

MEDEDEELINGEN UIT HET INSTITUUT  
VOOR PRAEVENTIEVE GENEESKUNDE  
1934

LEIDEN  
BOERHAAVESTRAAT 19—22



INSTITUUT VOOR PRAEVENTIEVE GENEESKUNDE.  
BESCHERMVROUWE H.M. DE KONINGIN.

---

BESTUUR.

*Dagelijksch Bestuur:*

Dr. N. M. JOSEPHUS JITTA, Voorzitter van den Gezondheidsraad, *Voorzitter*.

Prof. Dr. S. T. BOK, *Secretaris*.

J. J. HAVER DROEZE, *Penningmeester*.

Prof. Dr. E. GORTER.

Mr. L. LIETAERT PEERBOLTE, Directeur-Generaal van de Volksgezondheid.

Prof. Dr. G. J. W. KOOLEMANS BEYNEN, namens de Ned. Ver. „Het Roode Kruis”.

Ds. J. BEIJERMAN, namens de Ned. Ver. „Het Groene Kruis”.

Prof. Dr. J. M. BAART DE LA FAILLE, namens de Medische Faculteit te Utrecht.

[REDACTED] namens de Ned. Ver. „Het Wit-gele Kruis”.

Dr. J. SIEGENBEEK VAN HEUKELOM.

Prof. Dr. J. VAN DER HOEVE, namens de Medische Faculteit te Leiden.

Prof. Dr. A. KLEIN, namens de Medische Faculteit te Groningen.

Mr. P. W. J. H. CORT VAN DER LINDEN.

Prof. Dr. J. J. VAN LOGHEM, namens de Medische Faculteit te Amsterdam.

Dr. M. NIEMEYER.

Prof. Dr. A. K. M. NOYONS.

Prof. Dr. H. C. RÜMKE.

Prof. Dr. E. P. SNIJDERS.

*Directeur.*

J. P. BIJL, *arts*.



## I N H O U D

	Bladz.
N. M. JOSEPHUS JITTA, Voorwoord. . . . .	V
J. P. BIJL, Verslag van de werkzaamheden over het jaar 1934 . . . . .	VII
A. T. VAN DER SCHAAF, Over den invloed der geassocieerde kiemen op den aard der vaccine-reactie . . . .	1
A. T. VAN DER SCHAAF, Over een serum tegen hondenziekte	34
A. T. VAN DER SCHAAF, Post-infectieuze encephalitis bij den hond . . . . .	42
J. P. BIJL en A. T. VAN DER SCHAAF, Herpes-encephalitis-virus als verwekker van stomatitis . . . . .	51
GERHARD ELKELES, Experimentelle Untersuchungen zur Aetiologie der influenza . . . . .	60
H. D. BOER en J. P. BIJL, De reactie van Pirquet bij 3000 personen . . . . .	80
H. D. BOER, Onderzoek naar het voorkomen van levende tuberkelbacillen in gepasteuriseerde flesschenmelk . .	90
H. D. BOER, Onderzoek naar het voorkomen van levende tuberkelbacillen in boter. . . . .	105
H. D. BOER, Activeering van den filtreerbaren vorm van den tuberkelbacil door acetonextract van tuberkelbacillen	108
H. D. BOER en R. STOOP, Activeering van den filtreer- baren vorm van den tuberkelbacil . . . . .	117
L. DE KROMME, Heterophiel antigeen in carcinoomweefsel	127



## VOORWOORD

Het Instituut voor Praeventieve Geneeskunde ontleent reeds zijn beteekenis aan zijn naam. Immers de tegenwoordige wetenschap legt zich meer op het voorkómen van ziekte toe dan op het genezen. Daar waar een goede praeventie bestaat, treedt van zelf het behandelen meer op den achtergrond, al zal dit natuurlijk steeds zijn waarde behouden. Tal van voorbeelden o.a. ontleend aan de bestrijding van besmettelijke ziekten bewijzen hoe onheil voorkomen kan worden, en het streven in die richting wordt meer en meer met succes bekroond.

In moeilijke en reeds zorgelijke jaren opgericht, heeft het Instituut zich niet alleen weten staande te houden, maar is in zijn ontwikkeling en beteekenis niet onbelangrijk vooruit gegaan. Dit toont het verslag aan, dat hierbij aangeboden wordt, dit toonen ook de bijlagen waarmede het vergezeld gaat en die getuigenis afleggen van den ijver en den wetenschappelijken zin van den Directeur en van hen, die hem ter zijde staan.

Het Bestuur heeft zeker reden zich te verheugen in de stijgende belangstelling, die het van de beoefenaars der geneeskunde ondervindt en zou de toekomst met gerustheid tegemoet zien, ware het niet, dat het voortdurend met financieele zorgen te kampen heeft.

Ongetwijfeld hebben velen uit allerlei kringen het Instituut gesteund, ongetwijfeld zijn er niet weinigen, die hun eerste toezegging getrouw gebleven zijn, maar dit is helaas lang niet voldoende om aan eenvoudige en waarlijk niet overdreven eischen te voldoen.

Bedoeld wordt hiermede dan ook niet, dat de laboratorium-ruimten, die alles te wenschen overlaten verbeterd moeten worden. Dat is een zorg voor de toekomst.

Werken kan men ten slotte overal en PASTEUR heeft zijn eerste baanbrekende ontdekkingen gedaan in een eenvoudig



vertrek, door hem zoo goed als het kon tot laboratorium ingericht. Bedoeld wordt, dat het Instituut zich niet kan ontplooien zooals wenschelijk is als krachtige steun achterwege blijft.

Men moge mij verwijten, dat ik van het verschijnen van dezen bundel gebruik maak om een noodkreet te doen hooren, het zij zoo, want het is de bittere waarheid, dat het Instituut door finantieele zorgen in zijn ontwikkeling geremd wordt en juist in deze tijden kan de arbeid, die het te verrichten heeft zoo nuttig en zoo heilzaam zijn!

N. M. JOSEPHUS JITTA.

---



## VERSLAG VAN DE WERKZAAMHEDEN VAN HET INSTITUUT VOOR PRAEVENTIEVE GENEESKUNDE OVER HET JAAR 1934

---

Volgens art. 2 van de statuten van het Instituut voor Praeventieve Geneeskunde tracht de stichting haar doel, de bevordering van de studie der praeventieve geneeskunde in geheel Nederland, voornamelijk op drieërlei wijzen te bereiken: ten eerste door de bestudeering van nieuwe vraagstukken der praeventieve geneeskunde, ten tweede door de toepassing van de wijzen van voorkòmen van ziekten, ten derde door het geven van onderwijs.

Ook het Instituut voor Praeventieve Geneeskunde had in 1934 met vele moeilijkheden te kampen. De geldmiddelen lieten niet toe allerlei onderzoekingen, die noodig geoordeeld werden, te verrichten, terwijl het gebouwencomplex, waarin de verschillende laboratoria gevestigd zijn, zeer sterk en wel in ongunstigen zin afsteekt bij de werkgelegenheden, die men tegenwoordig wenschelijk of noodig oordeelt. Door van de nood een deugd te maken, bleek het toch mogelijk de talrijke groote en kleine, min of meer geïsoleerde localiteiten dienstbaar te maken aan onderzoekingen, vooral aan virus-onderzoek. Bij de studie van virusziekten toch is men aangewezen op infectieproeven. De oude uitgewoonde kamers en kamertjes over 3 gebouwen verdeeld, gaven ruimschoots gelegenheid de besmette proefdieren te isoleren, zonder ernstig gevaar, dat zij elkander op ongewenschte wijze zouden infecteeren.

Desondanks zijn de bezwaren aan de gebouwen van dien aard, dat spoedig naar betere localiteiten omgezien zal moeten worden. Niet alleen zijn de eigenlijke laboratoriumruimten hoogst primitief, maar door de voortdurende defecten aan



waterleiding, electrische geleidingen enz., door de afwezigheid van centrale verwarming, door de ondoelmatige indeeling der vertrekken enz. enz. zijn de kosten van onderhoud en bedrijf bijzonder hoog.

Het gebrek aan geldmiddelen maakt verder, dat het personeel zich met een zeer geringe salarieering tevreden moet stellen en dat niet zooveel personeel aangesteld kan worden als in het belang van den dienst wenschelijk zou zijn.

Mede dank zij de vrijwillige medewerking van eenige artsen en analysten was het toch mogelijk een aantal onderzoekingen te verrichten.

In de laboratoria van het Instituut worden onder leiding van Dr. J. VAN NIEKERK, voor Philips-van Houten onderzoekingen over vitamines verricht.

De geldmiddelen laten niet toe de bibliotheek van het Instituut op de hoogte van den tijd te houden. In deze leemte wordt zooveel mogelijk voorzien doordat sommige medewerkers een deel van hun particuliere bibliotheek in bruikleen hebben afgestaan en door het aanvragen van overdrukjes en jaarverslagen betrekking hebbende op praeventieve geneeskunde. Met een woord van dank vermelden wij, dat de Bibliothecaris van de Universiteits-bibliotheek wekelijks een portefeuille met tijdschriften ter lezing beschikbaar stelt.

Aangezien de taak van het Instituut het geheele gebied der praeventieve geneeskunde omvat, is het van beteekenis, dat vooraanstaande personen, die op hygienisch en prophylactisch terrein werkzaam zijn, als lid van het Bestuur of van den Raad van advies contact hebben met het Instituut. Om dezelfde reden is het van belang, dat het Instituut vertegenwoordigd is in het Bestuur van andere Vereenigingen, die een dergelijk doel nastreven en dat de Directeur vergaderingen over praeventief geneeskundige onderwerpen bijwoont.

In 1933 heeft ondergeteekende aan de oprichting van de Nederlandsche vereeniging voor sociale tandheelkunde medegewerkt en werd hij tot Bestuurslid dier vereeniging gekozen.

In Maart woonde ondergeteekende te Parijs de oprichtingsvergadering bij van de „Union internationale contre le cancer”



en hij werd daarna aangewezen als vertegenwoordiger van het Instituut in den „Conseil de Direction”.

Ondergeteekende werd aangewezen als vertegenwoordiger van het Instituut in den Raad van Beheer van de Stichting Biophysica. Verder werd hij benoemd tot bestuurslid van „het Ivoren Kruis” en van de Leidsche analysten-cursus en vertegenwoordigt hij het Instituut in de, door het Instituut voor Volkshuisvesting en het Instituut voor Praeventieve Geneeskunde opgerichte z.g.n. „Zonnecommissie.”

Op het in September te Warschaw gehouden internationale tuberculose-congres was het Instituut door den Directeur vertegenwoordigd.

Den 27 October werd te Utrecht onder voorzitterschap van den Voorzitter van het Bestuur de eerste Praeventieve Geneeskunde dag gehouden, die door een vijftigtal belangstellenden werd bijgewoond en waar voordrachten gehouden werden over de, in de laboratoria van het Instituut verrichte onderzoekingen.

#### PERSONEEL.

Bij het Instituut waren in 1934 werkzaam:

J. P. BIJL, arts, directeur.

Mej. A. BOSSCHIETER, secretaresse.

A. T. VAN DER SCHAAF, dierenarts, werkzaam in het virus-laboratorium.

Dr. J. R. DE BRUÏNE GROENEVELDT, arts, werkzaam in het kankerlaboratorium.

Dr. H. D. BOER, arts, werkzaam in het tuberculoselaboratorium.

Dr. G. ELKELES, werkzaam in het viruslaboratorium.

Dr. D. WIERSMA, leider van het consultatiebureau voor beroepskeuze.

L. DE KROMME, med. en chem. cand., werkzaam in het kankerlaboratorium.

Jkvr. J. W. E. v. D. DOES DE BYE, analyste.

Mej. C. H. GEURS, analyste.

Mej. E. PEL, analyste.

G. VAN TUYL, bediende.



W. ROMAN, bediende.  
 A. JANSSEN, bediende.  
 C. SNIEDERS, bediende.

Verder heeft het Instituut een groot aantal deskundigen bereid gevonden cursussen te geven over praeventieve geneeskunde, uitgaande van het Instituut.

## I. ONDERZOEKINGEN.

In het viruslaboratorium werden de volgende onderzoeken verricht.

A. T. v. D. SCHAAF onderzocht den invloed van geassocieerde kiemen op den aard der vaccinereactie.

De heer v. D. SCHAAF verrichtte onderzoeken over hondenziekte. In de eerste plaats bestudeerde hij de immuniteit bij deze ziekte t.o.v. Hollandsch en Engelsch virus en bereidde daarbij een serum, dat in het eerste stadium der ziekte therapeutisch werkt. In de tweede plaats onderzocht hij de encephalitis, die na de ziekte van CARRÉ soms optreedt.

Tezamen met den heer BIJL verrichtte de heer v. D. SCHAAF onderzoeken over epidemisch voorkomende stomatitis bij kinderen.

Een onderzoek over actieve immunisatie tegen virusziekten werd door de Heeren BIJL en VAN DER SCHAAF begonnen en zal in 1935 voortgezet worden.

Dr. G. ELKELES verrichtte een experimenteel onderzoek met het griepvirus van WILSON SMITH, ANDREWES en LAIDLAW.

In de tuberculoseafdeeling werden de volgende onderzoeken verricht.

BOER en BIJL onderzochten het weerstandsvermogen van cavia's t.o.v. besmetting met tuberkelbacillen per os.

BOER en BIJL verrichtten verder een onderzoek over allergie bij tuberculose, welk onderzoek in 1935 voortgezet wordt.

Ten slotte stelden zij een onderzoek in naar de immuniteit tegen tuberculose bij volwassenen, voorzoover daartoe uit de reactie van PIRQUET is te besluiten.

Dr. BOER verrichtte onderzoeken over het voorkomen van tuberkelbacillen in boter en in gepasteuriseerde melk.



Dr. BOER stelde een bacteriologisch onderzoek in bij de schoolbesmetting met tuberculose te Ee.

Ten slotte werd door Dr. H. D. BOER in samenwerking met Dr. STROOP een onderzoek ingesteld naar de activeerende werking van acetonextract op filtraten van tuberculeuse organen en van tuberkelbacillen.

In het carcinoomlaboratorium verrichtte de Heer DE KROMME een reeks onderzoekingen over het voorkomen van heterophiel antigeen in carcinoomweefsel.

Verder onderzocht hij sera en urines op de aanwezigheid van een dergelijk antigeen.

## II. TOEPASSING VAN DE WIJZEN VAN VOORKOMEN VAN ZIEKTEN.

Toepassing op groote schaal van praeventief geneeskundige methoden vond in 1934 niet plaats. Van de gelegenheid om ingeënt te worden tegen pokken of diphtherie werd zoo nu en dan gebruik gemaakt.

In 1934 werd het consultatiebureau voor beroepskeuze onder leiding van Dr. D. WIERSTMA geopend. 60 consulten aan 20 personen werden gegeven. Zeer ten onrechte schijnt de meening te heerschen, dat, nu door de crisis de kans om werk te krijgen zeer gering is, het raadplegen van een consultatiebureau weinig zin heeft.

Ten einde te komen tot de oprichting van bureaux voor periodieke keuringen heeft ondergeteekende daarover een artikel geschreven in „De Levensverzekering”. Ook wat de verwezenlijking van dit plan betreft zijn de tijden niet gunstig.

Indirect heeft het Instituut de toepassing der praeventie van ziekten bevorderd door gastvrijheid te verleen aan een aantal consultatiebureaux.

## III. ONDERWIJS, PUBLICATIES ENZ.

Maandelijks worden in het Instituut wetenschappelijke bijeenkomsten gehouden, die gewoonlijk door 15 à 20 belangstellenden worden bijgewoond.



In 1934 mochten wij de volgende sprekers bereid vinden een voordracht te houden.

Dr. A. POT, Bacterioloog bij het Centraal laboratorium voor de Volksgezondheid, over: „Paratyphus”.

L. DE KROMME, Bioloog bij het Instituut voor Praeventieve Geneeskunde, over: „Lysinen, agglutininen en praecipitinen bij carcinoom”.

Dr. H. W. JULIUS, Conservator bij de Gezondheidsleer te Utrecht, over: „Weefselcultures en Bacteriologie”.

Dr. G. ELKELES, Bacterioloog bij het Instituut voor Praeventieve Geneeskunde over: „Psittacosis”.

Dr. W. A. L. DEKKER, Conservator bij de Medische Chemie te Leiden, over: „Colloïd chemische beschouwingen over immuniteitsreacties”.

Dr. M. VAN EKELEN, Assistent bij de Hygiëne te Utrecht, over: „Vitamine A en -C.”

Dr. H. J. VAN NEDERVEEN, Dierenarts te 's-Gravenhage, over: „Melkhygiëne in Amerika”.

Dr. J. H. O. REYS, Privaat Docent aan de Universiteit te Leiden, over: „Sport en Praeventieve Geneeskunde”.

Aan de Volksuniversiteit te Utrecht werd een cursus over Praeventieve Geneeskunde gegeven door:

J. P. BIJL: Praeventieve Geneeskunde op verschillende leeftijden.

J. P. BIJL: Praeventieve Geneeskunde en Maatschappelijk hulpbetoon.

Dr. D. WIERSMA: Praeventieve Geneeskunde en beroepskeuze.

Dr. D. WIERSMA: Praeventieve Geneeskunde en zenuwziekten.

A. T. V. D. SCHAAF: Praeventieve Geneeskunde en huisdieren.

L. DE KROMME: Praeventieve Geneeskunde en kanker.

Te Sneek werd vanwege het Instituut een artsencursus over Kindergeneeskunde gegeven, waar Dr. J. MUNK en Prof. Dr. E. GORTER te Leiden ieder 2 voordrachten hielden. De cursus wordt in 1935 voortgezet.

Verder werden door medewerkers van het Instituut ver-



schillende voordrachten over een of ander praeventief geneeskundig onderwerp gehouden.

De volgende publicaties van medewerkers zagen het licht:  
H. D. BOER: Activation de la forme filtrable du Bacille tuberculeux par l'extrait acetonique de Bacilles de KOCH. (Comptes rendues soc. biol. 1934. 24 Nov.).

H. D. BOER: Levende tuberkelbacillen in gepasteuriseerde flesschenmelk en boter (Ned. Weekbl. v. Zuivelbereiding enz. 4 Dec. '34).

J. P. BIJL: Moderne krankzinnigenzorg; beschouwingen over praeventieve Psychiatrie (Haagsch Maandblad 1934 No. 1).

J. P. BIJL en H. PEETERS: Der Typhus im Niederländischen Heer während des mobilen Zustandes in den Jahren 1914—1918. (Veröff. a. d. Geb. d. Medizinalverwaltung XLIII H. 3).

