast bij 260 gevallen. In deze groep kwam geen enkele influenza-pneumonie voor; in de niet met serum behandelde contrôlegroep van 397 personen traden 43 gevallen van influenza-pneumonie op.

Voor een groote prophylactische proef met seruminalatie werd het personeel van een warenhuis in twee groepen verdeeld. Van de behandelde personen kregen er 8 per 1000 influenza, van de contrôlegroep 82 per 1000. De seruminalatie werd 2 keer toegepast, met 14 dagen tusschenruimte. De hoeveelheid per persoon per keer ingeademd serum was slechts enkele cm³.

In een uitvoerige studie, gewijd aan het mechanisme van de verkregen immuniteit tegen influenza, wijzen Smorodintseff en Shiskina⁶³ er op, dat de hooge prophylactische en therapeutische werking van direct in de ademwegen toegediend immuunserum verklaard moet worden door de omstandigheid, dat de antilichamen onmiddellijk in aanraking worden gebracht met het epitheel, waarin het influenza-virus zich vermenigvuldigt. Kleine hoeveelheden, langs dezen weg toegediend, serum hebben bij muizen een grooter effect op de experimenteele infectie dan groote hoeveelheden serum, die subcutaan of intraveneus worden ingespoten.

De bereiding van immuunserum op groote schaal is van verschillende zijden ter hand genomen. Dreguss en Hoffmann¹²³ hyperimmuniseerden varkens met 4 verschillende influenza-stammen in den vorm van muizenlongsuspensie langs intranasalen, intratrachealen en intraperitonealen weg en verkregen een polyvalent serum van hoogen titer. Dujarric de la Rivière en Chev ¹²⁴ wonnen van paard en rund serum door inspuiting van toenemende hoeveelheden fretten- en muizenlongsuspensie. Davoli¹²⁵ ver-

kreeg polyvalent schapenserum van hoogen titer. Proefnemingen met deze sera bij patiënten zijn ons tot nu toe niet bekend geworden.*)

Het mechanisme der immuniteit bij influenza. — Tot een zoo juist mogelijke beoordeeling van het wezen der immunotherapie en -prophylaxe, kan de reeds genoemde studie bijdragen van Smorodintseff en Shiskina ⁶³ over het mechanisme van de verkregen immuniteit tegen influenza.

Reeds eerder hadden Smorodintseff en Ostrovskaya ¹²⁶ de verspreiding van het influenza-virus in het organisme na enting bij muizen nagegaan. Door de gevoelige methode van herhaalde muizenpassages toonden zij, behalve in de longen, de aanwezigheid van het virus aan in de lever, de milt, het bloed, de gal en de urine. Dit verandert niets aan het pneumotrope karakter van het virus. Immers, dit vermenigvuldigt zich alleen in de longen, hetgeen kwantitatief werd vastgesteld door op gezette tijden het virusgehalte van het longweefsel te titreeren, door het in een reeks van verdunningen te enten bij muizen. Het virusgehalte in bloed en urine toonde daarentegen geen toeneming, welke op vermenigvuldiging zou wijzen. Op dezelfde wijze werd door Smorodintseff en Shiskina bij actief geïmmuniseerde muizen de verdwijning van het door enting ingebrachte virus uit de long nagegaan. Binnen 24 uur bleek de neutralisering van het virus volkomen.

Stelselmatig werd vervolgens onderzocht, op welke wijze deze neutralisering geschiedde.

In de eerste plaats werd de rol nagegaan, die de in het bloed circuleerende antilichamen vervulden. Daartoe werd een vergelijking getrokken tusschen groepen van actief en passief geïmmuniseerde muizen. Bij beide groepen werd naar het verband gezocht tusschen de sterkte der bereikte immuniteit en de hoogte van den antilichamentiter in het bloed.

Het bleek nu dat, bij op verschillende wijzen actief geïmmuniseerde muizen (subcutaan met dood en levend virus, intranasaal mét levend) steeds evenredigheid bestond tusschen de hoogte van antilichamentiter in het muizenbloed en de bereikte onvatbaarheid tegen intranasale infectie met een aantal M.L.D. Bij de passief geïmmuniseerde muizen (intraveneus met verschillende verdunningen van immuunserum) bleek deze evenredigheid te ontbreken. Een hooge antilichamentiter in het bloed als gevolg van passieve immunisering ging niet samen met een hoogen graad van onvatbaarheid

*) In „Nepegéségügy” 1942, 13 deelt Dreguss mede, dat hij in prophylactische proeven bij menschen bemoedigende uitkomsten verkreeg.

tegen intranasale infectie. Ook als de antilichamentiter even hoog was als die bij de actief geïmmuniseerde muizen, was de verkregen onvatbaarheid veel geringer.

Nu kon de verklaring van dit verschil gezocht worden in de mogelijkheid, dat het passief ingebrachte serum snel uit de circulatie geëlimineerd wordt, terwijl bij actief geïmmuniseerde muizen de antilichamen steeds opnieuw worden aangemaakt. Door tweemaal daagsche seruminjecties werd gedurende 7 dagen bij een groep muizen de antilichamentiter op gelijk hoog peil gehouden, doch ook bij deze groep bleef de bereikte onvatbaarheid ver beneden die van de contrôlegroep, die actief was geïmmuniseerd.

Smorodintseff en Shiskina trekken hieruit de conclusie, dat niet uitsluitend de hoeveelheid antilichamen in het bloed de onvatbaarheid bepaalt tegen een intranasale infectie met virus.

Brengt men daarentegen virus door intraveneuse injectie onmiddellijk in den bloedstroom, dan wordt het even snel geïnactiveerd bij passief als bij actief geïmmuniseerde muizen. De verklaring van dit onderscheid moet volgens de auteurs deze zijn: het virus vermenigvuldigt zich in het epitheel, dus moeten de antilichamen daar ter plaatse hun virusneutraliseerende werking uitoefenen, wil de infectie onderdrukt worden. Nu wordt aangenomen, dat bij actieve immunisatie de antilichamen gevormd worden door de cellen van het reticulo-endotheliale stelsel (R.E.S.) en aangezien deze cellen in groot aantal gevonden worden in de longen, is te verwachten, dat een groote antilichamen-aanmaak in het longweefsel plaats vindt. Bij passief geïmmuniseerde dieren moet, blijkens het gebrek aan parallelisme tusschen antilichamen en onvatbaarheid, de aanvoer van virusneutraliseerende antilichamen naar het longepitheel onvoldoende zijn.

Dit laatste wordt des te waarschijnlijker gemaakt door de vergelijking van muizen, bij wie het immuunserum in de bloedbaan werd gespoten (subcutaan of intraveneus) met die, bij wie het serum (in verstoven toestand, dan wel als druppels) direct in de luchtwegen werd gebracht. Bij de laatste muizen werd een belangrijk hogere graad van onvatbaarheid bereikt dan bij de eerste. Dit is des te treffender, daar bij hen in het geheel geen antilichamen in het bloed waren aan te toonen. Het zijn hier dus de antilichamen, die van buiten af in aanraking worden gebracht met het longepitheel, welke het virus uitschakelen.

Het spreekt vanzelf, dat met dit onderzoek, hoe logisch ook van opzet en origineel van uitvoering, het vraagstuk der verkregen immuniteit niet in alle punten is opgelost.

Lépine¹²⁷ verdedigt de opvatting, dat bij virusziekten niet de antichamen de onvatbaarheid bepalen, doch dat zij er een begeleidend verschijnsel van zijn. De immuniteit zelf zou uitgaan van het weefsel, dat met virus in aanraking komt. Als bewijs voor deze stelling haalt hij voorbeelden aan (bij rabies; herpes, paardenen-cephalomyelitis, poliomyelitis, pokken) van het optreden van locale immuniteit vóór er antilichamen in het bloed verschenen zijn. Onwillekeurig denken wij hier aan Straub's opvatting (Hoofdst. II), dat het optreden van immuniteit na infectie samengaat met het ontstaan van bepaalde histologische veranderingen in het bronchusepitheel.

Smorodintseff voert tegen de opvatting, dat het longepitheel de plaats van herkomst zou zijn van de immuunlichamen, aan, dat in zijn proeven gedood virus, subcutaan ingespoten, een even goede immuniteit verwekt als levend virus, terwijl toch vast staat, dat het doode virus het longepitheel niet kan aangrijpen. Hij zoekt, zooals wij reeds zeiden, de bron der antilichamen in het longinterstitium, dat tot het R.E.S. gerekend mag worden. Wij vragen ons af, of dit in overeenstemming te brengen is met een volgend onderzoek van Smorodintseff en Shiskina¹²⁸. Nadat zij hadden aangetoond, dat orgaancellen (lever, milt) van geïmmuniseerde muizen, noch leucocyten van geïmmuniseerde muizen en paarden in staat zijn het influenza-virus in vitro aan te tasten en dat de activiteit der phagocyteerende cellen steeds te danken is aan de aanwezigheid van antilichamen in het bloedserum, blokkeerden zij bij muizen door splenectomie en injecties van saccharas ferricus en trypaanblauw het R.E.S. en stelden vast, dat bij aldus behandelde dieren vaccinatie door subcutane inspuiting van geformoliseerd influenza-virus evengoed slaagt als bij normale. De auteurs trekken uit deze proeven de conclusie, dat het phagocytair apparaat geen essentiële rol speelt bij de immuniteit tegen influenza, „welke rol zeker toekomt aan de virusdoodende antilichamen”. De vraag naar de herkomst van de aanwezige antilichamen laten zij hier in het midden; dat zij gevormd worden, tegelijk met het optreden van onvatbaarheid tegen een intranasale infectie met influenza-virus, wordt echter uitdrukkelijk vermeld. Men is geneigd de vraag te stellen: was het R.E.S. wel geheel geblokkeerd? Bij de zeer groote uitgebreidheid van het stelsel kan aan deze voorwaarde wel heel moeilijk voldaan worden. Moesten wij aannemen, dat in de laatst beschreven proef het R.E.S. inderdaad buiten werking was gesteld, dan zou de aandacht toch weer vallen op het longepitheel als zetel der immunologische reactie. Wij zijn hier op een terrein, dat nog grondig onderzoek eischt.

Locale immuniteit. — Raakten wij in de voorgaande beschouwingen het vraagstuk der locale immuniteit, het voorkomen ervan is door Francis en Stuart Harris¹²⁹ met zekerheid vastgesteld bij hun onderzoek naar de histologie van het neusepitheel van met influenza-virus geënte fretten. Zij vonden, dat na een specifieke beschadiging van het respiratorische epitheel door het virus er in de eerste ziektedagen regeneratie optreedt. Tusschen den 6en en 8en dag gaat het epitheel een overgangsvorm vertoonen. Het gevormde abnormale weefsel is resistent tegen het virus en tevens tegen beschadiging door zinksulfaat, waarvoor het normale neusepitheel uiterst gevoelig is. Na 21 dagen is er weer een normaal respiratorisch epitheel aanwezig, dat opnieuw gevoelig is voor zinksulfaat, terwijl de onvatbaarheid voor het influenza-virus blijft. In verband met deze feiten nemen de auteurs aan, dat er in den eersten tijd der reconvalescentie een onvatbaarheid bestaat, welke niet samenhangt met de immunologische eigenschappen van het bloed.