J. P. BIJL: De 2de conferentie van de internationale vereeniging voor geographische pathologie. (Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1934, 4111).

J. P. BIJL: Over de beteekenis van de praeventieve geneeskunde voor de Nederlandsche Levensverzekering Maatschappijen (De Levensverzekering Oct. 1934).

A. T. v. D. SCHAAF: Opinions récentes au sujet de la maladie du jeune age du chien. (Congres cynologique).

Geregeld werden mededeelingen van algemeen belang aan de dagbladpers verstrekt.

De Directeur,  
J. P. BIJL.



# OVER DEN INVLOED DER GEASSOCIEERDE KIEMEN OP DEN AARD DER VACCINE-REACTIE

DOOR

A. T. VAN DER SCHAAF,  
dierenarts

---

## *Inleiding.*

Sedert een aantal jaren heeft het optreden der postvaccinale encephalitis de, reeds een eeuw als ongevaarlijk te boek staande inenting tegen pokken, in discrediet gebracht. Daarnaast wordt medegedeeld, dat de rustige „mooie” vaccinepuisten van vroeger tegenwoordig zelden meer voorkomen. Men is gaan twifelen aan de kwaliteit der tegenwoordige koepokstof en op allerlei wijzen heeft men getracht de hoedanigheid te verbeteren. In de eerste plaats werd geprobeerd de vaccine zoo zuiver mogelijk, zooveel mogelijk bevrijd van allerlei micro-organismen, te verkrijgen. De methoden, waarlangs men een zoo steriel mogelijke vaccine trachtte te bereiden, zijn bekend, en behoeven niet genoemd te worden.

De vermindering van de verontreinigende kiemen heeft evenwel niet een vermindering van het aantal encephalitis-gevallen gebracht, ook niet een vaccinepuist, die aan de pustels uit vroegeren tijd herinnert. Volgens THOMPSON en BUCHBINDER zal een dermovaccine, die encephalitogeen is voor het konijn, meerdere kans geven op postvaccinale encephalitis bij kinderen dan een niet-encephalitogene. Zeer sterk encephalitogeen is de bacteriologisch steriele neurolapine. Deze entstof geeft ook bij inenting een andere huidreactie dan dermovaccine. Het verschil in de reactie tusschen dermo- en neurovaccine is nauwkeurig beschreven bij proeven op konijnen. In het kort zijn deze verschillen als volgt:



Cerebrale enting met neurovaccine geeft bij het konijn steeds een overentbare encephalitis, enting met dermovaccine geeft soms wel, soms geen overentbare encephalitis. Cutane enting met dermovaccine geeft een typische pokpuist, die zelden tot generalisatie aanleiding geeft. Enting met neurovaccine geeft een pustel, die weldra haemorrhagisch wordt, en necrose doet ontstaan. Er vormt zich veelal een zeer sterk subcutaan oedeem, vaccinia generalisata treedt op. Een groot percentage der dieren sterven onder verschijnselen van cachexie. Merkwaardig is verder, dat na intradermale inspuiting van neurolapine de huidreactie minder snel optreedt dan na inspuiting van dermovaccine en, dat ook de maximale reactie later bereikt wordt. De verdunningsvirulentie is, in het algemeen, van neurovaccine grooter dan van dermovaccine.

Waarop berust het verschil tusschen neurovaccine en dermovaccine?

Aan een verschil tusschen deze twee entstoffen valt niet te twifelen. Meerder hypothesen zijn opgesteld om dit verschil te verklaren. Door de konijnenpassages zou het virus een veranderde virulentie voor het konijn gekregen hebben; door de hersenpassages zou het neurotroop geworden zijn; het zou een zeer virulent-geworden stam zijn; het zou een gewijzigde stam zijn.

Een van de voornaamste verschillen tusschen, in de oppervlakkige huidlagen gegroeide dermovaccine en, in de inwendige organen gevormde neurolapine en testilapine is de bacteriologische steriliteit van de laatsten in scherp contrast met de groote hoeveelheid staphylococcen, die zich tegelijk met de dermovaccine in de huid ontwikkelen. Juist dit belangrijke verschilpunt heeft men vrijwel buiten beschouwing gelaten. Alleen Dr. C. D. CRAMER brengt in zijn theoretische beschouwingen dit verschilpunt ook naar voren.

Zou de steriliteit, die men zoo ijverig heeft nagestreefd, misschien de oorzaak zijn van de ongewenschte huidreacties, die men tegenwoordig ziet; zou misschien zelfs de encephalitis verband houden met die vermindering van het aantal kiemen?



De vraag leek mij belangrijk genoeg om er een opzettelijk onderzoek naar in te stellen.

*Eigen onderzoek:*

Onderzocht heb ik drie soorten vaccine-virus en wel:

- a. de Leidsche vaccine van Prof. GORTER (stam DE JONG).
- b. een dermovaccinestam Amsterdam.
- c. neurolapine gekweekt uit de Amsterdamsche vaccine.

De uitkomsten waren als volgt:

a. *de Leidsche vaccine.*

Deze vaccine is een dermovaccine, die op de huid zeer „rustige” pokken geeft. Over de vraag of deze stof tot encephalitis aanleiding gegeven heeft, is men het niet eens.

Aantal bacteriën per gram, na verblijf van 4 weken in de ijskast: meer dan honderdduizend.

Virulentie volgens GROTH:  $\frac{1}{50000}$ .

Encephalitogene eigenschappen in konijnenproef: Talrijke onderzoeken hebben alle tot een negatief resultaat geleid.

Cutane enting van konijnen: rustige pokken, geen haemorrhagische factor, geen generalisatie, geen oedeemvorming. De maximale locale reactie trad na vier dagen op.

b. *Amsterdamsche vaccine stam No. X.*

Dermovaccine, die op de huid van kinderen een flinke reactie geeft. De oogst heeft tot drie gevallen van encephalitis post-vaccinalis aanleiding gegeven.

Aantal bacteriën per gram  $\pm 1000$ , hoofdzakelijk staphylococcus aureus en albus.

Virulentie volgens GROTH is  $\frac{1}{10000}$ .

Encephalitogene eigenschappen in de konijnenproef: van drie intra-cerebraal ingespoten konijnen kregen twee encephalitis. Een dezer twee konijnen stierf zes dagen na infectie; in de hersenen kon een groote hoeveelheid vaccinevirus worden aangetoond; bacteriën waren niet aanwezig.

c. *Neurolapine, gekweekt uit Amsterdamsche vaccine.*

Door eenige hersenpassages was de bovengenoemde dermo-



vaccine geheel veranderd in een neurolapine. Aantal bacteriën is 0, encephalitogene eigenschappen in de konijnenproef is 100 %, virulentie volgens GROTH  $1/500000$ .

Cutane enting van konijnen geeft de typische, reeds beschreven reactie. In mijn proeven trad de maximale, locale reactie na zeven tot acht dagen op.

#### *Bacterie-gehalte en aard der reactie.*

Het blijkt dus, dat er een sterk verschil bestaat in den aard der huidreacties. Dit verschil is niet alleen van kwantitatieve, maar ook van kwalitatieven aard. Zeer opvallend is, dat de maximale, locale huidreactie bij het konijn na enting met Leidsche stof na vier dagen optreedt, na enting met neurovaccine na zeven tot acht dagen. Dit verschil is niet een gevolg van verschil in verdunningsvirulentie, zooals in de gevallen van PIRQUET, die vond, dat bij kinderen verdunning der entstof de opkomst der pokken vertraagde.

Belangrijk is verder het verschil in encephalitogene eigenschappen in de konijnenproef. De Leidsche vaccine is niet encephalitogeen, neurovaccine is 100 % encephalitogeen. Daartusschen staat Amsterdamsche vaccine No. X.

Wat het bacteriegehalte aangaat, bevat de Leidsche stof zeer veel bacteriën, neurovaccine is steriel. Daartusschen staat Amsterdamsche vaccine No. X.

#### *Oorzaak van verschil in bacteriegehalte.*

Onwillekeurig vraagt men zich af, of er verband bestaat tusschen dit verschil in bacteriegehalte en verschil in eigenschappen. Van beteekenis is het dus om eerst na te gaan, wat de oorzaak is van het verschil in bacteriegehalte, speciaal tusschen de Amsterdamsche en de Leidsche stof. Aan een verontreiniging door onzindelijk werken valt natuurlijk niet te denken. Ook invloed van bacteriëndoodende chemicaliën (chinosol e. d.) kan niet de oorzaak zijn. Zij moet m. i. gezocht worden in de wijze, waarop de entstof bij het kalf gewonnen wordt.

Eenige verschillen zijn:

a. leeftijd der kalveren.



*b. hoedanigheid der kalveren.*

*c. plaats der enting.*

*d. stof, waarmee geënt wordt.*

*a. leeftijd der kalveren.* De Amsterdamsche koepokinrichting gebruikt voor de bereiding van vaccine, kalveren van drie tot vier maanden oud; in Leiden is de leeftijd der dieren hoogstens twee maand, meestal vijf tot zes weken.

*b. hoedanigheid der kalveren.* Amsterdam eischt kalveren, die enkel met melk zijn gevoed; het resultaat is, dat de slager z.g. vette melkkalveren levert. Leiden betreft haar entkalveren van modelboerderijen; deze dieren krijgen een natuurlijke, gemengde voeding.

Reeds meer dan honderd jaar geleden was bekend, dat personen met veel subcutaan vetweefsel meer gevaar liepen heftig ziek te worden door de variolatie, dan individuen met een normale voedingstoestand. (H. RANQUE; *Theorie et pratique de l'inoculation de la vaccine*, anno 1801). Dikke personen reageeren over het algemeen langzamer, maar heviger op een koepokinenting (Dr. C. KLING.); het zelfde heb ik persoonlijk waargenomen bij konijnen.

*c. plaats der enting.* In Amsterdam wordt de flank benut als entveld, in Leiden de meer soepele huid der buik en de binnenkant der dijen. Door de hogere temperatuur (betere circulatie en mindere afkoeling) zou het proces op de buikhuid iets sneller kunnen verlopen dan op de flank.

*d. De hoeveelheid bacterien.* Bovengenoemde drie factoren werken samen om een verandering der vaccinereactie tot stand te brengen. In Amsterdam krijgt men vijf dagen na enting kleine blaasjes met een bijna helderen inhoud, in Leiden grootere en grijzere pokken (eigen waarneming).

De staphylococcen kunnen zich bij hogere temperatuur in vochtige omgeving, zooals men die aantreft op de buikhuid, veel beter vermenigvuldigen dan op de koelere en droge flank. In de literatuur vind men vermeld, dat in het troebel geworden vaccineblaasje steeds etterverwekkers worden aangetroffen, nadat het epitheel onder invloed van de leucocyten-fermenten verweekt is. De in een vroeg stadium van ontwikkeling



afgeënte vaccine, b.v. de twee-daagsche vaccine van PASCHEN, bevat slechts zeer weinig bacteriën. In overeenstemming hiermede zal men kunnen verwachten, dat van vaccine-erupties, die even oud zijn, maar waarvan de eene eerder in het supperatiestadium is gekomen, deze laatste ook veel meer bacteriën zal bevatten. Ten bewijze van de juistheid dezer redeneering heb ik kalf 27 met driedaagsche vaccine van kalf 631 tegelijkertijd op de buik- en dijhuid en op de flank geënt. Het entveld op buik en dij werd bovendien in twee gelijke deelen verdeeld. De driedaagsche vaccine bevatte slechts weinig bacteriën.

Om bovendien de mogelijke invloed van verontreinigende bacteriën in de vaccine na te gaan werd de eene helft van het buik-dij-ent-veld geënt met vaccine alléén, en de andere helft met de zelfde vaccine, waaraan toegevoegd een suspensie van cultuurstaphylococcen. (10 milliard coccen per gram) De flank van het kalf werd op een even groot entveld eveneens met vaccine alléén geënt.

Het resultaat dezer enting was, dat het proces, veroorzaakt door vaccine + staph. het snelst verliep.

Reeds na 24 uur was er een flinke roodheid der entstreepen. De pokblaasjes waren na  $3 \times 24$  uur reeds geheel wit. Na 5 dagen afgeënt bedroeg de oogst van deze eruptie 7 gram, die der vaccine alleen op de buik-dijhuid 5,5 gram en van die op de flank 4,5 gram. Tot op zekeren hoogte kan men zeggen, dat de grootte der oogst evenredig is met de rijpheid der eruptie, dus ook met de snelheid der ontwikkeling.

Het aantal bacteriën in de entstof, nadat ze een maand in glycerine gesuspenderd in de ijskast had gestaan was van:

de vaccine + staph. buik 470.000.

de vaccine buik 120000

de vaccine flank 100

Dit is dus volkomen overeenkomstig de verwachting. De plaats der enting schijnt echter van veel grooter beteekenis te zijn dan het aantal kiemen der vaccine waarmee geënt wordt.

De virulentie der vaccine werd volgens GROTH bepaald op konijn 786 en 787. De verdunningsvirulentie was van alle drie ongeveer  $1/50000$  d. w. z. dat  $2/10$  cc der verdunning  $1/50000$



van de lympe nog een kleine pustel  $\pm$  5 dagen na intradermale inspuiting gaf. Er bleek echter een groot verschil te bestaan in hevigheid der reacties; de grootste pustels gaf de vaccine der flank, iets kleiner waren die der buik, en die der vaccine + staph. nog weer minder uitgebreid.

Op grond van het bovenstaande ben ik dus van meening, dat het verschil in bacteriegehalte tusschen Leidsche en Amsterdamse vaccine vooral een gevolg is van het verschil in enting van het kalf. Uit de zoo juist beschreven proef blijkt, dat de enting van het kalf met vaccine + staph. een andere reactie geeft dan enting met vaccine zonder toegevoegde staph. Het is dus van beteekenis experimenteel nader te onderzoeken, welke de invloed is van de geassocieerde kiemen op de reactie. Ten einde dit na te gaan heb ik volgende proeven verricht.

*Invloed van, aan de entstof toegevoegde, cultuur-staphylococcen op de neurolapine reactie bij het konijn.*

Wanneer de secundaire kiemen in de vaccine oorzaak zijn van het goedaardig verloop van een infectie met dermovaccine in vergelijking met die, veroorzaakt door neurolapine, dan moet door toevoeging van staphylococcen de neurolapine reactie gemitigeerd kunnen worden. Om de eventuele juistheid van deze redeneering aan te toonen, werd de volgende proefopstelling gekozen:

Neurolapine werd gemengd met een staph.-suspensie van een zekere dichtheid (afgeschudde agar-cultuur in een maatglas van 25 cc. zoodanig verdund, dat een potloodstreep op wit papier nog juist zichtbaar is.) Aan een gram gedroogde neurolapine (overeenkomende met ongeveer 20 gram vaccine-lymphe) werden ongeveer 10 milliard staphylococcen toegevoegd. Deze staphylococcen waren gekweekt uit Leidsche vaccine; ze hadden voor het konijn een geringe virulentie. Honderd millioen staphylococcen in 2/10 c.c. sol. RINGER, intradermaal bij konijnen ingespoten, geven een klein infiltraat, dat na 2 dagen weer bijna geheel verdwenen is. Er werden groepen gemaakt van konijnen, waarvan ongeveer een gelijk aantal intracutaan werd ingespoten met neurolapine, met neurolapine + staph. en met dermo-



vaccine, de neurolapine werd sterker verdund dan de dermo-vaccine, daar de verdunningsvirulentie van de eerste grooter was.

Gedroogde neurolapine gaat nog al snel in virulentie achteruit, daarom moesten er voortdurend een groot aantal contrôles genomen worden. Bij het meerendeel der konijnen werden na 2, 3, 4 en 5 dagen successief-entingen verricht door scarificatie met een vaccinstyle en inbrengen van onverdunde lympe van kalf 482, om op deze manier een inzicht te krijgen over de snelheid van het optreden der immuniteit. De volgende tabellen geven een overzicht van het verloop der reactie (tabel *No. I* en *II*).

De gebruikte neurolapine, afkomstig van konijn 557 was met 80 % glycerine verdund fijngevreven in de verhouding 1 : 4 (zelfde als bij de dermovaccine); van deze lympe zijn de verdunningen  $\frac{1}{500}$  tot  $\frac{1}{50}$  miljoen gemaakt. De virulentie volgens GROTH bepaald op konijn 565 was  $\frac{1}{500000}$ . De vaccine, afkomstig van kalf 482 is iets minder-virulent dan de neurolapine; de verdunning  $\frac{1}{500000}$  gaf bij konijn 575 nog zeer kleine pustels;

De verdunningsvirulentie der Amsterdamsche vaccine bedroeg  $\frac{1}{50000}$  (konijn 580), dus is deze entstof iets minder virulent dan de Leidsche vaccine kalf 482.

Bij deze reeks viel op, dat de zwarte konijnen over het algemeen minder reageerden dan de licht gekleurde. (de konijnen met een + teeken gemerkt waren zwart.)

De inspuiting der entstoffen is geschied in rijen van  $4 \times 0,2$  cc intradermaal in de tevoren chemisch onthaarde huid. De herenting geschiedde vanaf den derden dag met vaccine kalf 432 door middel van scarificatie. Het optreden der immuniteit wordt gerekend te beginnen op den dag, dat de toen aangebrachte scarificatie geen volledige pokreactie meer heeft gegeven.

Het is dus gebleken, dat de reactie op een intradermale neurolapine inspuiting minder hevig is en sneller afloopt indien de neurolapine vermengd is met weinig pathogene staphylococcen. Bij een menginfectie treedt algemeene immuniteit echter niet vroeger in, dan bij de zuivere neurolapine-infectie, er blijft dus een verschil met het optreden der immuniteit na enting



TABEL No. 1.