In latere maanden is er een zoodanig parallelisme tusschen antilichamentiter en onvatbaarheid, dat er geen beteekenis aan een locale immuniteit behoeft te worden toegekend, waarvoor in dat stadium ook geen histologische aanwijzing meer bestaat.

Natuurlijke immuniteit. — Op zoek naar de verklaring van het feit, dat bij bepaalde personen onvatbaarheid tegen influenza bestaat, terwijl er bij hen geen antilichamen tegen het virus zijn aan te toonen, heeft Francis¹³⁰ aandacht gewijd aan het neussecreet. Hij ontdekte, dat dit bij ongeveer de helft van de door hem onderzochte gevallen een sterk virusneutraliseerend vermogen had, hetwelk zich liet meten door de neutraliseeringsproef. Burnet, Lush en Jackson¹³¹ ontdekten hetzelfde verschijnsel; zij zonderden uit de neusafscheiding een filtreerbaar agens af, dat zij virus inactivating agent (V.I.A.) noemden. Het bleek niet enkel werkzaam tegen alle stammen van influenza-virus, maar ook tegen de vira van louping ill, herpes en Rous sarcoom, merkwaardigerwijs dezelfde vira, welke volgens Wilson Smith gevoelig zijn voor natriumdesoxycholaat. V.I.A. is onwerkzaam bij 0° C. en wordt vernietigd bij 100° C.; het is onderscheiden van lysozyme, dat onwerkzaam is. Tranen en speeksel hebben geen neutraliseerend vermogen tegen influenza.

Eigen Vaccinatieproeven. — De proeven, die wij verrichtten, hadden niet de oplossing van theoretische vragen ten doel, doch

beoogden slechts, door middel van de dierproef, de prophylactische werking na te gaan der door ons bereide vaccins.

De vaccins bestonden uit bacterievrij gefiltreerde suspensies van longen, afkomstig van muizen, die enkele dagen te voren met influenza-virus van den stam WS waren geïnfecteerd. De virulentietiter werd bepaald op 200.000 tot 2.000.000 M.I.D. per cm³. Door intracerebrale enting bij muizen werd de afwezigheid vastgesteld van de vira van lymphocyttaire choriomeningitis¹³² en van Theilers encephalomyelitis¹³³.

Als desinfectans werd toegevoegd formaldehyde 1 : 3000 en door enting op muizen werd de inactivering van het virus vastgesteld.

De antigene werking werd nagegaan bij een groep muizen door per muis één enkele intraperitoneale inspuiting toe te dienen van 0,5 cm³ vaccin. Na 10 dagen werden vijftallen der muizen intranasaal geënt met afnemende concentraties van influenza-virus. Zes dagen later werden de overlevende muizen geseceerd; de uitkomst werd vergeleken met die bij contrôle-groepen. Een voorbeeld wordt gegeven in Tabel 23.

Tabel 23. Vaccinatie van muizen met influenza-virus (muizenlong-suspensie).

| Infectie : Intranasaal | 0.05 cm ³ WS virusfiltraat | | | |
|--|---------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 1 | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ |
| 0.5 cm ³ WS-vaccin intraperitoneaal (10 dagen voor de intranasale enting) | D +++++ | +++ | D +++++ | ± |
| | D +++++ | ++ | + | 0 |
| | +++ | + | + | 0 |
| | ++ | ± | 0 | 0 |
| | ++ | ± | 0 | 0 |
| | | | | |
| Contrôle (niet gevaccineerd) | D +++++ | D +++++ | D +++++ | +++ |
| | D +++++ | D +++++ | D +++++ | +++ |
| | D +++++ | D +++++ | D +++++ | +++ |
| | | D +++++ | D +++++ | ++ |
| | | D +++++ | D ++++ | ++ |

Een duidelijke onvatbaarheid blijkt vooral te bestaan tegen de hogere verdunningen van het virus; zij is practisch volkomen bij de virusverdunning 10⁻³, overeenkomend met 2000 M.I.D. (De verdunning 10⁻⁵ bevatte volgens een gedane bepaling 20 minimale infectiedoses per cm³). Bij de hogere concentraties treedt bescherming tegen de letale virusdosis aan het licht.

Om na te gaan, welk conserveermiddel het minst schadelijk voor de vaccins was, werden verschillende porties bereid met toevoeging van trikresol 3 ‰, nipargin 1 ‰, merthiolaat 1 ‰ en

chloreton 3 ‰ (Tabel 24). Een proef hiermede genomen wees uit, dat merthiolaat en chloreton voor het conserveeren vermoedelijk te verkiezen zijn boven trikresol en nipargin.

Tabel 24. Vaccinatie van muizen met influenza-virus (muizenlong-suspensie).

Infectie : Intranasaal 0,05 cm³ WS-virusfiltraat 10⁻²

| Niet gevaccineerd | Na vaccinatie met 0.5 cm ³ WS-vaccin, voorzien van | | | |
|-------------------|---|----------|-------------|-----------|
| | trikresol | nipargin | merthiolaat | chloreton |
| D +++++ | D +++++ | * | +++ | ++ |
| D +++++ | D +++++ | * | +++ | ± |
| D +++++ | +++++ | D +++++ | + | 0 |
| D +++++ | ++ | +++ | + | 0 |
| D +++++ | + | 0 | ± | 0 |
| D +++++ | ± | 0 | 0 | |
| +++++ | | | 0 | |
| +++ | | | | |

Vaccinbereiding op groote schaal lag buiten onze technische mogelijkheid. Alleen in den winter van 1939—1940 beschikten we over genoeg vaccin voor de behandeling van een groot aantal personen.

Een ontworpen prophylactische proefneming was wegens de dreigende oorlogsomstandigheden niet uitvoerbaar ; het uitblijven van een influenza-epidemie zou bovendien de proef zonder resultaat hebben doen verlopen.

Hyperimmuniseering van konijnen. — Ons doel was het bereiden van een zoo groot mogelijke hoeveelheid immuunserum voor prophylactisch en therapeutisch gebruik. Daar frettenserum te kostbaar werd en het immuniseeren van grootere dieren als paard, schaaap enz. niet binnen ons bereik was, bepaalden we ons tot het konijn.

Magill en Francis²⁵ beschrijven, hoe zij immuunserum bereidden uit konijnen, 8 dagen na een enkele intraperitoneale injectie met influenzavirus. De gewonnen sera waren specifiek en bruikbaar, om Amerikaansche virusstammen door neutraliseeringsproeven van elkander te onderscheiden.

Ons doel was een ander, n.l. om een zoo groot mogelijke hoeveelheid immuunserum te verkrijgen ten behoeve van serumtherapie. Wij kozen daartoe allereerst den weg van herhaalde intraveneuse inspuitingen met virusfiltraat.

De ervaringen, die wij hierbij opdeden, waren de volgende. Na 14 dagen bereikte konijn 31 met 2 inspuitingen van achtereenvol-

gens 1 en 2 cm³ filtraat van den stam WS een beschermenden titer van 1/50 tegen virusfiltraat van denzelfden stam, 10 maal verdund. Deze titer was twee maanden later, na wekelijksche inspuitingen van stijgende hoeveelheden filtraat (van 3 tot 7 cm³) 10 dagen na de laatste inspuiting bepaald, niet verhoogd, eerder verlaagd. Een proef met nog 10 dagen later afgenomen serum bevestigde deze neiging (Tabel 25, a en b).

Tabel 25. Virus-neutraliseeringsproeven met op verschillende tijdstippen van hetzelfde konijn gewonnen immuunserum.

| Antiserum | Virusstam | Serumverduunningen | | | | Contrôle- enting |
|---|--------------------------------|--------------------|------|-------|---------|---------------------|
| | | 1/10 | 1/50 | 1/250 | 1/1250 | |
| a Konijn 31 normaal (8-4-1940) | nog niet geïmmuni- seerd | D +++++ | | | | D +++++ |
| | | D +++++ | | | | D +++++ |
| | | +++++ | | | | +++ |
| Konijn 31 WS (22-4-1940) | WS (filtraat 1 : 10) | 0 | 0 | ++ | | D +++++ |
| | | 0 | 0 | ++ | | D +++++ |
| | | 0 | 0 | 0 | | +++ |
| b Konijn 31 WS (7-6-1940) | WS (filtraat 1 : 10) | 0 | + | + | | D +++++ |
| | | 0 | 0 | 0 | | D +++++ |
| | | 0 | 0 | 0 | | |
| c Konijn 31 WS (17-6-1940) | WS (filtraat 1 : 10) | 0 | + | ++ | D +++++ | |
| | | 0 | 0 | ++ | D +++++ | D +++++ |
| | | 0 | 0 | + | ++ | D +++++ |
| Fret WS 179 | | 0 | 0 | + | +++ | |
| | | 0 | 0 | 0 | + | |
| | | 0 | 0 | 0 | + | |

De laatste proef c, waarin het konijnenserum naast een fretten-serum tegen dezelfde virussuspensie werd uitgezet, toont aan, dat het eerste een 5-maal zoo zwakke immuuntiter bezit als het tweede. Een voorproef had vastgesteld, dat het normale serum van konijn 31 in het geheel geen beschermende werking aan den dag legde tegen het virus, zelfs niet in de verdunning 1/2.

Konijn 58, geïmmuniseerd tegen stam B (Groningen 1939), en wel met belangrijk grootere doses, half-wekelijks toegediend, in stijgende hoeveelheden van 1,5 tot 14 cm³ filtraat, bleef desalniettemin op een minder hoogen immuuntiter staan. Na een maand werkte slechts een serumverduunning van 1/10 volledig neutraliseerend tegen de ongefiltreerde B-suspensie, die we gewoon zijn in neutraliseeringsproeven te gebruiken. Het konijnenserum 31 WS beschutte tegen dezelfde suspensie zelfs niet in de verdunning 1/10.

hetgeen wel wijst op een duidelijke specificiteit der konijnensera.

Magill en Francis (l.c.) wezen er op, dat later afgenomen serum (1 maand na de eerste en eenige injectie) minder specifiek is dan het eerste na de immunisatie en dat het gehalte aan heterologe antilichamen toeneemt, zonder herhaalde inspuiting. Onze proef toont echter duidelijke specificiteit aan bij sera, die achtereenvolgens 5 en 10 weken na de eerste injectie waren genomen. Het verslag van de proef, waarin ook het frettenserum medeloopt, wordt gegeven in tabel 26.