Proefdier	Gebruikte entstof	Maximale reactie	Oedeem	Centrale necrose	Generalisatie	Optreden der immuniteit
konijn 491	glyc. vacc. kalf 482 $\frac{1}{50}$	na 4 dagen	—	++	—	niet bepaald
„ 496	gedroogde vacc. k. 482 $\frac{1}{1000}$	„ 4—5 „	—	+	—	„ „
„ 511	„ „ „ 402 $\frac{1}{1000}$	„ 5 „	—	—	—	na 3 dagen
„ 512	„ „ „ 402 $\frac{1}{1000}$	„ 4 „	—	—	—	„ 3 „
„ 533	glyc. vacc. kalf 482 $\frac{1}{50}$	„ 4 „	—	—	—	„ 3 „
„ 534	„ „ „ 482 $\frac{1}{50}$	„ 4 „	—	—	—	„ 3 „
„ 541	Amsterdamsche vacc. $\frac{1}{50}$	„ 4 „	—	—	—	„ 4 „
„ 542	„ „ „ $\frac{1}{50}$	„ 5 „	+	+	—	„ 4—5 „
konijn 481	glyc. neurolap. k. 475 $\frac{1}{50}$	na 6 dagen	+	++	—	niet bepaald
„ 492	„ „ „ 456 $\frac{1}{50}$	„ 7 „	+	+++	—	„ „
„ 561	„ „ „ 487 $\frac{1}{100}$	„ 8 „	+	+++	—	„ „
„ 567	„ „ „ 487 $\frac{1}{100}$	„ 6 „	+++	++++	—	„ „
„ 513	gedr. „ „ 487 $\frac{1}{1000}$	„ 7 „	±	—	—	na 4 dagen
„ 514	„ „ „ 487 $\frac{1}{1000}$	„ 7 „	±	—	—	„ 4 „
„ 520	„ „ „ 487 $\frac{1}{01000}$	„ 6 „	++	++	+	„ 6 „
„ 532	„ „ „ 527 $\frac{1}{100}$	„ 6 „	++	+++	+	niet bepaald
„ 536	„ „ „ 527 $\frac{1}{500}$	„ 5—6 „	+	++	+	na 4 dagen
„ 537	„ „ „ 527 $\frac{1}{500}$	„ 5—6 „	+++	++	+	„ 4 „
„ 538	„ „ „ 527 $\frac{1}{500}$	„ 5—6 „	+	++	+	„ 4 „
„ 545	„ „ „ 525 $\frac{1}{500}$	„ „	+++	+++	++	niet bepaald

Proefdier	Entstof + staphylocococcen	Maximale reactie	Oedeem	Centrale necrose	Generalisatie	Optreden der immuniteit
konijn 515	gedr. neurolap. k. 487 $\frac{1}{1000}$	na 5 dagen	—	—	—	na 4 dagen
„ 516	„ „ „ 487 $\frac{1}{1000}$	„ 4 „	—	—	—	„ 4 „
„ 509	„ „ „ 487 $\frac{1}{100}$	„ 5 „	—	+	—	niet bepaald
„ 521	„ „ „ 487 $\frac{1}{100}$	„ 5 „	—	—	—	na 4 dagen
„ 522	„ „ „ 487 $\frac{1}{100}$	„ 5 „	—	—	—	„ 4 „
„ 539	„ „ „ 527 $\frac{1}{500}$	„ „	—	—	—	„ 5 „
„ 540	„ „ „ 527 $\frac{1}{500}$	„ 3 „	—	—	—	„ 4 „



TABEL No. 2.

Proefdier	Gebruikte entstof	Maximale reactie	Oedeem	Centrale necrose	Generalisatie	Optreden der immuniteit
konijn 565	neurolapine k. 557 $\frac{1}{50}$ tot $\frac{1}{500}$ miljoen	na 7 dagen	+++	+++	+	na 5 dagen
„ 566 <sup>1)</sup>	neurolapine $\frac{1}{500}$	„ 5 „	—	—	—	„ 4—5 „
„ 567	„ $\frac{1}{500}$	„ 6 „	+++	++++	++	„ 4—5 „
„ 568	„ $\frac{1}{500}$	„ 6 „	+	++++	±	„ 4—5 „
„ 569	„ $\frac{1}{500}$	„ 7 „	++	++++	++	„ 5 „
Proefdier	Entstof + staphylococcen	Maximale reactie	Oedeem	Centrale necrose	Generalisatie	Optreden der immuniteit
konijn 570	neurolapine k. 557 $\frac{1}{50}$ tot $\frac{1}{500}$ miljoen	na 5 dagen	—	+	±	na 4 dagen
„ 571	neurolapine $\frac{1}{500}$	„ 4 „	—	+	—	„ 5—6 „
„ 572	„ $\frac{1}{500}$	„ 4 „	—	+	—	„ 4—5 „
„ 573 <sup>1)</sup>	„ $\frac{1}{500}$	„ 4 „	—	±	±	„ 4 „
„ 574	„ $\frac{1}{500}$	„ 4 „	—	—	—	„ 4 „
Proefdier	Gebruikte entstof	Maximale reactie	Oedeem	Centrale necrose	Generalisatie	Optreden der immuniteit
konijn 575	glyc. vacc. kalf 482 $\frac{1}{50}$ tot $\frac{1}{50}$ miljoen	na 5 dagen	+	++	—	na 3—4 dagen
„ 576	glyc. vacc. kalf 482 $\frac{1}{50}$	„ 4 „	—	—	—	„ 3 „
„ 577	„ „ „ 482 $\frac{1}{50}$	„ 4 „	—	—	—	„ 3 „
„ 578	„ „ „ 482 $\frac{1}{50}$	„ 4 „	—	—	—	„ 3 „
„ 579	„ „ „ 482 $\frac{1}{50}$	„ 4 „	—	—	—	„ 3 „
„ 580	Amsterdamsche vacc. $\frac{1}{50}$ tot $\frac{1}{5}$ miljoen	„ 3 „	—	—	—	„ 4 „
„ 581	Amsterdamsche vacc. $\frac{1}{50}$	„ 4 „	—	+	—	„ 4—5 „
„ 582	„ „ „ $\frac{1}{50}$	„ 4 „	—	—	—	„ 3—6 „
„ 583	„ „ „ $\frac{1}{50}$	„ 4 „	—	+	—	„ 5—6 „
„ 584	„ „ „ $\frac{1}{50}$	„ 4 „	—	+	—	„ 4 „

<sup>1)</sup> Deze konijnen zijn zwart.



met dermovaccine. De verontreiniging met bacteriën is dus niet de eenigste factor, die het verschil in reactie tusschen het neuro- en het dermovirus veroorzaakt.

*Hebben ook andere bacteriën dan de Staphylococcus pyogenes aureus het vermogen om als menginfectie met neurolapine de pathogene werking van deze smetstof te verminderen.?*

Het was mogelijk, dat de coccus, die altijd in dermovaccine voorkomt en tevens bekend staat als een sterke etterverwekker, de eigenschap om de neurolapine-infectie minder hevig te doen verlopen alleen of in sterker mate zou bezitten dan andere weinig pathogene kiemen.

Om dit experimenteel na te gaan werd de zelfde proef genomen met bac. COLI, een stam die bij 37° C. uitstekend groeide, afkomstig van de Kinderkliniek van Prof. Gorter.

De enting werd verricht op de zelfde wijze, als bij de vorige proef. De zelfde entstof werd gebruikt, zoodat het niet noodig was, als contrôle op de virulentie der neurolapine, konijnen met deze entstof alléén te enten (17 dagen tusschenruimte tusschen deze en de vorige proef).

Tabel No. 3 geeft het resultaat der entingen weer; de contrôle-groep der vorige proef is opnieuw weergegeven.

De gebruikte colistam gaf zelf bij intradermale inspuiting een ontsteking, die van denzelfden graad was als die, veroorzaakt door staphylococcen.

Streptococcus acidi lactici, die nog minder pathogeen is, werd ook gemengd met neurolapine. Een bezwaar van deze bacterie is, dat het juiste aantal zich moeilijk laat bepalen, doordat de suspensie zich niet homogeen laat maken; daarom werden bij het volgend experiment de bacteriesuspensies alleen macroscopisch op dezelfde dichtheid gebracht. Tabel No. 4 resulteert uit deze proef.

Het is dus duidelijk, dat de mitigeerende invloed op de neurolapineinfectie niet alleen een eigenschap is van de Staphylococcus pyogenes aureus, doch aan meerdere bacteriën eigen is. Waarschijnlijk heeft elke etterbacterie, die een plaatselijke ontsteking geeft, dit vermogen.



TABEL No. 3.

Proefdier	Gebruikte entstof	Maximale reactie	Oedeem	Centrale necrose	Generalisatie	Optreden der immuniteit
konijn 565	neurolapine k. 557 $\frac{1}{500}$ tot $\frac{1}{50}$ miljoen	na 7 dagen	+++	+++	+	na 5 dagen
„ 566	neurolapine k. 557 $\frac{1}{500}$	„ 5 „	—	—	—	„ 4—5 „
„ 567	„ „ 557 $\frac{1}{500}$	„ 6 „	+++	++++	++	„ 4—5 „
„ 568	„ „ 557 $\frac{1}{500}$	„ 6 „	+	++	±	„ 4—5 „
„ 569	„ „ 557 $\frac{1}{500}$	„ 7 „	++	++++	++	„ 5 „
	Gebruikte entstof + staphylococcen					
konijn 605	neurolapine k. 557 $\frac{1}{400}$	na 4 dagen	—	—	±	na 4—5 dagen
„ 606	„ „ 557 $\frac{1}{400}$	„ 4 „	—	—	—	„ 4 „
„ 607	„ „ 557 $\frac{1}{400}$	„ 5 „	++	+	—	„ 4—5 „
„ 608	„ „ 557 $\frac{1}{400}$	„ 4 „	—	—	—	„ 4—5 „
„ 609	„ „ 557 $\frac{1}{400}$	„ 4 „	—	—	—	„ 4—5 „
	Gebruikte entstof + colibacillen					
konijn 610	neurolapine k. 557 $\frac{1}{400}$	na 4 dagen	—	—	—	na 3—4 dagen
„ 611	„ „ 557 $\frac{1}{400}$	„ 4 „	—	—	—	„ 4—5 „
„ 612	„ „ 557 $\frac{1}{400}$	„ 5 „	++	±	—	„ 4 „
„ 613	„ „ 557 $\frac{1}{400}$	„ 4 „	—	—	—	„ 4 „
„ 614	„ „ 557 $\frac{1}{400}$	„ 4 „	—	—	±	„ 4 „



*Invloed van door hitte gedooide staphylococcen op het verloop van een neurolapine-infectie.*

Door STEVENSON is de hypothese naar voren gebracht, dat de waargenomen mitigeerende invloed veroorzaakt zou worden door adsorbtie aan de toegevoegde coccen en daardoor vermindering van de infecteerende dosis neurolapine. Deze veronderstelling zou een bevestiging kunnen vinden indien ook gedooide staph. dezelfde invloed op een neurolapineinfectie uitoefenden. Staph. suspensies werden gedurende een uur verhit op  $56^{\circ}\text{C}$ ., een andere hoeveelheid op  $65^{\circ}\text{C}$ . in een waterbad. Een uur op  $56^{\circ}\text{C}$ . bleek niet voldoende te zijn om de staph. te doden. De virulentie was echter wel verminderd, zoodat men wel kon verwachten, dat de mitigeerende invloed minder duidelijk zou zijn. Aan de suspensies werd een gelijke hoeveelheid neurolapine van konijn 797  $1/250$  verdund, toegevoegd. De tabel No. 6 geeft een samenvatting van dit experiment. Uit deze tabel blijkt, dat gedooide staph. zoo goed als geen invloed hebben op het verloop van de vaccine-infectie; het is dus niet waarschijnlijk, dat het waargenomen verschijnsel toe te schrijven is aan de adsorbtie.

*Waardoor ontstaat de mitigeerende werking van bacteriën?*

Mijns inziens zijn er twee mogelijkheden:

a. *Onder invloed van de bacterieele infectie zou het organisme een verandering kunnen ondergaan, waardoor het anders op infecties met vaccinevirus reageert.* Hiertegen pleit, dat enting met staphylococcen op de eene plaats van de huid of intraveneus ingespoten, de reactie op enting met neurovaccine op een andere plaats van de huid niet wijzigt. Dit bleek uit de volgende proef:

Konijnen 587 en 588 werden ingespoten op 4 plaatsen met  $2/10$  cc neurolapine van konijn 557  $1/400$  verdund; op vier andere plaatsen met een staph. suspensie, die 25 miljoen staphylococcen per cc. bevatte (komt dus overeen met 10 milliard per gram neurolapine).

Konijn 589 kreeg intradermaal neurolapine  $1/400$  en intraveneus 0,8 cc staph. suspensie. Konijn 590 werd alleen met neurolapine  $1/400$  intradermaal ingespoten. Meer controle-dieren



TABEL No. 4.

proefdier	gebruikte entstof	maximale reactie	oedeem	centrale necrose	generalisatie	optreden der immuniteit
konijn 662	neurolapine k. 655 $\frac{1}{400}$	na 6 dagen	+	+++	++	na 4 dagen
„ 663	„ „ 655 $\frac{1}{400}$	„ 6 „	+	+++	+++	„ ? „
„ 664	„ „ 655 $\frac{1}{400}$	„ 7 „	++	+++	+++	„ ? „
„ 665	neurolap. k. 655 $\frac{1}{400}$ + staphylococcen	„ 4 „	—	±	±	„ 4 „
„ 666	„ „ 655 $\frac{1}{400}$ + „	„ 4 „	—	—	—	„ 4 „
„ 667	„ „ 655 $\frac{1}{400}$ + „	„ 4 „	—	—	±	„ 4 „
„ 669	neurolap. k. 655 $\frac{1}{400}$ + streptococcus acidi lact. . . . .	„ 6 „	++	—	±	„ 4 „
„ 670	Idem	„ 5 „	—	—	±	„ 3-4 „
„ 671	Idem	„ 5 „	—	+	—	„ 4 „

TABEL No. 5.

proefdier	gebruikte entstof	staphylococcen	maximale reactie	oedeem	centrale necrose	generalisatie	optreden der immuniteit
konijn 587	neurolapine k. 557 $\frac{1}{400}$	4 × 0,2 c.c. intradermaal	na 6 dagen	+++	++++	++	na 4 dagen
„ 588	„ „ 557 $\frac{1}{400}$	4 × 0,2 „ „	„ 6 „	++	+++	+	„ 5 „
„ 589	„ „ 557 $\frac{1}{400}$	0,8 c.c. intraveneus	„ 6 „	+++	+++	++	„ 5 „
„ 590	„ „ 557 $\frac{1}{400}$	geen	„ 6 „	++	++	—	„ 4 „



waren niet noodig, daar konijnen 565, 566, 567, 568 en 569, die even te voren met de zelfde neurolapine waren behandeld, tevens als controles konden dienen. Tabel No. 5 geeft het resultaat weer.

*b. Een andere verklaring is deze, dat de door de bacterien veroorzaakte ontsteking plaatselijk een mitigeerende werking op de neurovaccinereactie heeft. Hiervoor pleit het volgende:*

1°. Wanneer men een locale ontsteking opwekt door inspuiting van staphylococceen en men ent de neurolapine in de ontstekingskwaddel, dan is de reactie op het ingebrachte vaccine-virus slechts zeer gering.

Om deze locale a-specifieke ontsteking te veroorzaken heb ik gebruik gemaakt van staph. pyogenes. aureus, gekweekt uit gedroogde vaccine van kalf 631 (oogst 5—4—'32, sedert dien, = bijna 2 jaar, in gedroogde toestand in vacuum bewaarde in de ijskast, bevat nog minstens 40 millioen levende kiemen per gram).

De staph. suspensie gaf een ontstekingskwaddel ter grootte van een cent, één dag na de intradermale inspuiting.

Konijn 923 werd 7—12—'32 intradermaal ingespoten met:

- I.  $3 \times 0,2$  cc (staph. suspensie + phys. sol.  $\overline{aa}$ )
- II.  $3 \times 0,2$  cc neurolapine konijn 46  $\frac{1}{100}$ .
- III.  $3 \times 0,2$  cc (staph. susp. + neurolapine  $\frac{1}{50}$   $\overline{aa}$ )
- IV.  $3 \times 0,2$  cc (staph. susp. + phys. sol.  $\overline{aa}$ ).

De volgenden dag waren bij I, III en IV flinke roode puisten, bij II nog weinig reactie. De pustels van IV werden nu ingespoten met elk 0,2 cc neurolapine konijn 46  $\frac{1}{100}$ .

Na drie dagen was de reactie bij II reeds sterker dan bij III, die bij I en IV waren reeds minder intensief dan na 1 dag.

Na vijf dagen was die bij I bijna weer geheel teruggedaan. Bij II had zich een flink oedeem met beginnende centrale haemorrhagie ontwikkeld. Bij III was de reactie minder dan bij II, terwijl bij IV slechts kleine puisten zonder oedeem met geringe centrale haemorrhagie zich hadden ontwikkeld.

Een volgend konijn, No. 925, vertoonde nog duidelijker ver-



schil Bij dit dier was de neurolapine-reactie na inspuiting in de kwaddel, veroorzaakt door de staph. susp., slechts minimaal vergeleken bij de controle-reactie der neurolapine, in de gave huid ingespoten.

2<sup>o</sup>. *De mitigeerende werking treedt ook op indien men in een aseptische ontsteking b.v. veroorzaakt door terpentijn, ent.*

Konijn 936 werd op de volgende manier behandeld:

Op 10 Januari werd het dier intradermaal ingespoten met  $3 \times 0,01$  cc 0l. tereb. en  $3 \times 0,2$  cc staph.susp. De terpentijn had na 24 uur roode pustels gegeven, iets grooter van oppervlakte dan een cent. De pustels werden na 1 dag ingespoten met 0,1 cc neurolapinesusp.  $\frac{1}{50}$  konijn 46 en tevens  $3 \times 0,1$  cc apart. Na 7 dagen was de neurolapine-reactie maximaal, er had zich een sterk oedeem met uitgebreide centrale necrose ontwikkeld, daarentegen gingen de pustels, veroorzaakt door neurolapine, ingespoten in terpentijn- en staphylococceen kwaddels, reeds na 5 dagen terug en vertoonden geen spoor van oedeem en necrose.

3<sup>o</sup>. *Enting in een brandwondje.*

In Roemenie werd vroeger gevaccineerd door entstof te brengen op een klein brandwondje, hierdoor zou zich, na een lichte reactie een goede immuniteit ontwikkelen. Het brandwondje geeft een reactieve ontsteking, zoodat in verband met het bovenstaande, men zich heel goed kan voorstellen, dat een lichte reactie het gevolg is van deze manier van enten.

*Deze proeven wijzen er dus op, dat een locale ontsteking mitigeerend werkt op de vaccinereactie. Welk is het mechanisme van deze mitigeering?*

Een algemeen veranderde reactie van het lichaam kan men, zoo als wij zagen, niet aannemen. De oorzaak der veranderde reactie moet m.i. gezocht worden in de leucocyten, die en het ontstoken weefsel aanwezig zijn. Uit de proeven van WILSON SMITH toch is bekend, dat vaccinevirus affiniteit voor leucocyten heeft. Ik stel mij dus voor, dat de in het ontstoken weefsel opgehoopte leucocyten het virus opvangen, waardoor dit minder snel in de circulatie komt, als het geval is, wanneer er geen ontsteking is. Is deze veronderstelling juist, dan zal men door vernietiging der leucocyten de neurolapine-infectie in dit leucocyten-



arme organisme heviger doen verlopen dan in een gezond individu. Het is bekend, dat benzol een sterke leucopenie geeft. Dit middel heb ik gebruikt om de gewenschte leucopenische toestand te scheppen.