Tabel 26. Virusneutraliseeringsproeven met sera van konijnen, geimmuniseerend met verschillende virusstammen.

| Antiserum | Virusstam | Serumverduunningen | | | | Contrôle- enting |
|--------------|-------------------------------|--------------------|---------|---------|---------|---------------------|
| | | 1/10 | 1/50 | 1/250 | 1/1250 | |
| Konijn 58 B | B (ongefiltreerd 1 : 1) | 0 | ++ | D +++++ | | D +++++ D +++++ |
| | | 0 | + | D +++++ | | |
| | | 0 | + | +++ | | |
| Konijn 31 WS | | ++ | D +++++ | D +++++ | | |
| | | + | D +++++ | ++++ | | |
| | | 0 | +++ | +++ | | |
| Fret WS 157 | | + | + | D +++++ | D +++++ | |
| | | 0 | + | ++++ | D +++++ | |

Daar de neutraliseerende titers van de totnogtoe bereide konijnensera vrij laag bleven, namen wij een volgende proef met grootere hoeveelheden van een meer geconcentreerd virusfiltraat. Een konijn, dat binnen 10 dagen 3 inspuitingen van 10 cm³ kreeg van een 10 % muizenlongsuspensie (gefiltreerd), bereikte echter geen belangrijk hooger titer dan een der vorige (31 WS) na 2 inspuitingen van enkele cm³ van een gebruikelijke 5 % muizenlongsuspensie.

Tenslotte gingen wij over tot de minst omslachtige werkwijze, welke bestaat in de toediening van enkele intraperitoneale injecties van flinke hoeveelheden ongefiltreerde virussuspensie. Door krachtig centrifugeeren werd deze suspensie van de meeste orgaanpartikels ontdaan, waardoor de virulentie, anders dan bij filtratie, onverminderd blijft.

De titerstijging van het serum tijdens het verloop der immuniseering werd nagegaan bij konijn 100 WS, dat 3 intraperitoneale injecties kreeg, met telkens 14 dagen tusschenruimte, van 25, 12 en 12 cm³ ongefiltreerde 10 % virus-suspensie (WS). In den loop der immuniseering werd 4 maal bloed afgenomen en de antilichamen-

titer bepaald (Tabel 27). Een week na de eerste inspuiting was de titer nog onbelangrijk ($1/10$), doch 14 dagen na de eerste inspuiting gestegen tot bijna volledige neutralisatie bij $1/125$, welke titer bij de volgende serum-aftappingen (na de volgende injecties) volledig werd bereikt.

Tabel 27. Virus-neutralisatieproeven met sera van een konijn na eerste en herhaalde immunisatie.

| Antiserum | Virusstam | Serumverduunningen | | | Contrôle- entingen |
|----------------------------------|-------------------------|--------------------|------|-------|----------------------------|
| | | 1/10 | 1/50 | 1/250 | |
| Konijn 100 WS (4-10-1940) | WS (filtraat 1 : 10) | 0 | ++ | ++ | D +++++ D +++++ +++ |
| | | 0 | ± | + | |
| Konijn 100 WS (11-10-1940) | | 0 | 0 | ± | |
| | | 0 | 0 | 0 | |
| Konijn 100 WS (24-10-1940) | WS (filtraat 1 : 10) | | 0 | 0 | D +++++ D +++++ ++++ |
| | | | | 0 | |
| Konijn 100 WS (31-10-1940) | | | 0 | 0 | |
| | | | 0 | 0 | |

Aangezien in de weergegeven proeven wegens tekort aan muizen de titergrens niet kon worden bereikt en dus een volstrekt oordeel niet mogelijk is, bleek uit de proeven niet, dat door de herhaalde injecties een belangrijke verhoging van den binnen 14 dagen verkregen immuuntiter bereikt wordt. Om veel en voldoende krachtig serum te winnen, leek ons verbloeding van het konijn, enkele weken na één enkele intraperitoneale inspuiting, de kortste en eenvoudigste weg.

Doch de zaak heeft nog een andere zijde.

Specificiteit van het konijnen-immuniserum. — De proef, weergegeven in tabel 26, toonde een duidelijke stam-specificiteit van het konijnenserum; eenige volgende proeven wezen er echter op, dat deze specificiteit niet zoo sterk ontwikkeld was als bij frettersera.

In tabel 28 wordt een proef weergegeven van een anti-WS-konijnenserum tegen den virusstam Talmey (Tal), daarnaast een proef van een anti-WS-fretterserum en een anti-Tal-fretterserum tegen denzelfden virusstam. Terwijl er een sterk verschil in neutraliserenden titer zichtbaar is tusschen de beide frettersera, is de

titer van het konijnenserum lager dan die van het (homologe) Tal-serum, doch hoger dan die van het WS-frettenserum, hetgeen kan wijzen op een geringere specificiteit.

Tabel 28. Neutraliseeringsproef van konijnen-immuunserum tegen een heterologen virusstam.

| Antiserum | Virusstam | Serumverduunningen | | | | Contrôle-entingen |
|------------------|---------------------------------|--------------------|---------|---------|---------|--------------------|
| | | 1/10 | 1/50 | 1/250 | 1/1250 | |
| Konijn 100 WS | Tal (ongefiltreerd 1 : 1) | 0 | ± | D +++++ | | D +++++ D +++++ |
| | | 0 | 0 | D +++++ | | |
| | | 0 | 0 | +++ | | |
| Fret WS 201 | Tal (ongefiltreerd 1 : 1) | + | D +++++ | D +++++ | | D +++++ D +++++ |
| | | ± | +++ | D +++++ | | |
| Fret Tal | | | 0 | ++ | D +++++ | D +++++ |
| | | | 0 | ++ | ++ | |
| | | | 0 | 0 | + | |

Een soortgelijk beeld geeft een proef tegen den virusstam Gatenby (Gat), weergegeven in tabel 29.

Tabel 29. Neutraliseeringsproef van konijnen-immuunserum tegen een heterologen virusstam.

| Antiserum | Virusstam | Serumverduunningen | | | | Contrôle-entingen |
|------------------|---------------------------------|--------------------|---------|---------|--------|--------------------|
| | | 1/10 | 1/50 | 1/250 | 1/1250 | |
| Konijn 100 WS | Gat (ongefiltreerd 1 : 1) | 0 | D +++++ | D +++++ | | D +++++ D +++++ |
| | | 0 | D +++++ | D +++++ | | |
| Fret WS 201 | Gat (ongefiltreerd 1 : 1) | D +++++ | D +++++ | D +++++ | | D +++++ D +++++ |
| | | + | D +++++ | D +++++ | | |
| Fret Gat | | | 0 | ± | +++ | D +++++ D +++++ |
| | | | 0 | 0 | ++ | |
| | | | 0 | 0 | + | |

Wij bevestigden de reeds vermelde bevinding van Francis en Magill, dat de specificiteit van het konijnenserum afneemt in den loop der immunisering, door twee op verschillende tijdstippen van hetzelfde konijn afgenomen anti-WS-sera naast het anti-WS-frettenserum te titreren tegen den virusstam Christie (Tabel 30). Terwijl het eerste konijnenserum even weinig heterologe neutralisering bewerkstelt als het frettenserum, is deze bij het tweede serum goed merkbaar tot in $1/50$, waaruit een ontwikkeling van heterologe antilichamen in den loop der hyperimmunisering duidelijk blijkt.

Mocht dus al, zooals wij eerder aantoonde, met een enkele virus-injectie een vrijwel maximale homologe antilichamentiter bereikt worden, voor het verkrijgen van een heteroloog werkzaam antiserum is herhaling der inspuitingen van belang. En daar het bepalen van de stamspecificiteit van het influenza-virus tijdens een epidemie veel tijd vergt, waardoor een specifieke prophylaxe en therapie ernstig bemoeilijkt wordt, is hyperimmuniseering van konijnen een aan te bevelen weg tot het verkrijgen van een polyvalent antiserum.

Tabel 30. Neutraliseeringsproef met konijnen-hyperimmuunserum tegen een heterologen virusstam.

| Antiserum | Virusstam | Serumverduunningen | | | | Contrôle- enting |
|----------------------------------|----------------------------------|--------------------|---------|---------|---------|---------------------|
| | | 1/10 | 1/50 | 1/250 | 1/1250 | |
| Konijn 100 WS (11-10-1940) | Chr. (ongefiltreerd 1 : 1) | D +++++ | D +++++ | D +++++ | D +++++ | |
| | | D +++++ | D +++++ | D +++++ | +++ | |
| + | | +++ | D +++++ | D +++++ | D +++++ | |
| ± | | ++ | +++ | 0 | D +++++ | |
| D +++++ | | D +++++ | D +++++ | | | |
| D +++++ | | D +++++ | D +++++ | | | |
| Fret WS 201 | | D +++++ | D +++++ | D +++++ | | |
| | | D +++++ | ++ | +++ | | |

Een stap verder gaand op den ingeslagen weg bereidden wij in het najaar van 1941 anti-influenza-immuunserum door konijnen te hyper-immuniseeren door afwisselende inspuitingen met virus van verschillende stammen. Wij kozen daarvoor de specifieke stammen WS en Talmey, als zijnde de meest virulente, en den in het begin van 1941 geïsoleerde stam Z, teneinde ook de antigenen van een zeer recent virus te laten gelden. Op deze wijze meenden wij een antilichamencombinatie te bereiken van een zoo breed mogelijke werkingssfeer. Helaas hadden we door gebrek aan muizen niet de gelegenheid deze sera op hun veelzijdige antilichamentiter te contrôleeren, doch tegen WS toonden zij een zeer goeden titer ($1/250$), zoodat wij mogen aannemen, dat ook tegen Tal en Z een behoorlijk neutraliseerend vermogen zou worden bereikt.

Wij bereidden ook sera tegen elk der genoemde stammen afzonderlijk, om daarmee ons eerder begonnen onderzoek naar de specificiteit van het konijnenserum voort te zetten, doch ook hiervan kon door muizengebrek niets komen. Wel kon nog bij een anti-Z-serum een zeer goede antilichamentiter tegen den eigen stam worden vast-

gesteld ($1/250$). In tabel 31 wordt deze proef weergegeven, met een frettenserum van denzelfden stam als vergelijking. Tevens worden eenige neutraliseeringsproeven met verschillende der bereide sera tegen den WS-stam medegedeeld.

Tabel 31. Virus-neutraliseeringsproeven met konijnen-immunsera.

| Antiserum | Virusstam | Serumverduunningen | | | | Contrôle- entingen | |
|--|-------------------------------|--------------------|------|---------------|--------------------|-------------------------------|-----|
| | | 1/10 | 1/50 | 1/250 | 1/1250 | | |
| Konijn 104 Z | Z (ongefiltreerd 1 : 1) | | 0 | + | + | D +++++ D +++++ D +++++ | |
| | | | 0 | 0 | + | | |
| | | 0 | 0 | 0 | + | | |
| Fret 3 Z | | | | 0 | + | | +++ |
| | | | | 0 | + | | ++ |
| | | | | 0 | 0 | | ++ |
| Konijn 103 WS | WS (filtraat 1 : 10) | | 0 | + | D +++++ D +++++ | | |
| | | | 0 | 0 | | | |
| Konijn 106 WS-Tal-Z (polyvalent) | | 0 | 0 | $\frac{+}{0}$ | | | |
| | | 0 | 0 | 0 | | | |
| Konijn 107 WS | WS (filtraat 1 : 10) | 0 | 0 | + | ++ | D +++++ D +++++ | |
| | | 0 | 0 | 0 | ++ | | |
| Konijn 108 WS-Tal-Z (polyvalent) | WS (filtraat 1 : 10) | 0 | + | + | | D +++++ D +++++ | |
| | | 0 | 0 | 0 | | | |

Inhalatie van immunserum bij muizen. — Aan de serumtherapie door injecties is het bezwaar verbonden, dat, naar het schijnt, groote hoeveelheden moeten worden ingespoten. Vandaar, dat wij onze aandacht wijdden aan de werkwijze van Smorodintseff, die het immunserum door verstuiwing direct in de ademwegen bracht; op deze wijze ingebracht serum werkte zeer krachtadig in de kleine hoeveelheid van enkele cm^3 .