Twee konijnen, 937 en 938, werden 5 achtereenvolgende dagen subcutaan ingespoten met 2 cc benzol. Voor het toedienen der laatste benzolinspuiting was het aantal leucocyten zoo sterk verminderd, dat men in een uitstrijkpreparaat eerst na lang zoeken een enkele leucocyt kon ontdekken.

Eén dag na de laatste benzolinjectie werden beide konijnen intradermaal ingespoten met  $3 \times 0,2$  cc staph. susp. De staph. gaven nog wel een flinke locale reactie. Neurolapine 1 dag later in de pustels ingespoten, bleek geen sterk pathogene werking te hebben; de controle-inspuiting gaf echter in de niet-voorbehandelde huid een zeer hevige reactie, veel heviger dan te voren bij niet met benzol behandelde dieren was gezien. Ze stierven resp. na 9 en 11 dagen aan een vaccinia generalisata.

Blijkbaar hadden de dieren niet het vermogen om de neurolapine-infectie te localiseeren zonder de hulp van een gezond reticulo-endotheliaal systeem.

Aan de beteekenis van de leucocyten voor het verloop der vaccinatie kan m. i. dus niet getwijfeld worden.

*Hoe werken die leucocyten?*

Drie mogelijkheden treden naar mijn meening naar voren:

I. *De leucocyten vormen een wal rondom het virusdepôt; m. a. w. ze houden het virus tegen en voorkomen de snelle invasie in het lichaam door deze meer mechanische functie.*

II. *In de leucocyten en de andere elementen van het reticulo-endotheliale systeem ter plaatse kunnen antistoffen gevormd worden, waardoor een geleidelijke immunisatie optreedt.*

III. *Door de ophooping van de leucocyten kan het milieu ter plaatse ongeschikt worden voor een snelle vermeerdering van het virus.*

In dit verband moet in de eerste plaats gedacht worden aan



de plaatselijk lagere zuurstofspanning, die bij elke ontsteking optreedt en vooral te danken is aan de oxydatieve fermenten der leucocyten. PASCHEN, GINS en LEDINGHAM hebben er op gewezen, dat dermovaccine voor een snelle vermeerdering meer zuurstof noodig heeft dan neurolapine. Hiermee stemt overeen de waarneming van HIDETAKE YAOI, die bij kinderen heeft waargenomen, dat de subcutaan ingespoten dermovaccine een geringere locale en algemeene reactie gaf, dan de gebruikelijke cutane vaccinatie. Men kan zich voorstellen, dat de optimum zuurstofspanning voor een snelle vermeerdering van het virus bij verschillende vaccinstammen niet dezelfde is. De optimum zuurstofspanning voor een goedaardige dermovaccine zal hoog wezen, slechts de zeer oppervlakkige huidlagen voldoen aan deze eisch, die voor een kwaadaardige neurolapine ligt lager, het heele lichaam vormt hierdoor een vruchtbare voedingsbodem voor deze entstof. Tusschen deze twee uitersten zullen overgangen zijn.

Hetzelfde als waargenomen is bij subcutaan ingespoten dermovaccine n.l. een minder snelle groei door gebrek aan zuurstof, zou ook bij een neurolapine kunnen plaats hebben, n.l. wanneer de zuurstofspanning ter plaatse kunstmatig door een ontsteking wordt verlaagd.

Welke van deze drie veronderstelde mogelijkheden juist is, zal door verdere experimenten nagegaan moeten worden.

In elk geval zou het verschil in bacteriegehalte het onderscheid tusschen de werking van dermovaccine en neurolapine ten deele kunnen verklaren, want door toevoeging van bacteriën aan neurovaccine kunnen de verschillen met dermovaccine grootendeels verdwijnen. Omgekeerd gaat deze waarneming echter niet op, daar steriele dermovaccine (kunstmatig bacterievrij gemaakt) een onveranderde goedaardige reactie geeft. Bovendien blijkt het optreden der algemeene immuniteit (niet aanslaan der revaccinatie) door toevoeging van bacteriën aan de neurolapine niet versneld te worden.

Waarop berust dit verschil dan wel?



Wij wezen zoo juist op de groote aanpassing van neuro-vaccine aan een zuurstofarmer milieu. Wordt dermovaccine in een huidscarificatie gebracht, dan vermeerdert het zich ter plaatse snel, m.i. dank zij de rijkdom aan zuurstof; het woekert niet voort, althans niet in belangrijke mate, in het inwendige van het lichaam, waar de zuurstofspanning geringer is. Neuro-vaccine daarentegen zal juist een snelle vermeerdering vertoonen in het interne organisme. Begrijpelijk is daardoor de sterke vaccinia generalisata en het uitgebreide oedeem, die na enting met neurovaccine optreden.

Na enting met dermovaccine krijgt men dus een sterke locale vermeerdering van het virus met een geringe generalisatie, na die met neurolapine een geringere locale ophooping, maar een sterke vermeerdering in het geheele organisme. In het eene geval heeft men dus weinig virus en dat plaatselijk opgehoopt, in het andere geval veel virus, maar verdeeld over het geheele organisme.

Dit verschil in localisatie en in hoeveelheid van het virus moet ook aanleiding geven tot verschil in reactie van het lichaam. De sterke plaatselijke ophooping bij dermo-vaccine zal aanleiding geven tot een spoedig optredende plaatselijke reactie, de groote hoeveelheid in het geheele organisme bij neuro-vaccine zal aanleiding geven tot de vorming van een groote hoeveelheid antilichamen, maar een later optreden.

In overeenstemming hiermede is, dat na de neurolapine-infectie het virus langer in het organisme is aan te toonen dan na dermo-vaccinatie. Terwijl PASCHEN, PROWAZEK e. a. vonden, dat na cutane enting met dermo-vaccine na 5—6 dagen het virus niet meer aan te toonen was, zijn de organen van intracutaan met neurovaccine geënte konijnen na 12 dagen nog rijkelijk virushoudend.

De volgende proeven toonen de genoemde verschillen duidelijk aan.

#### I. *Betreffende de lange duur van de neurolapine-infectie.*

Konijn 800 werd 4-8-'32 intradermaal ingespoten met neuro-lapine  $\frac{1}{400}$  verdund. Het dier vertoonde hierop de gewone



reactie, d. w. z. een uitgebreid oedeem en een sterke centrale necrose. Er trad na 5 en 6 dagen een flinke vaccinia generalisata op. Na 10 dagen kreeg het een beiderzijdsche vaccine-keratitis en puisten op lippen en oogleden. 16-8-'32, d. i. 12 dagen na enting, kreeg het dier krampen en stierf spoedig.

Bij sectie bleken in lever en longen talrijke grijze miliaire haardjes aanwezig te zijn. De hersenen waren bloedrijk en de vliezen oedemateus. Alle organen waren bacterie-steriel. Dit beeld der vaccinia generalisata is reeds nauwkeurig beschreven door BIJL en FRENKEL.

De hersenen van konijn 800 werden gedeeltelijk fijn gewreven en  $4 \times 0,2$  c.c. der suspensie en verdunning  $\frac{1}{20}$  intradermaal ingespoten bij konijn 816. Dit konijn kreeg hetzelfde ziektebeeld als konijn 800, de generalisatie was heviger; het stierf 8 dagen na de inspuiting, weer nadat het 6 uur voor de dood atactisch was geworden en krampen had vertoond. De sectie was als van konijn 800, de hersenen waren nog sterker geïnjecteerd. Deze werden in suspensie intradermaal ingespoten bij konijn 818; een hevige generalisatie was het gevolg, doch het dier is, hoewel sterk vermagerd, na verloop van een paar weken genezen.

Wanneer men weet, dat de normale duur van een vaccine-infectie bij het konijn ongeveer de helft bedraagt van die bij den mensch, dan komt hier de lange duur van de infectie wel sterk naar voren. Het volkomen analoge verloop van de variola bij den mensch is frappant. Ook hierbij de lange incubatie-tijd, de langzame immuniseering, de sterke generalisatie en het lang infectieus blijven van de patiënt. De hevige locale en algemeene ziekteverschijnselen zijn bij de beide infecties overeenkomstig. Convulsies en andere zenuwverschijnselen treden bij variola herhaaldelijk op, waren bij kinderen ten tijde van de variolatie zelfs regel. Krampen ziet men slechts zelden na een neurolapine-infectie bij het konijn, doch hier zij opgemerkt, dat het zenuwstelsel veel eenvoudiger is, wat bouw en functie betreft, dan bij den mensch. De laedeerbaarheid der konijnenhersenen zal daarvoor minder groot zijn.



## II. Betreffende het optreden en de sterkte der humorale immuniteit.

Hiertoe werden een groep van 6 konijnen, alle volwassen, lichthaarkleurige voedsters van hetzelfde uiterlijk, bijna even oud, bij één fokker gekocht, gelijktijdig geënt, drie exemplaren met glycerine-vaccine kalf 482  $\frac{1}{50}$  verdund en drie met gedroogde neurolapine konijn 655  $\frac{1}{400}$  verdund. De enting geschiedde weer door 4 intra-dermale injecties van 0,2 cc.

De neurolapine gaf aanleiding tot een sterke generalisatie op den zesden dag, de vaccine gaf de gewone reactie zonder generalisatie. Vier dagen na injectie werd bij de neurolapine-konijnen 662, 663 en 664 venae-sectie gedaan en ongeveer 8 cc bloed opgevangen, eveneens bij de vaccine-konijnen 672 en 673.

Het verkregen serum werd een half uur op 55° C. verhit, zoodat het mogelijk aanwezige virus was gedood. Het serum werd gemengd met gelijke deelen neurolapine van konijn 654  $\frac{1}{100}$  verdund; deze neurolapine heeft een matige virulentie, geeft geen aanleiding tot oedeem en slechts geringe generalisatie; ze is verkregen door het konijn af te maken, toen het beginnende

TABEL No. 6.

roefdier	Entstof	Max. reac.	Oedeem	Necrose	Generalisatie	Ontstaan der immuniteit
on. 801	neurolap. $\frac{1}{500}$	na 7 dagen	+++	+	±	na 6 dagen
„ 802	„ $\frac{1}{500}$	„ 6 „	+++	++	+	„ 5—6 „
„ 803	„ $\frac{1}{500}$	„ 6 „	++	+	„	„ 5—6 „
„ 804	„ $\frac{1}{500}$	„ 7 „	+++	+++	+	„ 5—6 „
„ 805	„ $\frac{1}{500}$	„ 6 „	+	++	±	„ 5—6 „
„ 806	neurolap. $\frac{1}{250}$ + Staph.cc. 56°	„ 5 „	—	—	±	„ 5 „
„ 807	„ $\frac{1}{250}$ + „ 56°	„ 5 „	—	—	±	„ 5 „
„ 808	„ $\frac{1}{250}$ + „ 56°	„ 5—6 „	—	—	±	„ 5 „
„ 809	„ $\frac{1}{250}$ + „ 56°	„ 5—6 „	+	±	—	„ 5 „
„ 810	„ $\frac{1}{250}$ + „ 56°	„ 5—6 „	—	++	±	„ 5—6 „
„ 811	neurolap. $\frac{1}{250}$ + Staph.cc. 65°	„ 5 „	++	+	++	„ 5—6 „
„ 812	„ $\frac{1}{250}$ + „ 65°	„ 5—6 „	+++	+++	+	„ 6 „
„ 813	„ $\frac{1}{250}$ + „ 65°	„ 5—6 „	+	+++	±	„ 5 „
„ 814	„ $\frac{1}{250}$ + „ 65°	„ 5 „	+	++	±	„ 5 „
„ 815	„ $\frac{1}{250}$ + „ 65°	„ 5—6 „	+	++	+	„ 5—6 „



encephalitis verschijnselen vertoonde; dit was 4 dagen na de intra-cerebrale injectie.

Het mengsel werd één uur in de broedstoof geplaatst bij 37° C.

Konijn 695 werd na ontharing met de genoemde mengsels intra-dermaal ingespoten tevens met de neurolapine alleen 2 × verdund met phys. NaCl, als contrôle. Er werden dus 6 rijen van 4 kwaddels geplaatst.

Tabel No. 7 geeft het verloop weer van de reacties (gemiddelde grootte der pustels).

TABEL No. 7.  
*Grootte der pustels bij konijn 695 in cm.*

Serum-proef-dier	Na 1 dag	2	3	4	5	6	7 dagen
662	—	—	0,4	1,49	2,11	2,39	in regressie
663	—	—	0,3	1,05	1,81	2,11	„ „
664	—	—	0,3	1,05	1,89	2,70	„ „
672	—	—	0,3	1,10	1,61	1,85	„ „
673	—	—	0,3	1,91	1,61	1,8	„ „
contrôle	—	—	0,6	0,61	1,11	1,21	„ „

Een duidelijke aanwijzing is er dus, dat het serum van konijnen gedurende de vaccine reactie afgenomen, gemengd met neuro-lapine, de werking van deze eerst remt en daarna bevordert.

Hierbij is de bevorderende werking van het serum van konijnen met een neurolapine-infectie duidelijk grooter dan die met een vaccine-infectie.

Drie weken na de inenting werd van dezelfde konijnen weer bloed afgetapt en het verkregen serum na inactivering weer gemengd met dezelfde neurolapine.

De konijnen 710 en 711 werden weer overeenkomstig behandeld. Het serum, waarvan men kon verwachten, dat het een aanmerkelijke hoeveelheid antilichamen zou bevatten, werd 5 × en 50 × verdund, deze verdunningen in gelijke hoeveelheid gevoegd bij de neurolapine en de mengsels weer 1 uur in de broedstoof geplaatst.



Tabel No. 8 geeft het resultaat dezer proef weer.

Uit deze proef blijkt dus duidelijk dat het serum van konijnen

TABEL No. 8.

Grootte der pustels bij konijn 711 in cm.

*Serum verdund  $\frac{1}{5}$ .*

Serum-proef- dier	Na 1 dag	2	3	4	5	6	7	8	9 dagen
674	—	—	—	—	0,6	0,7	1,1	1,1	in regressie
673	—	—	—	0,4	0,8	0,9	1,4	1,2	„ „
672	—	—	—	0,5	0,9	1,3	1,7	1,2	„ „
662	—	—	—	—	—	—	—	—	„ „
663	—	—	—	—	—	—	—	—	„ „
664	—	—	—	—	—	—	—	—	„ „
contrôle	—	0,5	0,6	1,1	1,3	1,9	2,5	2,4	„ „

*Serum verdund*  $1/50$

[illegible]

*Grootte der pustels bij konijn 710 in cm.*

*Serum verdund  $\frac{1}{5}$ .*

Serum-proef- dier	Na 1 dag	2	3	4	5	6	7	8	9 dagen
674	—	—	—	—	0,4	0,5	1,1	1,8	in regressie
673	—	—	—	—	0,5	1,2	1,8	2,0	„ „
672	—	—	—	—	0,5	1,0	1,5	2,0	„ „
662	—	—	—	—	—	—	—	—	„ „
663	—	—	—	—	—	—	—	—	„ „
664	—	—	—	—	—	—	—	—	„ „
contrôle	—	—	—	0,6	1	1,5	2	2,3	„ „

*Serum verdund  $1/50$ .*

[illegible]



die drie weken te voren zijn gevaccineerd een sterk remmende invloed heeft op de neurolapine-reactie, indien dit serum voor de inspuiting met het virus gemengd wordt. Het gehalte aan anti-lichamen van het serum van konijnen, die de zware neurolapine-infectie hebben doorgemaakt is veel grooter dan dat van konijnen, die geënt zijn met vaccine. Deze waarneming komt dus overeen met wat reeds bekend was in de literatuur, n.l., dat variola een veel sterkere antivirulentie van het serum veroorzaakte dan de vaccinatie. De neurolapine-infectie bij het konijn heeft dus ook in dit opzicht overeenkomst met de variolisatie bij den mensch.

### *Bespreking.*

Kort samengevat, heeft dit onderzoek het volgende resultaat gehad: Door inspuiting, intradermaal, van een mengsel van neurolapine en pyogene bacteriën of een pyogene chemische stof (terpentijn) wordt de reactie op de virusinfectie dermate gewijzigd, dat zij een zekere overeenkomst krijgt met de reactie op de intradermale inspuiting van dermovaccine. De overeenkomst wordt nog grooter, indien de inspuiting van bacteriën of terpentijn niet gelijktijdig geschiedt, maar 24 uur voorafgaat aan de injectie van neurovaccine. Op grond van eigen experimenten en hetgeen in de literatuur is medegedeeld, zou het verschil in gevoeligheid voor zuurstof een rol kunnen spelen bij het onderscheid in pathogene werking, dat tusschen neuro- en dermovaccine bestaat.

Onafhankelijk van mij heeft H. DAVIDE geconstateerd, dat staphylococcen, toegevoegd aan steriele neurolapine, blijkbaar eerder de pathogeniteit van het vaccine-virus vermindert dan bevordert. DAVIDE verrichtte dit onderzoek naar aanleiding van de ernstige critiek, uitgeoefend door H. MAGNUSSEN op de zuiverheid van de Zweedsche vaccine, die bij de massaënting in 1932 te Malmö vrij veel zware reacties had gegeven.

STEVENSON en BUTLER meenden als verklaring van de mitigeerende werking der bacterie-infectie op die van het vaccine-virus, de mogelijke adsorptie van het virus door de staphylococcen naar voren te moeten brengen. Deze veronder-



stelling, die inhoudt, dat door de adsorptie een geringere hoeveelheid virus haar pathogene werking zou kunnen uitoefenen, biedt weinig kansen tot bevestiging, immers:

I. In een phys. NaCl-opl. hebben bacteriën en het vaccinevirus beide een electro-negatieve lading.

II. Indien de infectie van het mengselneurolapine + staph. overeen zou komen met de infectie van een vele malen kleinere hoeveelheid virus, dan mag men verwachten, dat de reactie *vertraagd* zou worden in vergelijking met de contrôle; het tegenovergestelde is juist het geval.

III. Indien de staph. infectie voorafgaat aan die met de filtreerbare smetstof is de mitigeerende invloed van de eerste op de tweede nog sterker dan wanneer de infectie gelijktijdig optreedt. In vivo kan er van een mechanische adsorptie heelemaal geen sprake zijn.

IV. Niet alleen een levende ontstekingverwekker bezit genoemde antagonistische eigenschap, doch ook een niet-corpusculaire stof, zooals terpentijn.