Door het uitblijven van een influenza-epidemie in 1942 kon het niet komen tot een toetsen van deze methode in de practijk bij menschen. Derhalve moesten we ons beperken tot eenige oriënteerende proeven bij muizen.

Als toestel om het serum in fijn verdeelden toestand te brengen, gebruikten wij den Atmos-verstuiver der firma Silbe H.O. te Amsterdam, aangesloten op een perslucht-cylinder met een regelbaar

luchtdrukventiel. Een groep muizen van minstens drie werd in een glazen cylinder gezet, die aan beide uiteinden afgesloten was met gaas, waar de nevel van serum doorheen werd geblazen. De dieren werden $\frac{1}{2}$ tot 6 uur in de inhaleeringscylinder gelaten. De muizen werden dus maximaal 6 uur aan de serumnevel blootgesteld. Het serum kwam onverdund in den verstuiver. De hoeveelheden verstoven serum bedroegen ten hoogste 5 cm³. Eén groep werd 24 uur vóór de intranasale enting met een bepaalde virusdosis behandeld, een tweede groep onmiddellijk voor de enting en een derde groep 24 uur na de intranasale infectie. Op deze wijze kon in één proef de prophylactische en therapeutische werking worden vergeleken.

Een aldus opgestelde proef wordt in tabel 32 voorgesteld.

Tabel 32. Serumbehandeling bij muizen : inhalatie.

| Verstoven immuunserum | Seruminhalatie gedurende 30 minuten : | | | WS-filtraat 10 ⁻³ Contrôle |
|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|------------------------|---|
| | 24 uur voor de enting | onmiddellijk voor de enting | 24 uur na de enting | |
| K. 101 WS 1 : 1 | + 0 0 | + 0 0 | ++ ++ ++ | ++ ++ + 0 |

Deze proef wijst op een zekeren invloed van het serum, toegediend 24 uur en onmiddellijk voor de infectie. Een therapeutische werking ontbreekt.

De volgende proef, voorgesteld in tabel 33, werd in 3-voud gedaan met 3 verschillende virusverduunningen als infectiebron.

Tabel 33. Serumbehandeling bij muizen : inhalatie.

| Verstoven immuunserum | Seruminhalatie gedurende 3 uren : | | | Intranasaal Virus | |
|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|
| | 24 uur voor de enting | onmiddellijk voor de enting | 24 uur na de enting | WS-filtraat | Contrôle |
| K. 100 WS | D +++++ *) + 0 | + + 0 | +++ +++ +++ | 10 ⁻² | +++ +++ +++ |
| K 100 WS | ++ ++ + | ++ + + | +++ ++ ++ | 10 ⁻³ | ++ ++ ++ |
| K 100 WS | + 0 0 | 0 0 0 | + + + | 10 ⁻⁴ | + + + |

*) Heeft zich misschien weten te verschuilen voor het verstoven serum.

De serumbehandeling 24 uur na de infectie toont weer geen enkelen therapeutischen invloed. De inhalatie 24 uur en onmiddellijk voor de infectie schijnt eenig effect op te leveren. Dit komt vooral bij de kleine infectiedosis (10^{-4}) tot uiting. Hier is een bijna volledige bescherming verkregen.

Eenzelfde indruk wordt gewekt door de volgende proef, weergegeven in tabel 34.

Tabel 34. Serumbehandeling bij muizen : inhalatie.

| Verstoven immuunserum | Seruminhalatie gedurende 6 uur : | | | Intranasaal Virus | |
|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------|-------------------|--------------------------|
| | 24 uur voor de enting | onmiddellijk voor de enting | 24 uur na de enting | WS-filtraat | Contrôle |
| K 100 WS K 103 WS (gemengd) | D +++ +++ * | +++ +++ ++ | D ++++ ++++ 0 | 10^{-2} | D ++++ D ++++ ++++ |
| | ++ + 0 | ++ + + | +++ ++ + | 10^{-3} | +++ ++ + |
| | + 0 0 | * 0 0 | + + + | 10^{-4} | ++ ++ + |

De slechts gedeeltelijke prophylactische werking en het geheel uitblijven van eenig therapeutisch effect in deze proeven stelden ons teleur. Door het verstoven serum op glaasjes op te vangen, konden we vaststellen, dat de grootte der druppeltjes gemiddeld 7μ bedroeg. Findeisen¹³⁴ heeft berekend, dat deeltjes van deze grootte bij den mensch doordringen tot in de bronchioli respiratorii en ductuli alveolarii. Een vergelijking met den gang der verstoven deeltjes in de luchtwegen bij de muis is niet met zekerheid op te stellen. Wellicht moet de reden van de geringe werkzaamheid der seruminhalatie hierin gezocht worden, dat het serum door het fijne verdeelen langs den weg der schuimvorming wordt gedenatureerd. Dat Smorodintseff niet op dit bezwaar gestuit is, kan hieraan gelegen hebben, dat hij een anderen graad van verstuiving bereikte, iets waar wij echter geen nadere gegevens over hebben, daar hij wel een foto van zijn verstuivingsapparaat geeft, doch de constructie er van niet in bijzonderheden aangeeft. Het door ons gebruikte serum was volgens de neutraliseringsproeven krachtig werkzaam.

Om alsnog de werking van het in de ademwegen ingebrachte serum na te gaan, dienden we het muizen intranasaal toe op de-

zelfde wijze als met virus gebruikelijk is. Op deze wijze kwam bij de dieren 0,05 cm³ immuunserum met tamelijke zekerheid in aanraking met het respiratorisch epitheel. Ook Smorodintseff paste deze wijze van behandelen in zijn proeven toe, naast de inhalatie, en vermeldt goede resultaten met serumverduunningen van 1 : 1000 en hooger, toegediend 24 uur voor de infectie met 10 M.L.D.

In de navolgende proeven (tabellen 35 en 36) verkregen we een zeer gering positief resultaat met een serumverduunning van 1 : 100; goed merkbare gunstige gevolgen zagen we bij toedienen van het serum in de verduunning 1 : 10 en 1 : 2, doch weer hoofdzakelijk in prophylactischen zin. Een therapeutische werking was alleen bij de kleine infectiedoses en dan nog in onvoldoenden graad aan te toonen.

Tabel 35. Serumbehandeling bij muizen: nasale indruppeling.

| Ingedruppeld immuunserum | Serum intranasaal 0.05 cm ³ | | | Virusfiltraat WS | Controle |
|-----------------------------|--|--------------------------------|------------------------|---------------------|--------------------------|
| | 24 uur voor de enting | onmiddellijk voor de enting | 24 uur na de enting | | |
| K 100 WS 1 : 100 | ++++ ++++ ++++ | ++++ +++ +++ | D ++++ +++ ++ | 10-1 | D ++++ D ++++ ++++ |
| | +++ ++ ++ | +++ ++ 0 | ++ ++ ++ | 10-2 | D ++++ ++++ +++ |
| | ++ + + | D ++++ ++ + | ++ + 0 | 10-3 | +++ ++ + |
| K 103 WS 1 : 10 | | 0 0 0 | | 10-2 | +++ +++ +++ |
| | Niet verricht | * 0 0 | Niet verricht | 10-3 | * + + |
| | | 0 0 0 | | 10-4 | 0 0 0 |

Tabel 36. Serumbehandeling bij muizen: nasale indruppeling.

| Ingedruppeld immuunserum | Serum intranasaal 0.05 cm ³ | | | Neutraliseerings- proef: serum K 103 WS 1 : 100 virus WS fl. 10 ⁻¹ | Virus WS- filtr. | Contrôle |
|-----------------------------|--|-----------------------------------|------------------------|--|------------------------|----------|
| | 24 uur voor de enting | onmiddellijk voor de enting | 24 uur na de enting | | | |
| K 103 WS 1 : 2 | + | + | +++ | 0 | 10 ⁻² | ++++ |
| | 0 | 0 | +++ | 0 | | ++++ |
| | 0 | 0 | ++ | 0 | | +++ |
| K 103 WS 1 : 2 | + | + | +++ | | 10 ⁻³ | +++ |
| | 0 | 0 | ++ | | | +++ |
| | 0 | 0 | + | | | ++ |
| K 103 WS 1 : 2 | * | + | ++ | | 10 ⁻⁴ | ++ |
| | + | 0 | 0 | | | ++ |
| | 0 | 0 | 0 | | | |
| K 103 WS 1 : 2 | ++ | ++ | ++++ | ± | 10 ⁻¹ | D ++++ |
| | + | + | +++ | ± | | D ++++ |
| | + | ± | ++ | 0 | | D +++ |
| | + | ± | +++ | | 10 ⁻³ | D ++++ |
| 0 | 0 | ++ | | +++ | | |
| 0 | 0 | + | | +++ | | |

Als wij de uitkomst van de laatste vier proeven vergelijken met de proeven, waarbij serum-inhalatie werd toegepast, dan valt er overeenkomst op te merken, wat betreft de geringe therapeutische werkzaamheid van 24 uur na de virusinfectie toegediend serum. Het prophylactisch toegediende serum heeft bij nasale indruppeling een veel gunstiger gevolg dan bij verstuiving. Vooral het duidelijke effect van 24 uur tevoren toegediend serum, in de laatste 2 proeven is van betekenis, daar het wijst op een werkelijke immunisatie van de longepitheelcellen. Dat het onmiddellijk voor de infectie ingedruppelde immuunserum de infectie ten deele verhindert, zou nog kunnen worden toegeschreven aan een directe menging van serum en virus buiten het epitheel, zoodat hier een verkapte virus-neutraliseeringsproef kon zijn verricht.

In de tabel 36 is tevens de uitslag vermeld van de neutraliseeringsproef met het bij de behandeling toegepaste serum, 100 maal verdund, tegen het gebruikte virusfiltraat in de verdunning 1 : 10. Een regelrechte vergelijking van deze proef met de prophylactisch-therapeutische proef is uiteraard niet mogelijk; toch schijnt het, dat in vivo een geringer virus-inactiverend effect wordt bereikt dan in vitro, waarschijnlijk door den invloed van fysische, anatomische, histologische en fysiologische factoren. Dit alles vraagt

om herhaling van het onderzoek op bredere schaal en ook met een andere verstuivingstechniek.

Mogen de proeven met muizen al niet het grootē succes hebben opgeleverd, dat wij meenden te mogen verwachten, zij wettigen in ieder geval in daarvoor geschikte gevallen, mede in verband met de resultaten, die Smorodintseff beschreef, een serumbehandeling door inhalatie bij den mensch toe te passen.

HOOFDSTUK VII.

Chemoprophylaxis en -therapie — Over de chemoprophylaxis en -therapie der influenza kunnen we kort zijn, daar zij tot nog toe weinig hebben opgeleverd. Van geen der middelen, die door den handel als voorbehoedmiddel tegen „griep” worden aanbevolen, kon tot nu toe in het dierexperiment eenige specifieke werking tegen het influenza-virus worden aangetoond.

Proeven, door het Instituut voor Praeventieve Geneeskunde te Leiden verricht met kinine-praeparaten, verliepen negatief; hetzelfde kan gezegd worden van een onderzoek door ons Laboratorium te Groningen verricht met kinine-praeparaten van andere herkomst.

In ons laboratorium werden ook prophylactische proeven genomen bij muizen met bismuth en joodkali, alle zonder eenig gevolg.

Een in 1941 door H. J. Kolk¹³⁵ verrichte proef met chloras kalicus bij muizen leverde geen positief resultaat. Het werd beproefd vanwege de mogelijke werking bij poliomyelitis acuta.

Door Climenko, Crossly en Northey¹³⁶ werden 100 derivaten van sulfanilamide therapeutisch bij muizen beproefd. De meer bekende verbindingen waren alle onwerkzaam tegen het influenza-virus. Slechts disulfanilamide en eenige derivaten daarvan en de afgeleide verbindingen van 2,5 - bisulfanilamidobenzeen-sulfonzuur toonden zich bij muizen, subcutaan ingespoten, therapeutisch werkzaam tegen zeer zwakke virusdoses. We hebben de proeven nagedaan met disulfanilamide, ons door de fa. Organon te Oss geleverd, doch zonder eenig gevolg.

Wilson Smith¹³⁷ vond, dat natrium-desoxycholaat in vitro het influenza-virus inactiveert, hetgeen wij konden bevestigen. *)

*) Wilson Smith's poging om muizen met een door gal geïnactiveerd virus te immuniseeren, verliep niet bemoedigend.

SAMENVATTING.

In 1933 gelukte het aan Wilson Smith, Andrewes en Laidlaw van het Institute for Medical Research te Londen om uit keelspoelsels van influenza-patiënten een virus af te zonderen. Zij infecteerden met dit virus fretten en brachten het van fretten over op muizen. Immunologisch werd de identiteit van het agens, dat ziekteverschijnselen, zoowel bij den mensch, als bij het fret en de muis verwekte, vastgesteld. Het menscheninfluenza-virus bleek verwant, doch niet identiek met het in 1931 door Shope ontdekte varkensinfluenza-virus. In de jaren 1934 tot 1937 werd het influenza-virus, behalve in Engeland, afgezonderd, tijdens epidemieën, in Amerika, Australië en op het vasteland van Europa. In 1937—1938 werd aangetoond, dat er een groot aantal influenza-virusstammen voorkomen, die, ondanks antigene verwantschap, niettemin elk een eigen antigene structuur bezitten. In 1941 werd echter een influenza-virus geïsoleerd, dat geen enkele verwantschap met de tot dan toe bestudeerde stammen bleek te bezitten; het werd Influenza B genoemd, om het te onderscheiden van de bekende, met elkander verwante stammen, die worden samengevat als Influenza A. In Groningen werden in 1939 en 1941 influenza-virusstammen A geïsoleerd.

De werkwijze, in Groningen gevolgd bij het afzonderen van influenza-virus, sloot zich in de hoofdzaken aan bij die der Engelsche onderzoekers aan het Institute for Medical Research. In 1940 kwam een isoleerhuis voor fretten tot stand, waarin deze proefdieren, na intranasale enting met keelspoelsel of sputum van patiënten, kunnen worden afgezonderd en bestudeerd. Het influenza-virus vermenigvuldigt zich bij het fret in den neus; het kan uit de neusslijmvliezen worden gewonnen. Met een daaruit bereide suspensie wordt een volgend fret geïnfecteerd. Na eenige viruspassages van fret op fret worden muizen intranasaal geënt. Het virus verwekt bij deze proefdieren een influenza-pneumonie, waarvan het patholoog-anatomische beeld kenmerkend is, en waaraan de dieren binnen 6 dagen sterven. Door de virushoudende suspensie tijdens de passage eens of meer malen te filtreeren door een membraanfilter met een maximale poriëngrootte van 1μ wordt de virusnatuur van het infecteerende agens bewezen.

De al of niet gefiltreerde longsuspensie van met influenza-virus geente muizen wordt gebruikt voor het titreeren van patiëntensera op antilichamen in de neutraliseeringsproef (muisbeschuttingsproef). Een reeks serumverduunningen wordt gemengd met een hoeveelheid virusfiltraat en na een uur staan bij kamertemperatuur wordt met elk mengsel een groep van 3 muizen geënt. Het overleven van de muizen wijst op volledige neutraliseering van het virus door het immuunserum; verschillende graden van longaesies wijzen op overeenkomstig verschillende graden van neutraliseerend vermogen. Het muizenlongvirus leent zich ook tot antigeen in de complementbindingsreactie.

Tijdens de influenza-epidemie te Groningen van Januari-Februari 1941 werden van 13 patiënten deels keelspoelsels, verkregen in de eerste ziektedagen, deels sputa, eveneens uit de eerste ziektedagen, geënt op fretten. Bij de 13 fretten werden de direct waarneembare klinische verschijnselen genoteerd en werd tweemaal daags de temperatuur opgenomen. In 5 gevallen vertoonde het fret een typische influenza-infectie, met den kenmerkenden koortstop op den 2en of 3en dag, met catarrhale verschijnselen in den neus, al of niet gepaard met conjunctivitis. In al deze 5 gevallen werden in het serum der reconvalescente fretten antilichamen tegen den virusstam WS aangetoond door middel van de neutraliseeringsproef. In 2 van de 13 gevallen waren de ziekteverschijnselen van het fret onduidelijk, doch bevatte het serum der fretten, twee weken na de enting, antilichamen tegen het influenza-virus, zoodat besloten mocht worden, dat de dieren een subclinische infectie hadden doorgemaakt.

In 2 van de 6 overige gevallen kon bij het fret op geenerlei wijze een influenza-infectie worden aangetoond, terwijl het serum der reconvalescente patiënten, van wie materiaal bij de fretten geënt was, influenza-antilichamen bevatte, zoowel in de virusneutraliseeringsproef als bij de complementbindingsreactie. In de 4 overblijvende gevallen was de reactie van de fretten evenzeer negatief, doch dit was in overeenstemming met den uitslag van het immunologisch onderzoek der patiëntensera, die eveneens negatief was.

In den loop van de frettenpassages werden de neussuspensies gefiltreerd door een membraanfilter en werd het bacterievrij filtraat geënt bij een contrôlefret. Dit dier gaf dezelfde typische symptomen te zien als de dieren, welke met ongefiltreerde suspensie waren geënt. Dezelfde contrôle op de aanwezigheid van het virus als ziekteverwekkend agens werd toegepast in den loop der muizenpassages door de longsuspensie te filtreren. Bovendien

werd de aard van de longlaesies bij de muizen microscopisch nagegaan.

Een aantal patiëntensera werd onderzocht uitsluitend langs immunologischen weg, en wel door de virusneutraliseringsproef en de complementbindingsreactie. In 43 gevallen kon een stijging in immuuntiter tegen het influenza-virus (WS) worden vastgesteld, of bezat het serum zoo'n hoogen titer in vergelijking met dien van een bekend influenza-antiserum (standaardserum), dat tot het doormaken van een influenza-infectie als oorzaak er van mocht worden besloten.

De 3 geïsoleerde virusstammen werden aan een antigeen-analyse onderworpen, welke geen onderlinge verschillen aan het licht bracht. Er kon worden vastgesteld, dat zij in antigene structuur verschilden van den Engelschen stam WS.

Hoewel verschillende onderzoekers konden aantonen, dat fretten na een doorstane influenza-infectie gedurende een aantal maanden immuun zijn tegen herinfectie, leverden vaccinatieproeven bij fretten tot nog toe onzekere resultaten. Muizen lieten zich met goed gevolg tegen influenza vaccineeren door subcutane en intraperitoneale inspuitingen. Vaccinatieproeven bij menschen verliepen in een enkel geval (Chenoweth en Waltz) bemoedigend. Van behandeling met immuunserum werden goede resultaten gemeld (Mc Guire en Redden, Hare, Smorodintseff).

Wij bereidden anti-influenzavaccin uit virushoudende muizenlongsuspensie, bacterievrij gefiltreerd en voorzien van formaldehyde 1 : 3000. Het was in staat muizen tegen belangrijke infectiedoses te beschermen.

Therapeutische sera werden bereid door het hyperimmuniseeren van konijnen en wel door deze dieren intraveneus in te spuiten met influenza-virusfiltraat, of intraperitoneaal met ongefiltreerd virus (muizenlongsuspensie). Verschillende stammen werden hiervoor gebruikt. De sera bezaten een behoorlijken immuuntiter en vertoonden bovendien stamspecificiteit. Voor therapeutische doeleinden werd daarom mengserum bereid, hetzij door het mengen van specifieke sera, hetzij door konijnen met verschillende virusstammen te immuniseeren.

Proeven om muizen door het doen inademen van verstoven immuunserum te beschermen tegen een er op volgende intranasale infectie met influenza-virus hadden wel eenig, doch niet het gehoopte gevolg. Een sterkere beschermende werking kon bij druppelsgewijze onder aethernarcose intranasaal toegediend serum worden vastgesteld. Therapeutisch effect op een tevoren verwekte

infectie kon langs geen dezer beide wegen in belangrijke mate worden verkregen.

Evenmin als andere onderzoekers gelukte het ons een chemotherapeuticum te vinden, dat in staat is in vivo het influenza-virus te neutraliseeren.

Bij alle onderdeelen van ons werk werden wij gehinderd door een tekort aan proefdieren, mede door de oorlogsomstandigheden. Zoolang er in ons land niet een proefdierenfokkerij op groote schaal voor wetenschappelijke doeleinden tot stand komt, behoort een meer dan oriënteerend influenza-onderzoek tot de onmogelijkheden.

RÉSUMÉ.

Les études expérimentales sur l'influenza faites à Groningue (Pays-Bas) pendant l'épidémie de janvier-février 1941 furent poursuivies selon les techniques développées par Wilson Smith, Andrewes et Laidlaw, du National Institute for Medical Research de Hampstead (Londres). Les recherches se faisaient dans un laboratoire construit en 1940 et spécialement destiné à l'étude de l'influenza expérimentale du furet. Les animaux soumis à l'expérience y sont tenus rigoureusement isolés les uns des autres. Le laboratoire dépend de l'Institut de Bactériologie et d'Hygiène de l'Université de l'Etat de Groningue.

Les prélèvements, gargarismes ou crachats, d'un certain nombre de malades souffrant d'une infection aiguë des voies respiratoires supérieures furent inoculés à des furets. Chaque jour on faisait l'examen des symptômes de l'infection expérimentale et deux fois par jour on prenait la température. Dans cinq cas le furet présenta des symptômes nets : écoulement et obstruction nasale, yeux injectés, éternuements, forte élévation thermique de courte durée. Dans deux autres cas le furet ne développa que des symptômes incertains ; toutefois le sérum des furets, pris quatorze jours après l'inoculation, contenait de la substance immunisante contre le virus de l'influenza, de sorte qu'on pouvait conclure que les animaux avaient subi une infection silencieuse.