V. Niet alleen is er sprake van een antagonisme tusschen etterbacteriën en vaccinevirus, doch hetzelfde komt voor bij bacterieele menginfecties. Dr. J. R. F. RASSERS heeft er op gewezen, dat miltvuur bij den mensch een zeer ernstig verloop heeft, indien het zich voordoet als een zuivere anthrax; lokaal miltvuur nam hij waar indien, behalve bac. anthracis, tevens bac. coli of proteus in de pustel aangetoond konden worden. Hetzelfde hebben reeds vroeger PASTEUR, KOCH, BOUCHARD, FRANK en DOEHLE waargenomen.

Zoolang men omtrent de mogelijkheid van het veranderen der eigenschappen van het vaccinevirus door het bacterie-steriel kweken geen zekerheid heeft, lijkt mij de empirische wijze van vermenigvuldigen op de buikhuid van het kalf, waarbij steriliteit is uitgesloten, veiliger. Dit onderzoek wijst juist op een gunstige invloed der geassocieerde kiemen op den aard van de vaccinereactie.



## SAMENVATTING.

De pogingen om de vaccine zoo steriel mogelijk te maken, deden de vraag rijzen, of deze steriliteit misschien oorzaak zou kunnen zijn van de vermeerdering van de post-vaccinale encephalitis en van de sterke reactie, die de cutane enting tegenwoordig veelal geeft. Ten einde de beteekenis der bacterieele verontreiniging na te gaan werden onderzocht:

- a.* de Leidsche koepokstof van Prof. GORTER.
- b.* een dermovaccinestam Amsterdam.
- c.* neurolapine gekweekt uit *b.*

*a.* De Leidsche stam geeft zeer rustige koepokken.

Waarschijnlijk heeft de stof een enkel geval van post vaccinale encephalitis gegeven. Aantal bacteriën meer dan 100.000. Virulentie volgens GROTH 1 : 50.000. Bij talrijke onderzoeken is het nooit gelukt door intracerebrale inspuiting van het konijn een overentbare encephalitis te verwekken.

*b.* De Amsterdamsche stam heeft op (?) inenting 3 gevallen van encephalitis veroorzaakt. Door intracerebrale inspuiting van konijnen is uit deze stam een neurovaccine (*c*) gekweekt.

Aantal bacteriën per cc ongeveer 1000.

*c.* neurolapine: steriel; encephalitogene eigenschappen in konijnenproef 100 %. Virulentie volgens GROTH 1 : 500.000. Cutane enting van het konijn geeft de typische neurovaccine-reactie.

De vaccine met de meeste bacteriën is in de konijnenproef dus het minst encephalitogeen.

De oorzaak voor het verschil in bacterie-gehalte tusschen de dermovaccines kan gelegen zijn in:

- a.* leeftijd der kalveren;
- b.* hoedanigheid der kalveren, (voedingstoestand);
- c.* plaats van enting;
- d.* stof waarmee geënt wordt.

Het verschil in bacterie-gehalte tusschen den Amsterdamschen en den Leidschen stam wordt vooral gezocht in de plaats van enting (Leidsche vaccine op huid van buik en binnenkant der dijen, Amsterdamsche vaccine op huid van de flank).



Onderzocht werd de invloed van toevoeging van uit dermo-vaccine gekweekte bacteriën op neurovaccine. Het bleek hierbij, dat de reactie op intradermale neurolapine-inspuiting minder hevig is en sneller afloopt, indien de neurolapine vermengd is met weinig pathogene staphylococcen. (De reactie heeft groote overeenkomst met die, welke na enting met dermovaccine optreedt). De immuniteit treedt evenwel niet eerder op dan bij enting met bacterie-steriele neurovaccine. Ook toevoeging van andere bacteriën hebben een zelfde uitwerking. Toevoeging van gedooide staphylococcen heeft niet een mitigeerende werking op neurovaccine, zoodat de werking niet kan worden toegeschreven aan virusadsorptie aan bacteriën (STEVENSON en BUTLER).

Mitigeerende werking kan gevolg zijn van:

a. Verandering van de wijze, waarop het organisme onder invloed van de ontsteking reageert. Dit is niet aan te nemen, aangezien een infectie met staphylococcen geen wijziging van de reactie geeft, indien met bacterie-steriele neurovaccine op een andere plaats van de huid geënt wordt.

b. De plaatselijke ontsteking geeft een mitigeerende werking. Hiervoor pleit:

1e. Wanneer door staphylococcen een plaatselijke ontsteking wordt opgewekt en daarna in het ontstoken gebied met bacterie-steriele neurovaccine geënt wordt, treedt een gemitigeerde reactie op.

2e. Een gemitigeerde reactie treedt ook op, indien een locale ontsteking door chemische stoffen m. n. terpentijn wordt opgewekt en in het ontstekingsgebied met bacterievrije neurovaccine wordt geënt.

3e. Volgens de literatuur geeft de vaccinatie van kinderen op de plaats van een kleine brandwond een zeer „rustige” pokpuist.

Gewezen wordt op de beteekenis der leucocyten, die volgens de onderzoekingen van WILSON SMITH een bijzondere affiniteit voor het virus hebben. Worden de leucocyten door inspuiting van benzol aan het bloed onttrokken, dan verloopt de neuro-vaccine-reactie veel ernstiger.



De leucocyten kunnen op verschillende manieren de reactie op enting met vaccine mitigeeren.

1e. De leucocyten vormen een wal, waardoor het ingebrachte virus moeilijk in de circulatie kan worden opgenomen.

2e. In de leucocyten en de andere elementen van het reticulo-endothecale systeem ter plaatse, kunnen antistoffen gevormd worden.

3e. Door de leucocyten worden oxydatieve fermenten gevormd, waardoor de zuurstofspanning ter plaatse dermate gewijzigd wordt, dat snelle vermeerdering van de neurovaccine daar niet mogelijk is. Gewezen wordt in dit verband op de onderzoekingen van PASCHEN, GINS, LEDINGHAM, die aantoonde dat de gevoeligheid voor zuurstof bij neuro- en dermovaccine niet gelijk is.

Onder invloed van de ontsteking-verwekkende stoffen nadert de reactie op enting met neurovaccine, die op enting met dermovaccine. Toch kan door de verontreiniging met bacteriën het verschil tusschen neuro- en dermovaccine niet geheel verklaard worden: steriel gemaakte dermovaccine krijgt niet de eigenschappen van neurovaccine. Waarop berust het verschil tusschen neuro- en dermovaccine dan wel?

Wellicht moet dit verschil gezocht worden in bovengenoemd onderscheid in gevoeligheid voor zuurstof. Dermovaccine vermeerdert zich gemakkelijk in de zuurstofrijke bovenste huidlagen, maar niet in het zuurstofarme intern, neurovaccine daarentegen woekert vooral in zuurstofarme omgeving en geeft dus een generalisatie.

Dit verschil in hoeveelheid virus in het organisme en het verschil in de plaatselijke ophooping moeten ook verschil in reactie veroorzaken: bij dermovaccine spoedig optredende locale reactie, bij neurovaccine een later optreden van een zeer sterke reactie. Na enting met neurovaccine is het virus, door het later ontstaan van antistoffen langer in het organisme aan te toonen dan na enting met dermovaccine. De hoeveelheid humorale antistoffen, die gevormd worden, is na neurovaccine-infectie aanzienlijk grooter dan na enting met dermovaccine.



De succesvolle pogingen om vaccinevirus zoo bacterievrij mogelijk te maken hebben niet geleid tot een minder heftige plaatselijke reactie bij de inentelingen en evenmin tot een vermindering van het aantal gevallen van postvaccinale encephalitis. Neurovaccine gebracht in de huid van een konijn, geeft aanleiding tot een heftige plaatselijke reactie, gevolgd door necrose en een gegeneraliseerde vaccinia, die dikwijls den dood ten gevolge heeft.

Werden aan neurovaccine staphylococcen, gekweekt uit dermovaccine, toegevoegd, dan ontstond op de plaats van enting een rustige pokpuist, terwijl de sterke generalisatie uitbleef.

De vraag is dus gewettigd of het aanbeveling verdient de, sedert meer dan een eeuw toegepaste methode van koepokstofbereiding te verlaten.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

Die Bemühungen, den Pockenimpfstoff möglichst steril herzustellen, liessen die Frage entstehen, ob diese Sterilität vielleicht die Ursache der Zunahme der postvaccinalen Encephalitis und der starken Reaktionen sein könnte, die die Hautimpfung gegenwärtig vielfach hervorruft. Um die Bedeutung der bakteriellen Verunreinigung zu prüfen, wurden Impfstoffe verschiedenen Bakteriengehalts untersucht, nämlich:

1. der Leidensche Kuhpockenimpfstoff von Prof. Gorter,
2. ein Dermovaccinestamm aus Amsterdam,
3. Neurolapine, gewonnen aus 2.

zu 1. Der Leidensche Impfstoff enthielt in 1g über 100.000 Keime. Seine Virulenz nach Groth betrug 1:50.000. Dieser Impfstoff verursacht sehr schwache Kuhpocken. Wir wissen nur von einem Falle unter Tausenden von Impfungen, der möglicherweise als Encephalitis postvaccinalis nach diesem Impfstoff aufzufassen wäre. Auch im Experiment ist es uns bei zahlreichen Versuchen nie geglückt, durch intracerebrale Impfung von Kaninchen eine Encephalitis hervorzurufen.

zu 2. Der Amsterdamer Stamm enthielt erheblich weniger, nämlich in der gleichen Menge Impfstoff unter 1000 Keime.



Seine Virulenz nach GROTH betrug 1:10.000. Der Impfstoff macht in der Regel ziemlich starke Reaktionen. Unter (?) Fällen von Impfung beim Menschen sind 3 Fälle von Encephalitis postvaccinalis entstanden. Im Tierversuch am Kaninchen machte der Impfstoff regelmässig eine Encephalitis. Aus dem Gehirn eines encephalitischen Kaninchen wurde eine Neuro-lapine gewonnen, die bakterienfrei war (Impfstoff 3).

zu 3. Die sterile Neurovaccine verursacht beim Kaninchen in 100 % Encephalitis. Die Virulenz nach GROTH betrug 1 : 500.000.

Im Kaninchenversuch hatte also die Vaccine mit den meisten Bakterien die geringsten encephalitogenen Eigenschaften.

Woher stammt der verschiedene Bakteriengehalt der Dermovaccinen? Er kann herrühren:

1. von Alter der Kälber.
2. von Ernährungs- (Fütterungs-) Zustand,
3. von der Wahl der Impfstelle,
4. vom eingepfchten Material.

Bei Prüfung dieser Möglichkeiten ergab sich, dass der Unterschied im Bakteriengehalt in erster Linie auf die Wahl der Impfstelle zurückgeführt werden muss. Der Leidensche Impfstoff wird auf der Haut des Bauches und der Innenseite der Schenkel gewonnen, die Amsterdamer Vaccine auf der Haut der Flanke.

Zum Beweise des Einflusses des Reaktionsgehalts auf die Stärke der Reaktionen wurde Neurovaccine künstlich mit Staphylococcen gemischt. Beim Vergleich der sterilen Vaccine und der Staphylococcenvaccine ergab sich, dass die mit schwachpathogenen Staphylococcen vermischte Neurovaccine deutlich geringere Reaktionen macht, die schneller ablaufen, als die sterile Neurovaccine. Die Reaktion hat grosse Ähnlichkeit mit derjenigen, die nach Einimpfung von Dermovaccine auftritt. Die Immunität tritt jedoch nicht früher auf, als bei Impfung mit bakterienfreier Neurovaccine.



Auch die Zugabe anderer lebender Bakterien hat die gleiche Wirkung. Zugabe von abgetöteten Staphylococcen hat jedoch keinen abschwächenden Einfluss auf Neurovaccine.

Die Wirkung kann daher nicht der Adsorption des Virus an die Bakterien zugeschrieben werden, wie es STEVENSON und BUTLER vermutet haben. Die durch die lebenden Bakterien hervorgerufene abschwächende Wirkung konnte die Folge sein von:

1. veränderter Reaktionsweise des Gesamt-Organismus unter dem Einfluss der Entzündung. Dies ist nicht anzunehmen. Denn impft man gleichzeitig, aber an verschiedenen Körperstellen, Staphylococcen und bakterienfreie Neurovaccine ein, dann tritt keine Änderung der Reaktion ein.

2. der örtlichen Entzündung. Hierfür spricht:

- a. Wenn man mit Staphylococcen eine örtliche Entzündung hervorruft und danach in das entzündete Gebiet bakterienfreie Neurovaccine einimpft, läuft die Reaktion auf die Neurovaccine erheblich schwächer ab.

- b. Eine abgeschwächte Reaktion tritt auch dann auf, wenn die lokale Entzündung durch chemische Stoffe z. B. Terpentin hervorgerufen wird und in das entzündete Gebiet bakterienfreie Neurovaccine eingeimpft wird.

- c. Nach Literaturangaben gibt die in Rumänien geübte Vaccination an Hautstellen mit kleinen Brandwunden sehr schwache Pockenpusteln.

Für die Erklärung der abschwächenden Wirkung der lokalen Entzündung schienen in ersten Linie die Leucocyten verantwortlich zu sein.

WILSON SMITH hat gefunden, dass die Leucocyten eine besondere Affinität zu dem Virus haben. Es zeigte sich bei Kaninchen, dass die Neurovaccine-Reaktion, wenn die Leucocyten durch Einspritzung von BENZOL in die Blutbahn ausgeschaltet wurden, viel schwerer verlief.

Wenn also den Leucocyten der entscheidende Einfluss auf die Stärke der Reaktion zugemessen werden muss, so könnte diese Wirkung verschieden erklärt werden:

1. Die Leukocyten könnten einen Wall bilden, wodurch das



eingebraachte Virus schwerer in die Zirkulation aufgenommen würde.

2. In den Leukocyten und anderen Elementen des reticulo-endothelialen Systems an der Impfstelle könnten Antistoffe gebildet werden.

3. Durch die Leukocyten könnten oxydative Fermente gebildet werden, wodurch die Sauerstoffspannung an der Impfstelle geändert wird, sodass eine schnelle Vermehrung der Neurovaccine dort nicht möglich ist, Auf diese Erklärungsmöglichkeit weisen die Untersuchungen von PASCHEN, GINS, LEDINGHAM hin, nach denen das Sauerstoffbedürfnis der Dermovaccine erheblich grösser als das der Neurovaccine ist. Wenn also unter dem Einfluss der die Entzündung begleitenden Leukocytose der örtliche Sauerstoff erheblich absinkt, dann hat die Dermovaccine keine Aussicht mehr auf Vermehrung. Die Neurovaccine ist in der Vermehrungsfähigkeit geschwächt und veruracht daher nur eine schwache Reaktion, die der Reaktion der Dermovaccine auf gesunder Haut ähnelt.

Da auch unabhängig vom Bakteriengehalt die Wirkungsweise der Dermo- und Neurovaccine eine verschiedene bleibt — steril gemachte Dermovaccine wirkt nicht wie Neurovaccine — so haben wir den Mechanismus der Antikörperbildung bei den beiden Virusarten geprüft. Hierbei zeigte sich, dass nach Dermovaccine-Infektion die humoralen Antikörper schnell auftreten, aber nur eine mässige Zahl erreichen, dass bei Neurovaccine-Infektion die Antikörperbildung später einsetzt, dagegen einen erheblich höheren, mehr als 50 fachen Wert erreicht.

#### SYNOPSIS.

The successful attempts to make vaccine-virus as free from bacteria as possible have not led to a less violent local reaction with those inoculated and no more to a decrease of the number of cases of post-vaccinal encephalitis. Neurovaccine inserted into the skin of a rabbit leads to a violent local reaction followed by necrosis and a generalized vaccinia often resulting in death.

In case staphylococci cultivated from dermovaccine were added to neurovaccine, there arose at the place of inoculation



a quiet pock, strong generalization not being forthcoming.

The question is justified, therefore, whether it is recommendable to abandon the method of the preparation of cow-pox matter which has been applied for more than a century.

### RÉSUMÉ.

Les efforts qu' on s' est donnés, et avec succès, pour dégager autant que possible le virus jennérien de microbes, n' ont pas abouti à une réaction moins violente chez les vaccinés et non plus à une diminuation du nombre de cas d' encéphalite post-vaccinale. Le neuro-vaccin, introduit dans la peau d' un lapin, donne lieu à une réaction locale violente, suivie d' une nécrose et d' une éruption généralisée de pustules qui mène souvent à la mort.

Cependant quand on ajoutait au neuro-vaccin des staphylocoques cultivés d' un dermo-vaccin, une pustule peu virulente se produisait à l' endroit de l' inoculation, cependant sans la forte généralisation.

On est donc autorisé de se demander s' il est recommandable de modifier la méthode de préparer le vaccin jennérien appliqué depuis plus d' un siècle.

---



## OVER EEN SERUM TEGEN HONDENZIEKTE

DOOR

A. T. V. D. SCHAAF,  
dierenarts.

---

Hondenziekte is geen verzamelbegrip van pathologische toestanden bij honden, het is een eenheid evenals mazelen, griep, mond- en klauwzeer, varkenspest.

De ziekte wordt primair veroorzaakt door een *filtreerbaar virus*. DUNKIN & LAIDLAW te Mill Hill hebben dit na CARRÉ, PUNTONI en verschillende andere onderzoekers onomstootelijk vastgesteld. Infectieus materiaal zooals bloed, organen en neusslijm van zieke honden blijft haar virulentie kwalitatief behouden wanneer het Pasteur Chamberland L 2 filters is gepasseerd. In het filtraat kunnen noch microscopisch noch cultureel bacteriën worden aangetoond.

Meerdere onderzoekers meenden, dat, door hen geïsoleerde bacteriën als oorzakelijk moment bij hondenziekte beteekenis hadden. Het is gebleken, dat dit niet juist is. Microörganismen zooals de *Bac. bronchisepticus* van FERRY kunnen zelfstandig geen hondenziekte opwekken, ze kunnen echter wel pathognomonisch van beteekenis zijn als secundair-infecties.

Dit gevreesde koppel van filtreerbaar virus + bacterie is te vergelijken met dat van de griep van den mensch. De ziektebeelden vertoonen eenige overeenkomst. Bij beide nemen we waar een snel oplopende lichaamstemperatuur, gepaard gaande met, in de eerste plaats een catarrhale aandoening van het slijmvlies der voorste luchtwegen. Bij griep blijft het vaak hierbij, bij hondenziekte bijna nooit, hierbij treden tevens een maagdarccatarrh en conjunctivitis op.



Bij griep zijn gevreesde complicaties betrekkelijk zelden, bij hondenziekte daarentegen frequent.