Trois souches de virus, provenant de trois des cas énumérés, furent isolées. En effectuant un certain nombre de passages (3, 4 et 5) par le furet, nous avons pu reproduire la maladie en série ; ensuite le virus fut adapté à la souris. Il se produisait chez cet animal des lésions pulmonaires léthales après 9, 3 et 7 passages respectivement.

Au cours des passages par le furet autant que par la souris l'agent infectieux était filtré au moyen d'une membrane à colloïdium à pores d'un diamètre moyen de $0,6\mu$. Les prélèvements des malades n'étaient pas filtrés avant d'être inoculés sur les animaux, pour ne pas trop affaiblir l'agent infectieux.

L'analyse des trois souches isolées ne démontra pas de différences antigéniques. Les souches nouvelles n'étaient identiques à aucune des souches dites spécifiques anglaises.

L'étude immunologique du sérum d'une cinquantaine de malades d'influenza démontra que dans 43 cas le virus avait été l'agent étiologique ; parmi eux il y avait 13 occurrences de pneumonie, contractée en suite d'une attaque d'influenza.

La thérapie et la prophylaxie au moyen de vaccin ou de sérum anti-influenza sont discutées. On obtint un sérum anti-influenza polyvalent par l'immunisation de lapins avec plusieurs souches de virus. En administrant le sérum à des souris par voie nasale on pouvait constater un certain effet prophylactique contre l'infection par le virus d'influenza.

Les lésions pulmonaires chez les souris étaient contrôlées à l'aide de sections microscopiques selon les critères donnés par Straub.

On ne saurait dire qu'avec la détermination de l'étiologie de l'épidémie en question le but d'une étude comme la présente aura été atteint. Le travail accompli devra servir à la fois de préparation à l'étude de l'influenza pandémique.

Les recherches qui ont lieu à cet effet sont organisées en Hollande par l'Institut de Médecine Préventive (Instituut voor Praeventieve Geneeskunde) de Leyde.

ZUSAMMENFASSUNG.

Während des Zeitraumes vom 9. Januar bis zum 7. Februar 1941 wurden teils Rachenspülungen, teils Sputumsuspensionen von 13 Influenza-Patienten nasal bei Frettchen geimpft. Die Tiere waren, streng abgesondert, in einem speziell für das Studium der experimentellen Frettchen-Influenza 1940 gebauten Isolierhaus untergebracht, das jetzt einen Teil des Hygienischen Institutes der Reichsuniversität bildet. Die Krankheitssymptome der Tiere wurden regelmässig aufgezeichnet und die Temperatur wurde zweimal am Tage gemessen.

In fünf Fällen zeigte das Frettchen eine typische Influenza-Infektion mit dem kennzeichnenden Temperaturanstieg am zweiten oder dritten Tage, mit Nasenkatarrh und in einigen Fällen Augenerentzündung. In diesen Fällen konnten im Serum der genesenen Frettchen Antikörper gegen das Influenza-Virus (WS) nachgewiesen werden.

In zwei anderen Fällen waren die Symptome der Frettchen zweifelhaft; das Rekonvaleszenz-Serum enthielt aber Influenza-Antikörper, welcher Befund den Schluss gestattet, das die Tiere eine subklinische Infektion durchgemacht hatten.

In den sechs übrigen Fällen zeigten die Frettchen keine Reaktion; auch konnten im Frettchenserum keine Antikörper nachgewiesen werden. Die immunologische Untersuchung der Patientenserum zeigte aber in zwei dieser Fälle einen Anstieg an Influenza-Antikörpern.

Von drei der erstgenannten fünf Fälle wurden die Virusstämme abgesondert. Nach einigen (3, 4 und 5) Passagen über Frettchen wurde das Virus intranasal auf Mäuse geimpft. Die Stämme erzeugten tödliche Lungenläsionen bei den Mäusen nach bezw. 9, 3 und 7 Passagen.

Im Laufe der Frettchen- und Mäusepassagen wurde die Virus-suspension durch Membranfilter (maximale Porengrösse 1μ) filtriert. Das den Patienten entnommene Material wurde vor der Impfung beim Versuchstier nicht filtriert, damit die Virulenz nicht geschwächt würde.

Die Natur der Lungenläsionen bei den Mäusen wurde mikroskopisch nach den von Straub angegebenen Kriterien geprüft.

Die Antigen-Analyse der drei isolierten Virusstämme ergab eine

einheitliche Struktur. Die neuen Stämme zeigten keine Identität mit irgendeinem der englischen „spezifischen“ Influenza-Stämme.

Aus der immunologischen Prüfung von fünfzig Patientenserum erwies sich in 43 Fällen das Influenza-Virus als ätiologisches Moment. Unter diesen waren 13 Fälle von Lungenentzündung infolge einer Influenza-Virusinfektion.

Nunmehr wurde ein polyvalentes Heilserum hergestellt, indem Kaninchen mit verschiedenen Influenza-Virusstämmen hyperimmunisiert wurden. Nasale Einträpfelung dieses Serums schützte Mäuse einigermaßen gegen eine nachträgliche Virusinfektion.

Die abgeschlossene Arbeit dürfte als eine Einleitung zu einem viel wichtigeren Studium einer kommenden Influenza-Pandemie betrachtet werden. Dieses Studium wird in den Niederlanden von dem Institut für präventive Medizin (Instituut voor Praeventieve Geneeskunde) in Leiden organisiert.

SUMMARY.

The experimental studies on influenza, during the epidemic of January—February 1941 at Groningen (Holland), were carried out according to the technique evolved by Wilson Smith, Andrewes and Laidlaw, of the National Institute for Medical Research at Hampstead (London). The investigations were done in a laboratory specially built in 1940 for the study of experimental influenza in ferrets and since 1941 incorporated in the Institute for Hygiene and Bacteriology of the State University.

During the period of January 9th to February 7th, material from 13 patients, partly throat-washings, partly suspensions of sputa, obtained during the first days of illness, was inoculated in ferrets, which were kept under rigid measures of isolation. The temperature was read twice daily and the clinical signs were recorded.

In 5 cases the ferrets developed a typical influenza infection, with the characteristic fever peak on the second or third day and catarrhal signs of the nose, sometimes of the conjunctiva. In all these cases influenza antibodies against the virus strain WS could be demonstrated in the ferret convalescent serum by means of the mouse protection test.

In two other cases the signs in the ferrets were doubtful, but the ferrets' convalescent serum contained antibodies against the influenza virus, so that these animals must be assumed to have gone through a subclinical infection.

In 4 of the 6 remaining cases in which the ferrets did not show any reaction, the patients' convalescent serum neither showed any rise in antibodies. In the remaining 2 both the mouse protection and complement fixation test of the patients' sera gave positive results, so that missed ferret-inoculation must be assumed.

Three virus strains were isolated, from three of the enumerated cases. After some ferret passages (3, 4 and 5) the virus was adapted to mice. The strains produced lethal pulmonary lesions in the mice after 9, 3 and 7 passages respectively.

In the course of the ferret and mouse passages the virus suspension was filtered through a collodium membrane (average pore diameter $0,6 \mu$.) The throat-washings and sputa from the patients were not filtered before being inoculated in the ferrets, in order not to reduce the virulence of the pathogenic agent.

The nature of the pulmonary lesions of the mice was checked microscopically by sectioning the lung. Here by we accepted the criteria described by Straub.

The analysis of the three isolated influenza virus strains did not show any mutual antigenic differences. The new strains were not found to be identical with any of the English „specific” strains.

The immunological study of the sera from fifty influenza patients demonstrated, that in 43 cases the influenza virus had been the etiological agent ; among these were 13 cases of pneumonia, following an attack of influenza.

Prophylaxy and therapy by means of vaccine or immune serum are discussed. A multivalent anti-influenza serum was prepared by hyperimmunising rabbits with various virus strains. Some prophylactic effect of rabbit immune serum, intranasally administered to mice infected with influenza virus, could be noted.

The aim of this study may not be considered reached by the ascertainment of the etiology in a single influenza epidemic. This work must be seen as a preparation for the study of an influenza pandemic. For the Netherlands the research work in this field is being organised by the Institute for Preventive Medicine (Instituut voor Praeventieve Geneeskunde) at Leiden.

LITERATUUR

HOOFDSTUK I.

1. *Wilson Smith, Andrewes, C. H. and Laidlaw, P. P.*: A virus obtained from influenza patients. *Lancet*, 1933, 66.
2. *Mulder, J.*: *Haemophilus influenzae*. Diss. Groningen, 1933.
— *Haemophilus influenzae* (Pfeiffer) as an ubiquitous cause of common acute and chronic purulent bronchitis. *Acta Med. Scand.*, 104, 1938, 98.
3. *Kairies, A.*: Studien zur Grippenätiologie unter dem Gesichtspunkt der Provokation. *Münch. med. Wschr.*, 1941, 606.
4. *Varenius, P.*: Zur Bakteriologie der Influenza. *Sv. Läkartidn.*, 1941, 667.
5. *Tsurumi, M. & Ogasawara, K.*: Studies on influenza virus. A minute corpuscle in lung lesions of mice infected by influenza virus. *Jap. J. Med. Sc. Bact.*, 1, 1940, 153. Refer.: *Zbl. f. Bact. Orig.*, 139, 1941, 159.
6. *Wilson Smith and Stuart-Harris, C. H.*: Influenza infection of man from the ferret. *Lancet*, 1936, 121.
7. *Wilson Smith*: The influenza problem. *St. Mary's Hosp. Gaz.*, 43, 1937, 112.
8. *Shope, R.*: Swine influenza I. Experimental. *J. Exp. Med.*, 54, 1931, 349.
Lewis, P. A. and Shope, R.: Swine influenza II. A hemophilic bacillus from the respiratory tract of infected swine. *Ibid.*, 361.
9. *Shope, R.*: Swine influenza III. Filtration experiments and etiology. *J. Exp. Med.*, 54, 1931, 373.
10. — Studies on immunity to swine influenza. *J. Exp. Med.*, 56, 1932, 575.
11. — The infection of ferrets with swine influenza virus. *J. Exp. Med.*, 60, 1934, 49.
12. *Andrewes, C. H., Laidlaw, P. P. and Wilson Smith*: The susceptibility of mice to the viruses of human and swine influenza. *Lancet*, 1934, 859.
13. *Francis, Th. Jr.*: Transmission of influenza by a filterable virus. *Science*, 80, 1934, 457.
14. *Francis, Th. and Magill, T. P.*: Cultivation of human influenza virus in an artificial medium. *Science*, 82, 1935, 353.
15. *Andrewes, C. H., Laidlaw, P. P. and Wilson Smith*: Influenza. Observations on the recovery of virus from man and on the antibody content of human sera. *Br. J. Exp. Path.*, 16, 1935, 566.
16. *Pettit, H., Mudd, S. and Pepper, D. S.*: The Philadelphia and Alaska strains of influenza virus. *J. Am. Med. Ass.*, 106, 1936, 890.
17. *Burnet, F. M.*: Influenza virus isolated from an Australian epidemic. *Med. J. Austral.*, 2, 1935, 651.
18. — *Med. J. Austral.*, 2, 1935, 687.
19. *Bijl, J. P. en Domisse, J.*: Over besmetting van fretten met het gorgelwater van griepatiënten. *Ant. v. Leeuwenhoek*, 3, 1936, 165.
20. *Smorodintseff, A. A., Drobyshevskaya, A. S. and Shiskina, O. I.*: On

- the etiology of the 1936 influenza epidemic in Leningrad. *Lancet* 2, 1936, 1383.
21. *Francis, Th.*: Epidemiological studies in influenza. *Am. J. Publ. Health*, 27, 1937, 211.
 22. *Laidlaw, P. P., Wilson Smith, Andrewes, C. H. and Dunkin, G. W.*: Influenza. The preparation of immune sera in horses. *Br. J. Exp. Path.* 16, 1935, 275.
 23. *Francis, Th. and Shope, R.*: Neutralisation tests with sera of convalescent or immunised animals and the viruses of swine and human influenza. *J. Exp. Med.*, 63, 1936, 645.
 24. *Magill, T. P. and Francis, Th.*: Antigenic differences in human influenza virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 35, 1936, 463.
 25. — Antigenic differences in strains of epidemic influenza virus I. Cross-neutralisation tests in mice. *Br. J. Exp. Path.*, 19, '38, 273.
 26. *Francis, Th. and Magill, T. P.*: Antigenic differences in strains of epidemic influenza virus II. Cross-immunisation tests in mice. *Br. J. Exp. Path.*, 19, 1938, 284.
 27. *Burnet, F. M.*: Influenza virus on the developing egg I. Changes associated with the development of an egg-passage strain of virus. *Br. J. Exp. Path.*, 17, 1936, 282.
 28. *Andrewes, C. H.*: Influenza. Four years progress. *Br. Med. J.*, 2, 1937, 513.
 29. *Wilson Smith and Andrewes, C. H.*: Serological races of influenza virus. *Br. J. Exp. Path.* 19, 1938, 293.
 30. *Stuart Harris, C. H., Andrewes, C. H. and Wilson Smith*: A study of epidemic influenza. Medical Research council, London, 1938, 128.
 31. *Hoyle, L. and Fairbrother, R. W.*: Isolation of the influenza virus and the relation of antibodies to infection and immunity. Manchester influenza epidemic of 1937. *Br. Med. J.* 1, 1937, 655.
 32. *Francis, Th., Magill, T. P., Beck, M. D. and Rickard, E. R.*: Studies with human influenza virus during the epidemic of 1936—1937. *J. Am. Med. Ass.*, 109, 1937, 566.
 33. *Dujarric de la Rivière, R. et Chevè, J.*: Le virus grippal du furet; étude de souches françaises de virus grippal. *Ann. Inst. Pasteur*, 59, 1937, 443.
 34. *Francis, Th. and Magill, T. P.*: Direct transmission of human influenza virus to mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 36, 1937, 132.
 35. *Clampit, J. M. and Gordon, T. B.*: Recovery of influenza virus from Chicago epidemic. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 36, 1937, 747.
 36. *Chapman, J. and Hyde, R. R.*: Antigenic differences in viruses from cases of influenza and colds. *Am. J. Hyg.*, 31, B, 1940, 46.
 37. *Stuart-Harris, C. H., Wilson Smith and Andrewes, C. H.*: The influenza epidemic of January—March 1939. *Lancet*, 1, 1940, 205
 38. *Mulder, J.*: The influenza epidemic of January—March 1939 in the garrison at Groningen. *Acta Med. Scand.*, 104, 1940, 481.
 39. *Mulder, J. und Bjälmer, L.*: Die antigenanalyse des in Februar 1939 in Groningen isolierten Influenzavirusstammes. *Arch. ges. Virusforsch.*, 2, 1941, 213.
 40. *Taylor, R. M. and Dreguss, M.*: Influenza virus studies during the 1939 epidemic in Central Europe. *J. Inf. Dis.*, 68, 1941, 79.
 41. *Patocka, Fr.*: Die diesjährige Grippeepidemie. *Tsjech. Aertztebl.* 1939, 875.

42. *Burnet, F. M. and Lush D.*: Influenza virus strains isolated from the Melbourne 1939 epidemic. *Austral. J. Exp. Biol. Med.*, 18, 1940, 49.
43. *Horsfall, F., Hahn, R. G. and Rickard, E. R.*: Four recent influenza epidemics: an experimental study. *J. Clin. Invest.*, 19, 1940, 379.
44. *Francis, Th.*: A new type of virus from epidemic influenza. *Science*, 92, 1940, 405.
— Differentiation of influenza A and B by the complementfixing reaction. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 45, 1940, 861.
45. *Magill, T. P.*: A virus from cases of influenza-like upper respiratory infection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 45, 1940, 162.
Magill, T. P. and Tyndall, M.: Two outbreaks of influenza caused by antigenically different viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 46, 1941, 371.
Magill, T. P.: Repeated attacks of influenza. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 46, 1941, 316.
46. *Martin, A. E. and Fairbrother, R. W.*: An epidemic of apparent influenza. *Lancet* 1939, 2, 1313.
47. *Horsfall, F. L., Lenette, H. E., Rickard, E. R., Andrewes, C. H., Wilson Smith and Stuart Harris, C. H.*: *Lancet*. Oct. 5, 1940, 413.
48. *Dujarric de la Rivière, R.*: Etiologie et prophylaxie de la grippe, Paris, 1929, 63.
49. *Kairies, A.*: Influenza-Studiën an Mäusen unter dem Gesichtspunkt der Infektion und Provokation. *Z. f. Hyg. u. Inf.*, 121, 1939, 749.
50. *Jäschock, H.*: Das epidemische Auftreten der Grippe. *Z. f. Hyg. u. Inf.*, 121, 1939, 276.
51. *Flohn, H.*: Zur Geomedizin der Grippe. *Z. f. Hyg. u. Inf.*, 121, 1939, 588.
52. *Jusatz, H. J.*: Ueber das rhythmische Auftreten der Grippe-Epidemien. *Z. f. Hyg. u. Inf.*, 121, 1939, 185.
53. *Dreguss, M.*: Versuche zum Nachweis des Influenzavirus durch Impfung von Hamstern und Mäusen. *Arch. ges. Virusf.*, 2, 1942, 306.
54. *Taylor, R. M. and Dreguss, M.*: Serial passage of the human influenza virus in the European Hamster. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 43, 1940, 100.
55. *Davoli, R. ed Pardi, E.*: Su una epidemia influenzale comparsa in Firenze nel gennaio e febbraio 1941. *Sperimentale*, 95, 1941, 493, 609.
56. *Dalldorf, G., Whitney, E. and Ruskin, A.*: A controlled clinical test of influenza A vaccine. *J. Am. Med. Ass.*, 116, 1941, 2574.
57. *Mulder, J., Bijlmer, L., Hoek, W.*: The isolation of influenza virus strains during the epidemic of January—February 1941. *Acta Brev. Neerl.*, 11, 1941, 220.

HOOFDSTUK II.

58. *Dunkin, G. W. and Laidlaw, P. P.*: Studies on dog-distemper I. Dog-distemper in the ferret. *J. Comp. Path. Ther.*, 39, 1926, 201.
59. *Topley, J.*: The spread of bacterial infections; some general considerations. *J. of Hyg.*, 21, 1922—1923, 226.
60. *Hare, H.*: The effect of passive immunisation on experimental virus influenza in mice. *J. Path. Bact.*, 49, 1939, 411.

61. *Mulder, J.*: De influenza-epidemie van Februari—Maart 1939 in het garnizoen te Groningen II. (Bacteriologie). Ned. Tschr. Geneesk. 84, 1940, 214.
62. *Eaton, M. D.*: Transmission of epidemic influenza virus in mice by contact. J. of Bact. (Am) 39, 1940, 229.
63. *Smorodintseff, A. A. and Shiskina, O. J.*: The mechanism of acquired immunity against influenza. I. The role of the humoral factor. Arch. ges. Virusf. 2, 1941, 156.
64. *Straub, M.*: The microscopical changes in the lungs of mice infected with influenza virus. J. Path. Bact., 45, 1937, 75.
 - Metaplasia of bronchial epithelium in mice infected with influenza virus. Atti e Comunicazioni IV Congr. int. path. comp. Roma, 1939.
 - The histology of catarrhal influenzal bronchitis and collapse of the lung in mice infected with influenza virus. J. Path. Bact., 50, 1940, 31.
65. *Behr, E. en Hadders, H. N.*: De pathologische anatomie der muizen-influenza. Ned. Tschr. Geneesk., 84, 1940, 3571.
66. *Bieling, R. u. Oelrichs, L.*: Das makroskopische und mikroskopische Bild der Grippe-Pneumonie bei der Maus. Behringwerk-Mitteilungen, Heft 9, 1938, 28.
67. *Nelson, A. A. and Oliphant, J. W.*: Histopathological changes in mice inoculated with influenza virus. Publ. Health Rep. 1939, 2044.
68. *Andrewes, C. H. and Wilson Smith*: Further experiments on the active immunisation of mice. Br. J. Exp. Path., 18, 1937, 43.
69. *Taylor, R. M. and Dreguss, M.*: An experiment in immunization against influenza with a formaldehyde-inactivated virus. Am. J. Hyg., 31, 1940, 31.
70. *Kaiser*: Moderne und einfache Sterilisation im Apotheker-laboratorium durch Entkeimungsfiltration ohne Anwendung von Wärme. Südd. Apoth. Z., 52, 1935.

Eschenbrenner, H.: Ueber einige pharmazeutische Kleinapparaturen zur Keimfreimachung von Lösungen. Pharm. Zng., 6, 1935.
71. *Elford, W. J.*: Principles governing the preparation of membranes having graded porosities. Trans. Farad. Soc. No. 196, 33, 1937, 1094.
72. *Horsfall, F. L.*: A low temperature storage cabinet for viruses. J. of Bact. 40, 1940, 559.
73. *Turner, Th. & Fleming W.*: Prolonged maintenance of spirochetes and filterable viruses in the frozen state. J. Exp. Med., 70, 1939, 629.
74. *Craigie, J.*: A method of drying complement in a frozen state. B. J. Exp. Path., 12, 1931, 75.
75. *Flosdorf, E. W. and Mudd, S.*: An improved procedure and apparatus for preservation of sera, micro-organisms and other substances. The cryochem process. J. Imm. 34, 1938, 469.
76. *Otten, L.*: Trockenlymphe. Zschr. Hyg. Inf. 114, 1933, 705.
77. *Knox, R.*: Desiccation of filterable tumours and other biological materials. J. Path. Bact., 49, 1939, 467.
78. *Greaves, R. and Adair, M.*: High vacuum condensation drying of proteins from the frozen state. J. of Hyg. 39, 1939, 413.
79. *Kaiser, M.*: Die Trockenkonservierung von Virusarten. Arch. ges. Virusf. 1, 1939, 85.