Een *haemo-purulente gastro-enteritis* komt het meest voor, doch is betrekkelijk zelden oorzaak van de hoge mortaliteit. Als zoodanig zijn de *etterige broncho-pleuro-pneumonie* en *encephalitis* aan te merken. De laatste is vooral merkwaardig en hebben mij het eerst tot dit onderzoek gebracht. Merkwaardig is deze encephalitis, omdat ze vaak optreedt als het dier reeds herstellende is. De oorzaak van dit lijden ligt nog in het duister; in de hersenen worden geen bacteriën en meestal ook geen hondenziektevirus gevonden. Mijns inziens moet als oorzaak der encephalitis een *abacterieele noxe* aangenomen worden. De ziekte vertoont een opmerkelijke analogie met de menselijke postinfectieuze encephalitiden.

De punten van overeenkomst tusschen griep en hondenziekte hebben de meening doen post vatten, dat de ziekten aan elkaar verwant waren, zooals b.v. variola en epithelioma contagiosa der vogels. Persoonlijk is mij opgevallen in de praktijk, dat in een huisgezin, waar de hond hondenziekte heeft, vaak een of meer leden aan griep hebben geleden.

Merkwaardig is het onlangs verschenen artikel in „The Journ. of the Americ. Medic. Ass.” van EICHORN en PYLE (*Observations on the relationship of the virus of human influenza and dog-distemper*). De onderzoekers hebben vastgesteld, dat fretten, die hersteld waren van een infectie met het influenzavirus gedeeltelijk of geheel onvatbaar waren voor hondenziekte.

Een duidelijk *verschilpunt* tusschen griep en hondenziekte is de graad en duur der immuniteit.

Hondenziekte geeft een langdurige immuniteit evenals pokken en mazelen bij den mensch.

De kort-durende immuniteit bij griep wordt wel geweten aan weinig antigene eigenschappen van het virus of aan infecties met immunologisch niet-verwante griepvira.

Bij hondenziekte is het niet gelukt om, zooals bij mond- en klauwzeer wel het geval is, verschillende stammen aan te toonen. In veeartsenijkundige kringen hier te lande zijn evenwel stemmen opgegaan over de geringe werkzaamheid van het Engelsche



anti-distemper serum. Een verschil in waardeering zou gemakkelijk kunnen ontstaan, indien hier te lande een ander virus de hondenziekte veroorzaakt dan in Engeland.

Bij mijn onderzoek werd ik in de eerste plaats voor de vraag gesteld: *Is er een hoedanigheidsverschil aan te toonen tusschen het Engelsche distemper-virus en het Hollandsche hondenziekte-virus?*

Hierbij valt te letten op verschil in:

- |                  |   |                    |
|------------------|---|--------------------|
| a. Pathogeniteit | } | kliniek            |
|                  |   | patholog. anatomie |
|                  |   | experiment.        |

b. Immuniteit.

Wat de pathogeniteit betreft bleek er geen duidelijk verschil aanwezig te zijn. Twee proefhonden van  $\pm 4$  mnd. kregen na 1 nacht contact met een hondje, klinisch lijdende aan hondenziekte, in verloop van 4 dagen de eerste verschijnselen van de ziekte: temperatuursverhooging tot 40.3; 9 dagen na de infectie trad bij beide rhinitis, conjunctivitis en laryngo-tracheïtis op; de volgende dagen hadden beide honden diarree, de eetlust bleef vrij goed tot resp. 3 à 4 weken na de infectie, toen de dieren de eerste verschijnselen van pneumonie vertoonden. Bij beide werden vervolgens verschijnselen van hersen-prikkeling waargenomen in den vorm van epileptiforme aanvallen.

De eene hond stierf 25 dagen p. i. en de andere 29 dagen p. i.

De sectie bevestigde de diagnose: etterige broncho-pleuropneumonie.

Van een dezer twee honden werd 4 dagen p. i. 5 cc. bloed afgetapt en subcutaan ingespoten bij een fret. Het bloed was bacterie-steriel. De fret kreeg na 5 dagen de eerste ziekteverschijnselen: hooge temp., conjunctivitis en rhinitis, na 9 dagen diarree; geen eetlust. Het dier is toen afgemaakt; de inw. organen waren steriel. Milt, een stuk lever en mesenteriale lymphklieren zijn gedroogd in vacuum; ze bleken daarna nog virus-houdend te zijn.

Het ziekte-beeld stemt geheel overeen met dat van Engelsche zijde is beschreven. Een fret subcutaan ingespoten met distemper-virus betrokken van de „Wellcome Physiological Research Laboratories” ontwikkelde geheel hetzelfde ziektebeeld. Ook dit dier werd na 10 dagen afgemaakt



(voortgezette chloroformnarcose onder een stolp). De inw. organen, die eveneens bacterieel steriel waren, werden gedroogd in vacuum en vervolgens bij ongeveer 0° C. in vacuum bewaard.

Dus valt er noch bij de hond noch bij de fret eenig verschil in pathogeniteit tusschen het Hollandsche en Engelsche hondenziektevirus waar te nemen.

#### *Immuniteit.*

Men identificeert bacteriën, resp. filtreerbare virussoorten o.a. op grond van hun antigene eigenschappen. De antigene eigenschappen, die bij het hondenziekte-virus kunnen worden nagegaan betreffen o.a. de onvatbaarheid na een doorgestane infectie. Deze is als volgt onderzocht:

Twee jonge honden zijn gevaccineerd volgens de vaccine-virusmethode van DUNKIN & LAIDLAW, de entstoffen waren uit den handel betrokken.

Twee andere zijn subcutaan ingespoten met het Hollandsche hondenziekte-virus van fret 939. Deze honden kregen een lichte vorm van hondenziekte en genazen. De 2 gevaccineerde hebben geen ziekteverschijnselen vertoond.

De genoemde honden werden daarna in contact gebracht met de 2 reeds genoemde aan hondenziekte lijdenden dieren. Bovendien werden ze kunstmatig besmet, de gevaccineerde met Hollandsch virus en de twee, die hondenziekte hadden door-gemaakt, met Engelsch virus. Alle vier zijn gezond gebleven.

Er is dus ook geen verschil in immunogene werking tusschen het Engelsche en het Hollandsche hondenziektevirus.

#### *Het aantoonen van antistoffen in anti-hondenziekteserum.*

Aan DUNKIN & LAIDLAW is het gelukt een hyper-immuun-serum te bereiden, dat van groote therapeutische en prophylactische beteekenis is. Hoewel blijkbaar hier te lande niet alle dierenartsen op dit standpunt staan, kan ik niet ontkennen, dat het serum, in het begin toegepast, in de hoeveelheid van 10—20 cc vaak een zeer gunstige werking heeft.

Het is mij gelukt om zelf een serum te bereiden, dat in het



laboratorium-experiment en in de praktijk in staat bleek de beginnende hondenziekte zeer snel tot stilstand te brengen.

Voor deze serumbereiding is het noodzakelijk, dat men de beschikking heeft over: *a. honden van het groote type, die nog niet immuun zijn*, en *b. houdbaar hondenziektevirus*.

Het eerste is niet zoo makkelijk als het op het eerste gezicht lijkt. Een paar teleurstellingen hebben mij er toe gebracht alleen zulke honden te gebruiken, die bij de status-*praesens* gezond leken en nog niet de leeftijd van 5 maanden hadden bereikt. Een praktijkervaring is het, dat honden, die beneden dezen leeftijd een hondenziekte-infectie krijgen, niet zóó snel herstellen, dat ze op den leeftijd van 5 maanden een geheel gezonde indruk maken. (Rachitis, chron. conjunctivitis, chronische enteritis met als gevolg abnormale ontlasting zijn het gevolg van hondenziekte op jeugdigen leeftijd).

Volgens DUNKIN en LAIDLAW is het meeste virus in de inwendige organen, milt, lever en mesenteriale lymphklieren aanwezig op den 10de tot de 13e dag na de infectie. Dit bleek ook bij onze proefhonden het geval te zijn. Het virus werd gewonnen door de honden onder morphine-atropine-aether-narcose te laten verbloeden en daarna de milt, een gedeelte der lever en mesenteriale lymphklieren onder aseptische voorzorgen te verwijderen en in fijn verdeelden toestand snel in vacuum boven geconcentreerd zwavelzuur en phosphorpentoxyd te laten drogen. Bij kleine quantiteiten gelukt dit in 24 uur bij kamertemperatuur. Het gedroogde orgaanmateriaal werd vervolgens nog eens fijn gewreven in een steriele mortier en verder in vacuum in ampullen in de electrolux-vrieskast bewaard.

Een gemitigeerde infectie werd ook verkregen op een later te publiceeren methode.

De immunisatie geschiedde aldus. De beschikbare honden werden ingespoten met 50—100 m.gr. gedroogd virus, gesuspenderd in phys. NaCl opl. Hierna ontwikkelde zich de gewone hondenziekte met meestal een incubatie van 4—5 dagen. Was de reactie te zwaar, dan werd de dieren bij de eerste koortstop 10—20 cc anti-serum ingespoten. Meestal waren de dieren 3 weken p. i. geheel genezen, zoodat dan een aanvang genomen



kon worden met de hyperimmunisatie. Deze geschiedde door 3 wekelijksche injecties met respectievelijk 300, 400, en 500 mgr. gedroogd virulent orgaanmateriaal van een hond, die op het hoogtepunt van de infectie (10—12 dagen p. i.) was gedood.

Door deze inspuitingen, vooral de eerste, ontstaan soms groote infiltraten en abscessen, die toegeschreven moeten worden aan de bacteriën, die bijna steeds in het gedroogde materiaal in geringe mate aanwezig waren (staphylococcen en bipolaire bacillen).

De abscessen breken meestal door na 2 à 3 dagen; in den regel lijdt de gezondheidstoestand der honden hieronder weinig.

Een week na de 3de injectie worden de serum-leveranciers, onder morphine-atropine-aether-narcose, verbloed uit de vena jugularis en vervolgens uit de carotis. Een hond van 10 K.G. levert ongeveer 700 cc bloed. Hieruit kan  $\pm$  350 cc serum gewonnen worden.

Zes honden werden elk subcutaan ingespoten met 50 m.gr. virushoudende orgaansuspensie + 10 cc immuun-serum.

Drie andere dieren werden alleen ingespoten met dezelfde hoeveelheid virus.

Het resultaat was, dat de zes eerste gezond gebleven zijn en naderhand immuun bleken te zijn tegen infectie, terwijl van de drie contrôle-honden, twee zijn gestorven aan hondenziekte-pneumonie; de derde is de 11de dag na de infectie, toen hij ziek was, gedood om virus te winnen.

Het was opvallend, dat de twee jongste hondjes ( $\pm$  3 mnd. oud) wel de typische koortstoppen kregen van hondenziekte, doch dat de temperatuur niet die hoogte van de oudere honden bereikte. Het klinische beeld was overigens vrijwel gelijk. Ongeveer 10 dagen na de infectie kregen de dieren diarrhee, conjunctivitis en rhinitis, terwijl ze ongeveer de 5de dag na de infectie de eerste temperatuursstijging vertoonden, minder beweeglijk waren en een mindere eetlust hadden.



*In de praktijk* therapeutisch toegepast gaf het serum ook bevredigende resultaten.

In een kennel, waar hondenziekte heerschte, kregen een Schnauzer en een Schotsche terrier van  $\pm 6$  mnd., 2 bouviërs van 4 mnd., een Schotsche terrier van een jaar, hooge temperatuur, ze hadden weinig eetlust, hyperaemische conjunctivae met sereuse afscheiding. Ze waren loom. Alle dieren zijn subcutaan ingespoten met 20 cc hondenziekteserum + intramusculair 1 ampul „Omnadin”. Ze waren alle in 24 uur koortsvrij en hebben geen ziekte-verschijnselen meer vertoond, hoewel ze in een besmet milieu zijn gebleven.

Een Duitse Herder van 9 mnd. kwam op het spreekuur met de anamnese: sedert gisteren ziek, heeft geen eetlust, heeft een paar maal braakbewegingen gemaakt, ontlasting niet gezien. Bij het onderzoek blijkt het dier een te hooge rectale temperatuur te hebben (39.7), een gevoelige pharynx, een beetje slijmige afscheiding der conjunctivae, die er gezwollen en te rood uitzien; verder geen afwijkingen. Subcutaan werd 20 cc serum toegediend, en intramusculair 1 ampul „Omnadin”. Het dier was na 24 uur koortsvrij en weer monter, en heeft verder geen ziekteverschijnselen vertoond.

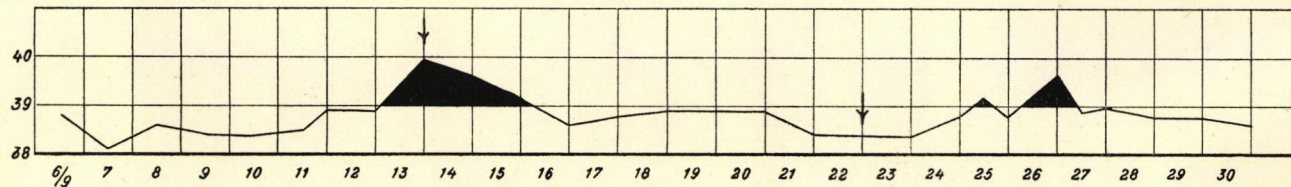
Een Cocker-Spaniel was sedert 2 dagen onwel, loom, had geen lust tot eten en spelen; de conjunctivae waren gezwollen en rood, het keelslijmvlies eveneens en de pharynx pijnlijk; ontlasting was niet gezien. De rectale temperatuur was 40.5 C. De diagnose „acute hondenziekte” werd gesteld. Het dier ingespoten subcutaan met 20 cc serum + 1 ampul „Omnadin” intramusculair hadden het gevolg dat het dier na 24 uur weer monter was en verder geen ziekteverschijnselen heeft vertoond.

Door een toeval bij de aankoop van jonge honden was ik ook in de gelegenheid in het laboratorium de werking van het serum, op het verloop van op een natuurlijke hondenziekte-infectie na te gaan.

Het bleek mij hier, dat ook zonder „Omnadin” het serum een vlot herstel geeft (zie curven).



Nº 1009



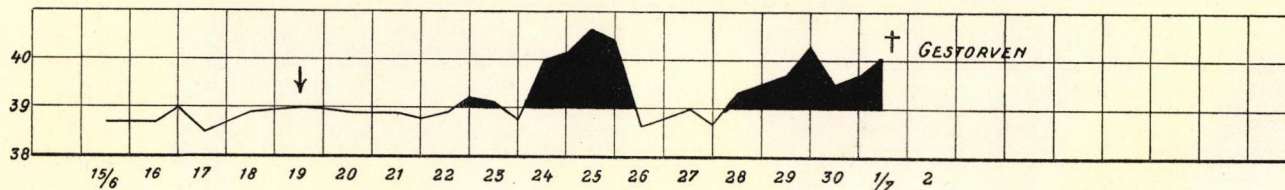
Hond 4 mnd. ruige ooren.

6/9 met hond 1008 in één hok gezeten (hondenziekte-patiënt).

14/4 20 c.c. serum.

23/9 subcutaan virus-suspensie.

Nº 977



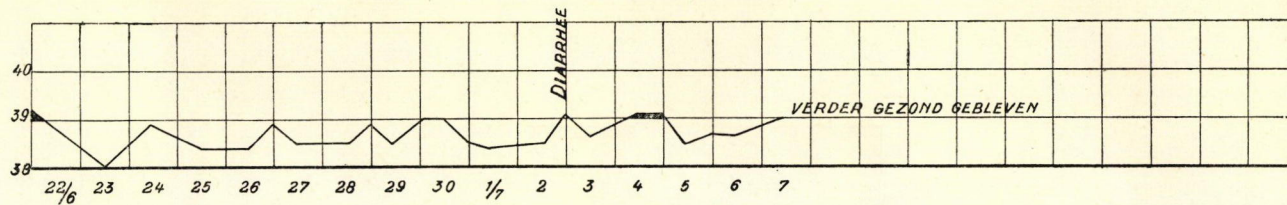
Trekhond.

19/6 conjunctivaal en rhinaal.

besmet met 100 m.gr. distempervirus fret 955.

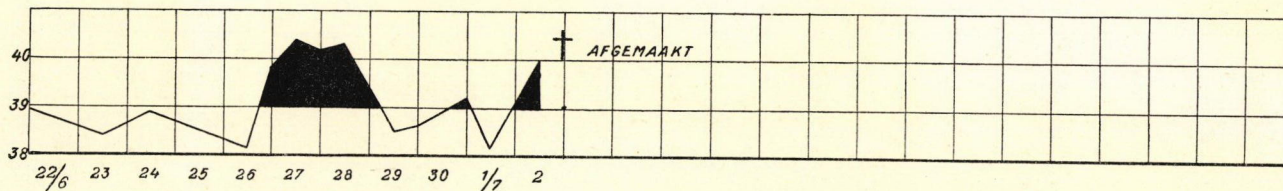


Nº 978



Gladh. foxterrier, zwarte vlekstaart 5 mnd.  
 22/6 subcutaan, 50 m.gr. distempervirus hond 962.  
 10 cc. serum honden 957, 959 en 961.

Nº 979



Gladh. foxterrier, 5 mnd.  
 22/6 subcutaan 50 mgr. distempervirus hond 962.



De conserveering van het serum bracht eerst eenige bezwaren mede,  $\frac{1}{2}$  % phenol in geconcentreerde oplossing toegevoegd gaf neerslagen, 1 ‰ superol gaf geen voldoende waarborg voor steriliteit.  $\frac{1}{2}$  % phenol toegevoegd als 5 % oplossing gaf de meest bevredigende resultaten. Het geeft geen of geringe neerslagen en conserveert voldoende, de titer van het serum daalt echter met  $\frac{1}{10}$  door de vloeistoftoevoeging.

Het serum wordt zoo lang de voorraad strekt ter beschikking gesteld van dierenartsen tegen de kostende prijs van f 2.50 per 10 cc.

#### SAMENVATTING.

Door kruis-immunitetsproeven wordt aangetoond, dat er geen verschil is tusschen het Hollandsche en Engelsche hondenziektevirus (virus van CARRÉ).

Bij fretten en honden geven beide vira hetzelfde ziektebeeld.

Door hyperimmunisatie van honden, gelukte het van deze dieren een immuunserum te winnen, dat in het laboratorium-experiment en in de praktijk in staat bleek, de hondenziekte-infectie te voorkomen en, in het beginstadium, de ziekte therapeutisch zoodanig te beïnvloeden, dat een veel lichter verloop plaats vindt.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

Immunitätsversuche beweisen, dass es keinen Unterschied gibt zwischen dem Holländischen und dem Englischen Hundestaupevirus (CARRÉ'sche Krankheit). Beide Vira geben bei Hunden und bei Frettchen das gleiche Krankheitsbild.