80. *Bijlmer, L. u. Mulder, J.*: Eine einfache und schnelle Methode des Konservierens von Influenza-Virus. Acta Brev. Neerl., 11, 1941, 81.
81. *Ostrovskaya, S. M., Szalkina, O. M. en Olechnowitch, S. B.*: De resistentie van het influenza-virus tegen physische en chemische invloeden. Arch. biol. Nauk., 52, 1938, 19. (Russ., Eng. samenv.) Refer.: Zbl. Hyg., 33, 1939, 118.
82. *Fairbrother, R. W. and Martin, A. E.*: Further observations on the value of heated elementary body suspensions in immunization against experimental influenza. Arch. ges. Virusf., 1, 1939, 114.
83. *Wells, W. F. and Brown, H. W.*: Recovery of influenza virus suspended in air and its destruction by ultraviolet radiation. Am. J. Hyg., 24, 1936, 407.
84. *Stock, C. C. and Francis, Th.*: The inactivation of the virus of epidemic influenza by soaps. J. Exp. Med., 71, 1941, 661.

HOOFDSTUK III.

85. *Francis, Th. and Magill, T. P.*: The incidence of neutralising antibodies for human influenza virus in the serum of human individuals of different ages. J. Exp. Med., 63, 1936, 655.
86. *Taylor, R. H.*: Reactivation of neutralised influenza A virus by dilution. J. Imm., 40, 1941, 373.
87. *Wilson Smith*: The complement-fixation reaction in influenza. Lancet, 1936, 1256.
88. *Fairbrother, R. W. and Hoyle, L.*: Observations on the etiology of influenza. J. Path. Bact., 44, 1937, 213.
89. *Hoyle, L. and Fairbrother, R. W.*: Antigenic structure of influenza viruses; the preparation of elementary body suspensions and the nature of the complement fixing antigen. J. Hyg., 37, 1937, 512.
90. *Lennette, E. H. and Horsfall, F.*: Studies on epidemic influenza virus. The nature and properties of the complement-fixing antigen. J. Exp. Med., 72, 1940, 233.
91. *Bourdillon, J. and Lennette, E.*: Electrophoresis of the complement-fixing antigen of human influenza. J. Exp. Med., 72, 1940, 11.
92. *Rickard, E. R., Lennette, E. H. and Horsfall, F.*: A comprehensive study of influenza in a rural community. Publ. Health Report., 1940, 2146.
93. *Francis, Th.*: Etiological and serological studies in epidemic influenza. Am. J. Publ. Health, 27, 1937, 1141.
94. *Belikov, P. F.*: The complement fixation test as an index of immunity against grippe. Arch. Biol. Nauk., 1940, 44. (Eng. samenv.) Refer.: Zbl. Hyg., 48, 1941, 210.
95. *Hoyle, L. and Fairbrother, R. W.*: Further studies of complement fixation in influenza: antigen production in egg-membrane culture and the occurrence of a zone phenomenon. Br. J. Exp. Path. 18, 1937, 425.
96. *Magill, T. P. and Francis, Th.*: A flocculation phenomenon with human sera and suspensions of the virus of epidemic influenza. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 39, 1938, 81.
97. *Henle, W. and Chambers, L.*: The serological activity of extra embryonic fluids of chick infected with virus of influenza A. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 46, 1941, 713.

HOOFDSTUK VI.

98. *Wilson Smith, Andrewes, C. H. and Laidlaw, P. P.*: Influenza. Experiments on the immunisation of ferrets and mice. *Br. J. Exp. Path.*, 16, 1935, 291.
99. *Francis, Th. and Magill, T. P.*: The immunology of epidemic influenza. *Am. J. Hyg.*, 28, 1938, 63.
100. *Francis, Th.*: Quantitative relationships between the immunizing dose of epidemic influenza virus and the resultant immunity. *J. Exp. Med.*, 69, 1939, 283.
101. *Burnet, F. M.*: Influenza virus on the developing egg IV. The pathogenicity and immunizing power of egg virus for ferrets and mice. *Br. J. Exp. Path.* 18, 1937, 37.
102. *Horsfall, F. L. and Lennette, E. H.*: A new complex influenza vaccine. *J. Am. Med. Ass.*, 116, 143, 1941.
103. *Shope, R.*: Immunisation experiments with swine influenza virus. *J. Exp. Med.*, 64, 1936, 47.
104. *Andrewes, C. H. and Wilson Smith*: The effect of foreign tissue extracts on the efficacy of influenza virus vaccines. *Br. J. Exp. Path.*, 20, 1939, 305.
105. *Laidlaw, P. P. and Dunkin, G. W.*: Studies in dog-distemper X. *J. Comp. Path. Ther.* 41, 1, 209, 1928.
106. *Rickard, E. R. and Francis, Th.*: The demonstration of lesions and virus in the lungs of mice receiving large intraperitoneal inoculations of epidemic influenza virus. *J. Exp. Med.*, 67, 1938, 953.
107. *Hoven van Genderen, J. van der*: *Meded. Inst. Praev. Geneesk.*, 1938—1939.
108. *Hare, R.*: Active immunity to influenza virus in the mouse. *J. Imm.*, 40, 1941, 267.
109. *Eaton, M. D.*: Experimental immunity of mice with the virus of epidemic influenza. Quantitative studies on the antigenicity of active and inactive virus. *J. Imm.*, 39, 1940, 43.
110. *Fairbrother, R. W. and Hoyle, L.*: Active immunity against experimental influenza. The use of heat killed elementary body suspensions. *Br. J. Exp. Path.*, 18, 1937, 430.
111. *Magill, T. P. and Francis, Th.*: Studies with human influenza-virus cultivated in artificial medium. *J. Exp. Med.*, 63, 1936, 803.
112. *Burnet, F. M.*: The specificity of acute immunity in mice against influenza virus. *Br. J. Exp. Path.*, 19, 1938, 388.
113. *Francis, Th. and Magill, T. P.*: The antibody response of human subjects, vaccinated with the virus of human influenza. *J. Exp. Med.*, 65, 1937, 251.
114. *Chenoweth, A., Waltz, A. D., Stokes, J. and Gladen, R. G.*: Active immunisation with the viruses of human and swine influenza. *Am. J. Dis. Children.*, 52, 1936, 757.
115. *Smorodintseff, A. A., Tushinsky, A. M., Drobyshevskaya, A., Korovin, A. and Osetroff, A.*: Investigation on volunteers infected with the influenza virus. *A. J. Med. Sc.*, 194, 1937, 159.
116. *Chalkina, O. M.*: Immunologische bloedveranderingen bij met influenza-virus gevaccineerde menschen. *Arch. Biol. Nauk.*, 52, 1938, 126. (Russ., Eng. samenv.) Refer.: *Zbl. Hyg.*, 44, 1939, 117.

117. *Burnet, F. M. and Lush, D.*: Influenza virus on the developing egg VII. The antibodies of experimental and human sera. *Br. J. Exp. Path.*, 19, 1938, 17.
118. *Francis, Th.*: Intranasal inoculation of human individuals with the virus of epidemic influenza. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 43, 1940, 337.
119. *McGuire, L. W. and Redden, W. E.*: Treatment of influenzal pneumonia by the use of convalescent human sera. *J. Am. Med. Ass.*, 72, 1919, 709.
120. *Béclère, A.*: La sérumthérapie antigrippale. *Presse médicale*, 1938, 1385.
121. *Hare, R.*: Two cases of influenzal pneumonia treated by injection of convalescent serum. *Lancet*, 1933, 2, 293.
122. *Smorodintseff, A., Gulamoff and Chalkina, O. M.*: Spezifische Prophylaxe der epidemischen Grippe. *Zschr. Klin. Med.*, 138, 1940, 756.
123. *Dreguss, M. und Hoffmann, F.*: Hyperimmunisierung der Schweine mit menschlichem influenzavirus. *Zbl. f. Bakt., Orig.*, 146, 1941, 310.
124. *Dujarric de la Rivière, R. et Chevè, J.*: Préparation et titrage d'un sérum antigrippal. *Bull. Méd. Paris*, III, 124, 1941, 393.
125. *Davoli, R.*: Immunsérum contre le virus grippal préparé sur la brebis. *Boll. Soc. Int. Micr. Sez. Ital.* 13, 1941, 62.
126. *Smorodintseff, A. and Ostrovskaya, S.*: The distribution of influenza virus in experimentally infected mice. *J. Path. Bact.*, 44, 1937 559.
127. *Lépine, P.*: Les anticorps tissulaires dans les infections à virus. *Arch. ges. Virusf.*, 2, 1942, 406.
128. *Smorodintseff, A. and Shiskina, O. I.*: The mechanism of aquired immunity against influenza II. The role of the phagocytic apparatus. *Arch. ges. Virusf.*, 2, 1941, 175.
129. *Francis, Th. and Stuart Harris, C. H.*: Studies on the nasal histology of epidemic influenza virus infection in the ferret. I, II, III. *J. Exp. Med.* 68, 1938, 789.
130. *Francis, Th.*: The inactivation of epidemic influenza virus by nasal secretions of human individuals. *Science*, 91, 1940, 198.
131. *Burnet, F. M., Lush, D. and Jackson, A. V.*: A virus-inactivating agent from human nasal secretion. *Br. J. Exp. Path.*, 20, 1939, 377.
132. *Traub, E.*: An epidemic in a mouse colony due to the virus of acute lymphocytic choriomeningitis. *J. Exp. Med.* 63, 1936, 533.
133. *Theiler, M.*: Spontaneous encephalomyelitis in mice, a new virus disease. *J. Exp. Med.*, 65, 1937, 705.
134. *Findeisen, W.*: Ueber das Absetzen kleiner, in der Luft suspendierten Teilchen. *Pflügers Archiv.*, 236, 1935, 365.

HOOFDSTUK VII.

135. *Kolk, H. J.*: Behandeling met chloras kalicus van de ziekte van Heine-Medin. *Ned. Tsch. Geneesk.*, 84, 1940, 388.
136. *Climenko, D. R., Crossley, M. L. and Northey, E. H.*: The protective action of certain sulfanilamide derivates in experimental influenza infections. *J. Am. Med. Ass.*, 110, 1938, 2099.
137. *Wilson Smith*: The action of bile salts on viruses. *J. Path. Bact.*, 48, 1939, 557.

ERRATA.

blz. 92, regel 25 : fig. 18, lees : fig. 16.

blz. 127, tabel 21, b. Voor de titerverhoudingen 1, $\frac{1}{25}$, $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{25}$
lees : 1, $\frac{1}{25}$?, $\frac{1}{5}$?, $< \frac{1}{25}$.

blz. 148, tabel 26. Voor konijn 31 WS lees : konijn 31 WS 17-6-1940.

blz. 149, regel 3. Voor $\frac{1}{125}$ lees : $\frac{1}{250}$.

blz. 150, tabel 28 en tabel 29. Voor konijn 100 WS lees : konijn 100 WS 24-10-1940.