Durch Hyperimmunisation von Hunden gelang es, ein Antiserum zu bereiten, das im Experiment und in der Praxis im Stande war, Hunde gegen Infektion mit dem CARRÉ'schen Virus zu schützen. Das Serum hat im ersten Stadium der Krankheit eine therapeutische Wirkung.

#### SYNOPSIS.

It has been demonstrated by cross immunity-experiments that there is no difference between the distemper-virus of Dutch and English dogs (virus of CARRÉ).



With ferrets and dogs both vira give the same syndrome.

By means of hyper-immunization of dogs it became possible to obtain for these animals an immune-serum, which both in the laboratoryexperiment and in practice proved capable of preventing distemperinfection and of therapeutically influencing the disease in its initial stage in such a way that it pursued a much milder course.

### RÉSUMÉ.

On a démontré par des expérimentations croisées d'immunité qu'il n'y a pas de différence entre le virus hollandais et anglais de la maladie de jeune chien (virus de CARRÉ).

Chez les furets et les chiens les deux virus donnent le même syndrome.

En immunisant des chiens à un très haut degré on réussit à trouver pour ces animaux un sérum immunisateur capable — dans le laboratoire comme dans la pratique — de prévenir l'infection de la maladie de jeune chien et d'exercer sur le premier stade de la maladie une influence thérapeutique au point d'en atténuer la marche considérablement.

### LITERATUUR.

CARRÉ, H. 1905 C.R. Acad. Sci. Paris 140 689 en 1489.

FERRY, N. S. 1911 J. infect. Dis. 8, 399.

LAIDLAW, P. P. en DUNKIN, G. W. 1926 J. comp. Path. 39, 222, 41, en 209.

EICHHORN, A. en PYLE, N. J. 1934, J. of the Americ. med. Ass. 102, p. 2082.



# POST-INFECTIEUSE ENCEPHALITIS BIJ DEN HOND

DOOR

A. T. V. D. SCHAAF,  
dierenarts

---

Over encephalitis na infectie met filtreerbare smetstoffen is de laatste jaren veel geschreven. Behalve encephalitis na koepokenting en pokken, kent men deze ook na mazelen, waterpokken, bof; misschien behoort de griep-encephalitis, hoewel ze een meer haemorrhagisch karakter heeft, ook tot deze groep.

Bij de dieren is over post-infectieuze encephalitis niet veel bekend; een uitzondering moet gemaakt worden voor de hondenziekte-encephalitis.

Wat het optreden betreft moet men deze ook rekenen tot een *naziekte*. In de oude literatuur noemt men deze het derde stadium van hondenziekte en wel het meest gevreesde, daar de genezingskans slechts gering is.

*Klinisch* uit zich deze encephalitis op zeer verschillende wijze, varieerend van een chorea minor, lichte ataxie tot een totale paralyse en epileptiforme aanvallen met sterke excitatie.

Over de liquordruk zijn weinig gegevens te vinden.

*Bacteriologisch* onderzoek der hersenen levert geen resultaten op; soms treft men het hondenziektevirus aan, vaak ook niet.

*Pathologisch-anatomische* afwijkingen zijn minder uitgebreid dan men, gezien het klinische beeld der ziekte, zou verwachten. De liquor is nooit etterig, maar helder en bevat weinig cellen.

*Microscopisch* blijken er echter toch belangrijke afwijkingen aanwezig te zijn.

Door de Roemenen, MARINESCO, DRAGANESCO en STROESCO zijn het vorig jaar belangrijke onderzoeken verricht over de



histo-pathologie dezer encephalitis. Volgens deze onderzoekers wordt zoowel de grijze als de witte substantie van het centrale zenuwstelsel aangetast. In het ruggemerg is het vooral het grijze deel, in het cerebrum meer het witte gedeelte, dat belangrijke afwijkingen vertoont. De ontsteking uit zich in de eerste plaats als perivasculaire infiltratie met lymphocyten, plasma-cellen en later ook gliacellen. Bijna alle bloedvaten vertoonen afwijkingen; in de hersenen zijn vooral de basis cerebri, dus de witte substantie aangetast, b.v. ovale lichaam, corpus callosum en capsula interna; de hippocampus en Ammonshoorn behooren tot de grijze substantie, die nog al eens is aangedaan. Vaak ziet men ook lichte perivasculaire infiltraten in de pia en om de vaten, die van de meningen de hersenen indringen.

*Demyelinisatie* om de vaten gaat steeds gepaard met perivasculaire infiltratie. Uitgebreide Lückenfelder kan men waarnemen in de pyramidebanen en de groote commissuren.

Genoemde schrijvers zijn van meening dat deze encephalitis het meest gelijkt op de menschelijke post-infectieuze hersenruggemergs-ontsteking.

DUNKIN en LAIDLAW onderscheiden 2 vormen van hondenziekte-encephalitis n.l. een acute, tijdens de ziekte en een subacute tot chronische vorm, die optreedt, als de dieren reeds hersteld zijn van de gastro-enteritis.

Bij de eerste vindt men slechts geringe afwijkingen, een hersenoedeem, geringe ophooping van mono-nucleairen, vaak bloedingen in hersenen en vliezen. De hersenen zijn bacteriologisch steriel maar bevatten wel het hondenziekte-virus.

Bij den tweeden vorm, vooral beschreven door PUGH, die optreedt 1 à 2 maanden na het begin der ziekte, als de slijmvlies-aandoeningen reeds zijn genezen, ziet men vaak uitgebreide perivasculaire infiltraten optreden. De hersenen bevatten geen bacteriën en ook geen hondenziektevirus.

In de praktijk was ik herhaaldelijk in de gelegenheid encephalitis na hondenziekte waar te nemen.

De eerste patient, een bouvier van 3 jaar oud, teef, waarop hersen-sectie kon worden verricht, had na een vrij hevige honden-



ziekte-enteritis een duidelijke ataxie, eerst van de achterste, daarna ook van de voorste ledematen gekregen. Het dier gedroeg zich ongeveer als een hond zonder kleine hersenen. (Proefdier van Prof. RADEMAKER). Het microscopisch onderzoek toonde aan, dat er uitgebreide perivasculaire infiltraten rond de vaten in de medulla en het cerebrum waren; in dit gedeelte was het vooral de witte substantie, die aangedaan was.

Bij twee volgende patienten, die beide ook zware psychische stoornissen vertoonden, waren de perivasculaire manchons veel kleiner; echter was bijna elk vat aangedaan. Bij deze dieren werd ook bloed buiten de vaten waargenomen.

De drie laatste en tevens jongste patienten zijn vanwege de ongunstige prognose in een vroeg stadium gedood.

De afwijkingen bestonden uitsluitend uit kleine perivasculaire celophooping en haemorrhagiën. Vaak werden zeer veel ontstekingscellen in de hersenvaten aangetroffen.

Het histologisch beeld der hersenen van genoemde honden vertoonde dus veel overeenkomst met dat, wat door de Roemeensche onderzoekers is vastgesteld. Voor ik van het genoemde artikel had kennis genomen, was ook mij reeds de overeenkomst met de post-vaccinale encephalitis opgevallen.

Dr. RASSERS heeft in 1931 uitgebreide proeven gepubliceerd over experimenteele encephalitis post-vaccinationem bij honden.

Hij was tot de keuze van den hond als proefdier gekomen, nadat zich in zijn konijnenstal een spontane encephalitis had openbaard, die herinnerde aan de post-vaccinale.

Door zijn keuze te bepalen op den jongen hond is hij echter naar mijn meening van den regen in den drop gekomen.

Encephalitis bij jonge honden kan men bijna voortdurend in de praktijk waarnemen.

De slijmvliesaandoeningen bij hondenziekte treden juist bij jonge honden vaak sterk op den achtergrond; de eetlust blijft bijna steeds goed, vaak treedt de encephalitis op zonder dat er ook maar iets van oog-slijmvlies-ettering of diarrhoe valt te bespeuren.

Rachitis treedt bij hondenziekte altijd zeer sterk op. Een nauwkeurige lezing der protocollen doet vermoeden, dat



Dr. RASSERS een hondenziekte-infectie in zijn stal heeft gehad.

Voor deze proeven is de hond wel te gebruiken, maar dan moet men hondenziekte uit kunnen sluiten. Dit is alleen te doen door praeventieve enting der proefdieren of door zulke te gebruiken die zeker van hondenziekte zijn genezen.

Daar ik over zulke honden beschikte, heb ik in overleg met Dr. RASSERS deze honden voor een voederproef met overmatig veel zout bestemd. Twee jonge honden van  $\pm 4$  maanden oud, Pinchers, volgens methode DUNKIN & LAIDLAW gevaccineerd tegen hondenziekte, kregen na gebleken onvatbaarheid respectievelijk 8 en 10 gram zout per dag gedurende 8 weken. Twee Fox-terriers van denzelfden leeftijd, die volkomen hersteld waren van hondenziekte, werden eveneens dagelijks 10 gram zout, door het eten verwerkt.

Het voedsel bestond uit 200 gram rauw paardenvleesch + gekookte rijst +  $\frac{1}{2}$  L. ondermelk.

De dieren hebben deze voeding uitstekend verdragen, hadden nooit diarrhee.

De 2 eerste honden werden aan het einde van de proef geënt met dermo-vaccine kalf 482 (5 scarificaties). Ze vertoonden als entreactie na 5 dagen kleine pustels met een blaasje, dat spoedig indroogde; een area is niet waargenomen, evenmin een temperatuurstijging.

De dieren zijn nog 4 weken in observatie gehouden, terwijl ze steeds hun 10 gram zout dagelijks toebedeeld kregen. Geen enkel ziekteverschijnsel van de kant van het centrale zenuwstelsel werd waargenomen.

De 2 Fox-terriers werden na 8 weken zout te hebben gekregen, eerst met virulente neurolapine geënt (scarificatie), doch deze sloeg niet aan, daarna met dermo-vaccine kalf 482, met hetzelfde resultaat als bij de 2 andere dieren, dus een koortsloos verloop, geen area-vorming en geen neurologische afwijkingen merkbaar.

Het is dus niet gelukt om bij 4 honden, door een zoutrijk en kalkarm dieet, na koepokenting post-vaccinale encephalitis op te wekken.

Er ontbreekt nog een belangrijke contrôle-proef n.l. deze:



Jonge honden, die niet immuun zijn tegen hondenziekte gedurende de vereischte tijd met een zoutrijk dieet te voeden en daarna te onderwerpen aan een natuurlijke hondenziekte-infectie.

Misschien ligt de oplossing van het probleem der pathogenese van de hondenziekte-encephalitis in deze richting, zeker speelt de voeding hierbij een belangrijke rol.

Of men voor de post-vaccinale encephalitis, die dus histopathologisch veel overeenkomst hiermee heeft, een analogie kan trekken, moeten verdere onderzoekingen uitmaken.

#### SAMENVATTING.

Het histologische beeld van postvaccinale encephalitis vertoont groote overeenkomst met dat van encephalitis na de ziekte van CARRÉ. Het gelukte niet bij, tegen hondenziekte immune honden, die langen tijd een zoutrijke voeding gehad hadden, encephalitis op te wekken na enting met vaccinevirus. Bij het gebruiken van honden als proefdier voor de bestudeering der postvaccinale encephalitis moet men rekening houden met de mogelijkheid, dat de encephalitis gevolg is van een infectie met de ziekte van CARRÉ.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

Das histologische Bild postvakzinaler Encephalitis ähnelt sehr demjenigen der Encephalitis nach der CARRÉschen Krankheit. Es gelang nicht, bei gegen Staupe immunen Hunden, die längere Zeit eine salzreiche Nahrung gehabt hatten, nach Impfung mit Vakzinevirus Encephalitis zu erzeugen. Bei Benutzung von Hunden als Versuchstiere zwecks Studiums der postvakzinalen Encephalitis ist die Möglichkeit zu berücksichtigen, dass die Encephalitis die Folge einer Infektion mit der CARRÉschen Krankheit ist.



## SUMMARY.

The histological syndrome of postvaccinal encephalitis shows a great resemblance to that of encephalitis after the disease of CARRÉ. In dogs immune against distemper, which for a long time had had nourishment rich in salt, it was not possible to bring about encephalitis after inoculation with vaccine-virus. In using dogs as test-animals for the study of postvaccinal encephalitis one should take into account the possibility that the encephalitis is the result of an infection with the virus of CARRÉ.

## RÉSUMÉ.

L'image histologique de l'encéphalite postvaccinale montre une grande analogie avec celle d'une encéphalite par suite de la maladie de CARRÉ. On ne pouvait pas réussir à provoquer une encéphalite après inoculation de virus jennérien chez des chiens insensibles à la maladie de jeune chien et auxquels on avait longtemps donné une nourriture salée. En se servant de chiens comme animaux en expérience pour l'étude de l'encéphalite postvaccinale, il faut tenir compte avec la possibilité que l'encéphalite soit la suite d'une infection avec le virus de CARRÉ.

## LITERATUUR.

- LAIDLAW, P. P. A-system of bacteriology 1930, 232.  
 PUGH, L. P. 1926, *Lancet*, Lond. ii. p. 50.  
 MARINESCO, G. DRAGANESCO, S. STROESCO, G. *Ann. de l'Institut. Pasteur*, Aug. 1933, p. 215.  
 BOUWDIJK BASTIAANSE, Dr. F. S. VAN. *Zeitschr. f. Ges. Neurol. und Psych.* 1931, 134 p. 657.  
 RASSERS, Dr. J. R. F. 1931, *Encephalitis post vacc.* Leiden.
-



## HERPES-ENCEPHALITIS-VIRUS ALS VERWEKKER VAN STOMATITIS

DOOR

J. P. BIJL, arts en A. T. VAN DER SCHAAF, dierenarts.

---

In het najaar van 1933 deelde Dr. HORST, Directeur van den G. G. en G. Dienst ons mede, dat in de nabijheid van Leiden een aantal gevallen van stomatitis voorkwamen, die de vraag deden rijzen of zij in oorzakelijk verband zouden staan tot de epizoötie van mond- en klauwzeer, die toen in die streek bij het vee geheerscht had. In de literatuur wordt vermeld, dat ook bij menschen mond- en klauwzeer voorkomt. De vatbaarheid van den mensch schijnt evenwel niet groot te zijn. Het feit toch, dat het virus in de melk van zieke dieren voorkomt, zou, indien de menschen wel vatbaar waren, een veelvuldig voorkomen der ziekte doen verwachten. Dit nu is zeker niet het geval. Ook de waarneming gedaan in Zweden, waar koepokstof gebruikt is, die besmet was met mond en klauwzeervirus, zonder dat mond- en klauwzeer bij de inentelingen is voorgekomen pleit tegen de vatbaarheid. Aangezien verder, voor zoover ons bekend is, nooit experimenteel is vastgesteld, dat de z.g.n. mond- en klauwzeer gevallen bij menschen werkelijk door het mond en klauwzeer virus zijn veroorzaakt, leek het ons gewenscht in dit geval een nauwkeurig experimenteel onderzoek in te stellen.

Bij onderzoek ter plaatse bleek, dat de patienten vrijwel alle genezen waren. In één gezin vonden wij nog een paar zieken. Het gezin bestond uit man, vrouw en 4 kinderen van 1—5 jaar. De hygienische omstandigheden waren goed. Er bestond geen direct contact met vee. Wel werd de melk vaak rauw gedronken. De kinderen zijn na elkaar ziek geworden.

Volgens de moeder waren de eerste verschijnselen die van al-  
P.



gemeen-ziek-zijn. De kinderen hadden hooge koorts, geen eetlust, hoofdpijn. Na enkele dagen ontwikkelden zich op de tong, aan de binnenkant der lippen, op het wang- en verhemelteslijmvlies, blaasjes ter grootte van een rijstekorrel. Deze blaasjes verdwenen om plaats te maken voor een, door smallen rooden hof omgeven, epitheeldefect. Het spreken en eten was dan pijnlijk. Slikbezwaren bestonden en het speeksel liep uit den mond. Een paar dagen later verdwenen de erosies en er trad herstel op.

Bij een onderzoek op 13 October waren 2 kinderen reeds hersteld, een derde had nog een enkele erosie op de tong, het oudste was koortsig en zou, volgens de moeder over een paar dagen, zweertjes vertoonen.

Bij inspectie bleek op de zijkant van de tong reeds een klein blaasje aanwezig te zijn. 16 October bleken meerdere erosies op het mondslijmvlies voor te komen.

Ten einde na te gaan of de ziekteprocessen door mond- en klauwzeervirus veroorzaakt werden, werd met een vaccino-style, zoowel op 13 als op 16 October, een blaasje afgekrabd en, met het zodoende verkregen vocht, werden, een uur later, de volgende dieren geënt.

13 October:

Cavia 24, werd in scarificaties aan de voetzool besmet.

Konijn 23 werd in scarificaties op de rechter cornea geënt.

16 October.

Konijn 23 linker cornea

Cavia 25 voetzool

Cavia 26 voetzool.

Deze entingen hadden het volgende resultaat.

Konijn 23 vertoont 18 Oct., dus 5 dagen na de infectie van de rechter cornea een duidelijke keratitis en 19 Oct., dus 3 dagen na de besmetting van de linker cornea een sterke keratitis van dat oog. 30 Oct., vertoont het dier cerebrale verschijnselen: krampen, verlammingen, tandenknarsen, speekselvloed. 2 Nov. sterft het.

De hersenen waren rood en gezwollen. Bacteriën konden er niet uit gekweekt worden.



De geïnfecteerde voetzoolen der cavia's waren 3—5 dagen na de enting sterk gezwollen en rood. In het centrum van de ontsteking werd een blaasje met sereus vocht gevormd. Dit ziekteproces bleef gelocaliseerd. De dieren werden langzamerhand slap en atactisch en vermagerden. Ze stierven 9—14 dagen na de infectie. Bij de sectie werden geen afwijkingen gevonden. Bloed steriel.

Met het bloed van cavia 14 werden de volgende dieren geënt:

Cavia 28 voetzool. Er ontstaat de typische afwijking. Met de inhoud van een blaasje werd 7 Nov. de voetzool van cavia 43 geënt. Deze cavia werd 3 weken later slap en mager, kreeg keratitis en stierf 5 weken na de enting. Met afkrabsel van de cornea van cavia 43 werd 8 Dec. een konijn corneaal geënt, dat daarna een keratitis kreeg.

Uit deze proef blijkt dus, dat uit de erosie op het mondslijmvlies van het zieke kind een virus gekweekt is, dat bij cavia's na enting van de voetzool een lokaal proces doet ontstaan, waarna de dieren onder verschijnselen van ataxie te gronde gaan. Het virus is uit de blaasjes aan de voetzoolen voort te kweken en veroorzaakt na corneale enting van konijnen een heftige keratitis. Het stomatitis-virus veroorzaakt bij konijnen na corneale enting een keratitis, waarna de dieren onder cerebrale verschijnselen sterven.

Welke zijn de verdere eigenschappen van dit virus?

Komt het virus in de organen van de zieke cavia's voor?

Cavia 31 wordt 22 Oct. intraperitoneaal ingespoten met bloed van cavia 24. Het dier sterft 4 dagen later onder verschijnselen die wijzen op een aandoening van het centrale zenuwstelsel (ataxie, paresen). Organen steriel.

Cavia 33, 34, 35 en 36 worden 26 Oct. intraperitoneaal geënt, resp. met milt, hersenen, bloed, bijnier van cavia 31. De dieren vertoonen alle daarna de reeds beschreven verschijnselen. Cavia 33 herstelde. De 3 andere stierven 3—4 weken na de besmetting.

Met organen van cavia 35 worden 21 Nov. de volgende dieren geënt.

Konijn 47 corneaal, krijgt heftige keratitis.

Konijn 48 cerebraal, blijft gezond.



Cavia 50 intraperitoneaal, sterft 23 Nov.

Cavia 49 intracerebraal, sterft 6 Dec. onder cerebrale verschijnselen. Hersenen steriel.

Hieruit blijkt dat het virus in verschillende organen en in het bloed der zieke cavia's voorkomt, en dat de infectie behalve door enting van de voetsool ook door intraperitoneale en cerebrale enting is over te brengen.

De tot nog toe gevonden eigenschappen van het virus maken het zeer onwaarschijnlijk, dat het mond- en klauwzeer-virus is. Welk virus is het dan wel?

De aanwezigheid van vaccinevirus kon worden uitgesloten: De cornea van konijn 868, die genezen was van een vaccine-keratitis werd 18 Oct. geënt met virus afkomstig van konijn 23. Daarna ontstond een typische keratitis, gevolgd door een encephalitis, waaraan het dier sterft.

Immunitetsproeven t.o.v. herpes-encephalitis-virus vielen positief uit.

Konijn 40 werd 31 Oct. corneaal geënt met hersenen van konijn 868. Het dier krijgt een keratitis, gevolgd door lichte cerebrale verschijnselen, maar geneest.

20 Nov. wordt het cerebraal ingespoten met hersenen van konijn 868. Het blijft gezond, terwijl een contrôle-konijn 7 dagen na de injectie onder cerebrale verschijnselen sterft. Het dier was dus immuun tegen het stomatitis-virus. Ten einde na te gaan of het konijn ook immuun was tegen herpes-encephalitis-virus werd het 4 Dec. cerebraal geënt met herpes-encephalitis-virus van LEVADITI, welwillend afgestaan door Prof. ALDERSHOFF. Het dier blijft gezond, terwijl een contrôle-konijn onder cerebrale verschijnselen sterft.

Omgekeerd viel nu nog te bewijzen, dat een konijn geïmmuniseerd met het LEVADITI-virus, ook immuun was tegen het gevonden kinder-virus.

Aanvankelijk bleek het bezwaarlijk een dier herpes-immuun te maken. Konijn 42 werd tweemaal door scarificatie op de geschoren huid geënt (CALMETTE-GUÉRIN), kreeg hiervan geenerlei reactie en reageerde, toen het 3 weken na de eerste scarificatie corneaal geënt werd met verdund herpes-encephalitisvirus, met



een hevige keratitis, die gevolgd werd door een doodelijke encephalitis.

Beter gelukte het met konijn 55. Dit dier werd eerst intradermaal ingespoten op verschillende plaatsen met totaal 1 cc. van een dikke suspensie (methode PERDRAU). Ter plaatse reageerde het dier slechts met een geringe roodheid. Een week na de eerste inspuiting werd het dier in het neusslijmvlies geënt door scarificatie (onder locale anaesthesie met 5 % HCl. -cocaine). Een paar dagen heeft het dier een lichte rhinitis vertoond. Uitgaande van de veronderstelling, dat er nu meer kans was op een hersen-immuniteit, gezien het zenuw- en lymphvaten-verband tusschen neus- en hersenholte, werd, twaalf dagen na de enting in de neus de rechter cornea geënt met het LEVADITI-virus. Er volgde een lichte keratitis; een week later was het dier wat schrikachtig, doch de eetlust bleef voortdurend goed. Het dier bleek nu bestand tegen intra-cerebrale inspuiting met het betreffende virus. Acht dagen later gaf intra-cerebrale inspuiting met een hersensuspensie van konijn 868 geen ziekte verschijnselen terwijl een contrôle-konijn (889) na vijf dagen stierf.

De smetstof, afkomstig uit de mond van den stomatitis-patient, bleek dus het herpes-virus te zijn, en wel één met sterk encephalitogene eigenschappen.

De vraag deed zich nu voor of dit, uit een erosie geïsoleerde virus ook de oorzaak van de stomatitis was. De mogelijkheid toch is denkbaar, dat de stomatitis, veroorzaakt door een onbekend agens, ontstaan is bij een virusdrager. In de literatuur toch zijn onderzoekingen vermeld, waaruit blijkt, dat herpes-virus normaliter in de mondholte kan voorkomen. LEVADITI vond bij onderzoek van gezonde personen in Parijs in 80 % een keratogeen-virus in het speeksel. Volgens KUMER gelukt het echter slechts dan herpes-virus dier-experimenteel aan te toonen, indien de desbetreffende persoon een duidelijke herpes vertoont of korten tijd te voren hieraan geleden heeft.

Ten einde na te gaan of bij de kinderen in Leiden herpes-virus normaliter in het mondlijmvlies is aan te toonen, hebben wij 7 kinderen, die op de polikliniek van Prof. GORTER kwamen,



geen positieve herpes-anamnese hadden en niet leden aan een ziekte, waarbij herpes pleegt op te treden, op de aanwezigheid van herpes-encephalitis-virus in het mondslijmvlies onderzocht.

Van de 7 corneaal geënte konijnen hebben 4 een lichte keratitis vertoond, die spoedig genas en geen immuniteit voor het geïsoleerde stomatitis-virus achter liet. Bij geen van de kinderen kon dus herpes-encephalitis-virus aangetoond worden.

Daarentegen kreeg een konijn, dat corneaal geënt werd met afkrabsel van het mondslijmvlies van een jongen, die toen gezond was, maar aan een recidiveerende herpes leed, een heftige keratitis. Het dier genas en was daarna immuun tegen enting met het virus van konijn 868.

Deze proeven toonen aan, dat herpes-encephalitis-virus niet algemeen verbreid bij de kinderen te Leiden voorkomt.

Het isoleeren van een zeer sterk encephalitogene herpes-stam uit de erosies van een kind lijdende aan een acute stomatitis pleit er voor, dat dit virus de verwekker van de stomatitis is geweest.

#### SAMENVATTING.

In de onmiddellijke nabijheid van Leiden zijn in het najaar van 1933 vele gevallen van stomatitis voorgekomen. Uit erosies op het mondslijmvlies van een patiënt werd een virus geïsoleerd, dat in de konijnen- en caviaproef de eigenschappen van een sterk neurotroop herpes-encephalitis virus vertoonde.

Het virus gaf na corneale enting van konijnen een hevige keratitis gevolgd door een dodelijke encephalitis.

Enting in scarificaties van de voetzool van de cavia, gaf een locale ontsteking gevolgd door ataxie en paresen, waarna de dieren stierven. Enting in de hersenen gaf een dodelijke encephalitis. Het virus was aan te toonen in het bloed en in verschillende organen. Ook enting in de peritoneale holte deed verlammingen ontstaan, waarna de dieren stierven.

Konijnen, die geïmmuniseerd waren met het stomatitisvirus, waren ook immuun tegen herpes-encephalitis-virus. Konijnen, die geïmmuniseerd waren tegen herpes-encephalitis-virus waren tevens immuun tegen het stomatitis-virus.



Bij 7 niet aan herpes lijdende of geleden hebbende kinderen werd geen herpes-virus in het mondslijmvlies aangetoond. Bij een aan recidiveerende herpes lijdende jongen, werd in een herpes vrije periode, het (niet neurotrope) virus in het mondslijmvlies aangetoond.

### ZUSAMMENFASSUNG.

In der unmittelbare Nähe Leidens kamen im Herbst 1933 viele Fälle von Stomatitis vor. Aus Erosionen auf der Mundschleimhaut eines Patienten wurde ein Virus gezüchtet, das im Kaninchen- und Meerschweinchenversuch die Eigenschaften eines stark neurotrophen Herpes-Encephalitis-Virus zeigte.

Das Virus führte nach kornealer Impfung von Kaninchen eine heftige Keratitis herbei, der eine tödliche Encephalitis folgte.

Impfung in Skarifikationen der Fusssohle der Meerschweinchen verursachte eine örtliche Entzündung, auf welche Ataxie und Paresen folgten, an welchen die Tiere starben. Impfung im Gehirn führte zu einer tödlichen Encephalitis. Das Virus war nachweisbar im Blut und in verschiedenen Organen. Auch Impfung in die Peritonealhöhle hatte Lähmungen zur Folge, an welchen die Tiere eingingen.

Kaninchen, die mit dem Stomatitisvirus immunisiert waren, erwiesen sich auch als immun gegen Herpes-Encephalitis-Virus. Kaninchen, welche gegen Herpes-Encephalitis-Virus immunisiert waren, zeigten sich auch zugleich gegenüber Stomatitisvirus immun.

Bei 7 Kindern, die weder an Herpes litten noch gelitten hatten, wurde kein Herpesvirus in der Mundschleimhaut nachgewiesen. Dagegen war bei einem an rezidivirender Herpes leidenden Jungen in einer herpesfreien Periode das (nicht neurotrope) Virus in der Mundschleimhaut nachweisbar.

### SYNOPSIS.

In the vicinity of Leiden many cases of stomatitis occurred in the autumn of 1933. From erosion on the mucous membrane



of a patient's mouth a virus was isolated, which, in the rabbit and cavia-test showed the properties of a strongly neurotropic herpes-encephalitis virus.

After corneal inoculation of rabbits the virus caused a violent keratitis, followed by fatal encephalitis.

Inoculation into scarifications of the foot-sole of the cavia brought about a local inflammation followed by ataxy and paresis, after which the animals died. Inoculation into the brain caused fatal encephalitis. The virus was demonstrable in the blood and in different organs. Inoculation into the peritoneal cavity, too, caused paralysis, after which the animals died.

Rabbits immunized with the stomatitis-virus, were also immune to herpes-encephalitis-virus. Rabbits immunized to herpes-encephalitis-virus were at the same time immune to the stomatitis-virus.

In seven children not suffering or having suffered from herpes no herpes-virus was demonstrated in the mucous membrane of the mouth. In a boy suffering from recidivating herpes, the (non-neurotropic) virus was demonstrated in the mucous membrane of the mouth in a herpes-free period.

### RÉSUMÉ.

Dans l'automne de 1933 on a pu constater dans les environs immédiats de Leyde beaucoup de cas de stomatite. On a isolé des érosions de la muqueuse buccale d'un malade un virus, qui, inoculé dans un lapin et un cobaye, démontra les qualités d'un virus d'encéphalite herpétique fort neurotrope.

Le virus, inoculé sur la cornée de lapins occasionna une kétatite violente, suivie d'une encéphalite menant à la mort.

L'inoculation dans les scarifications de la plante du pied d'un cobaye, causa une inflammation locale suivie d'ataxie et de parésies après lesquelles les animaux succombèrent.

Une inoculation cérébrale cause une encéphalite menant à la mort. On put démontrer le virus dans le sang et dans différents organes. L'inoculation dans la cavité péritonéale causa des paralysies après lesquelles les animaux succombèrent.



Les lapins, immunisés avec le virus stomatitique, étaient également immun contre le virus herpéto-encéphalitique. Les lapins, immunisés contre le virus herpéto-encéphalitique, étaient en même temps immun contre le virus stomatitique.

Chez sept enfants qui ne souffraient pas ou n'avaient pas souffert d'un herpès, on ne put pas démontrer le virus herpétique dans la muqueuse buccale. Chez un garçon souffrant d'un herpès récidivant on put démontrer pendant un intervalle le virus (non neurotrope) dans la muqueuse buccale.

---



# EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR AETIOLOGIE DER INFLUENZA

VON

Dr. GERHARD ELKELES

Jetzt Cordoba (Argentina) consejo Provincial de Higiene  
Boulevard Junin.

## I.

Wer ein Urteil über den Umfang der Influenzaliteratur gewinnen will, der möge das vor kurzem erschienene Werk über die Influenza von DAVID und ROBERT THOMSON <sup>1)</sup> zur Hand nehmen. Dieses Werk stellt auf 1½ Tausend Druckseiten Auszüge aus der Weltliteratur über die Influenza zusammen und berichtet dabei über 4000 Arbeiten, deren Literaturverzeichnis 100 Seiten einnimmt. Trotz aller aufgewandter Arbeit ist jedoch so manche Frage, darunter die wichtige Frage der *Aetiologie*, bis heute ungeklärt oder doch strittig geblieben. Wenn aber, ebenfalls nach D. und R. THOMSON, die Influenza allein in einem Jahr (1918/'19) 20 Millionen Menschen den Tod gebracht hat und ca 500 Millionen krank gemacht hat, dann ist es sicher berechtigt, mit den Bemühungen um die Ergründung dieser Krankheit nicht nachzulassen. Ich bin daher der Aufforderung, Studien über die Influenza am „Instituut voor Praeventieve Geneeskunde“ auszuführen, gern gefolgt, habe mit dem Studium der Aetiologie begonnen und habe dabei auf Anregung des Direktors, Herrn Dr. BIJL, zum Ausgangspunkt meiner Arbeiten die Untersuchungen von WILSON SMITH, ANDREWES und LAIDLAW <sup>2)</sup> genommen.

Diese Autoren teilten im vorigen Jahre mit, dass es ihnen gelungen sei, von Influenzakranken ein filtrierbares Virus zu gewinnen, und dass dieses Ergebnis erst erzielt wurde, als sie

<sup>1)</sup> Annals of the PICKETT—THOMSON Research Laboratory (1934 Baillière Tindall and Cox, London).

<sup>2)</sup> The Lancet, 66 (1933). Vol. 2, S. 65.



nach vielen vergeblichen Versuchen das *Frettchen* als Experimentaltier benutzten. Von 8 gelegentlich einer Influenzaepidemie zu Beginn des Jahres 1933 erkrankten Menschen konnten sie 5 mal ein Virus gewinnen, das ein eigenartiges, wohlcharakterisiertes Schnupfenfieber bei den geimpften Tieren hervorrief.

Filtierbare Viren sind schon wiederholt als Erreger der Influenza angegeben oder vermutet worden.

Schon in 1918 und 1919 publizierten NICOLLE und LEBAILLY diesbezügliche Untersuchungen. Mit filtriertem Sputum von Influenza-Patienten konnten sie durch subkutane Einspritzung zwei Gesunden krank machen. GIBSON, BOWMAN und CONNOR fanden dass *Macaccus rhesus*, subcutan eingespritzt mit Sputumfiltrat, an einer grippeähnliche Krankheit erkrankten. Auch FEJES gibt an, dass Sputumfiltrate pathogen für Affen sind. HALL konnte Kaninchen, Meerschweinchen und Mäuse mit dem Filtrat von Sputum von Grippepatienten krank machen. Durch Injektion von Lungenfiltrat der erkrankten Tiere konnte er wieder andere Tiere infizieren. Demgegenüber berichten die meisten Autoren über negative Versuche (KRUSE; KEEGAN; FRIEDBERGER und KONITZER; ROSENAU) (für weiteres D. und R. THOMSON).

Zu diesen Virusexperimenten gesellen sich nun die neueren Forschungen von SMITH, ANDREWES und LAIDLAW.

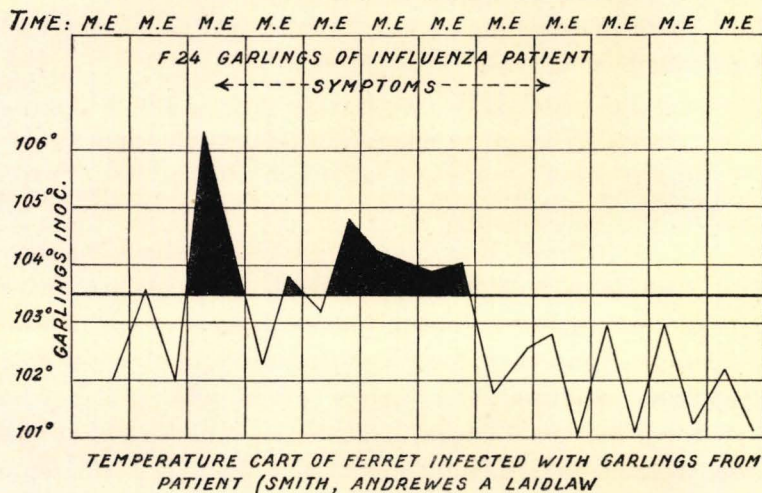
Diese Autoren nahmen die Influenzaepidemie im Beginn des Jahres 1933 zum Anlass für Ihre Untersuchungen, begannen mit ihren Uebertragungsversuchen auf das *Frettchen* jedoch erst am Ende der Epidemie und hatten daher nicht mehr Gelegenheit, viele Kranke zu untersuchen. Von den 8 Kranken jedoch, die sie untersuchten, konnten sie 5 mal das gleiche Virus gewinnen, darunter befand sich ein Fall, von dem Material des 1. 2. und 3. Tages der Krankheit positive Ergebnisse lieferte, während am 6. Tage, wo bereits eine deutliche Besserung des Befindens eingetreten war, das Virus nicht mehr nachweisbar war. Auch untersuchten sie 4 *Kontrollpersonen* mit *negativen* Ergebnis auf Virus, darunter 2, die vorher krank gewesen waren und Virus enthalten hatten.

Bei Impfung des *Frettchens* mittels intranasaler Einträufelung, die schonend, ohne Verletzung der Schleimhäute erfolgte, antwortete das *Frettchen* mit einer zweigipfligen Fieberkurve und den Zeichen eines eitrigen Schnupfens und einer Conjunctivitis. Diese Erscheinungen waren begleitet von einer deutlichen Veränderung im Verhalten des Tieres: es scheint krank, liegt meist ruhig und schlafend da, frisst wenig oder garnicht, niest



und gähnt viel, Fieber und Schnupfensymptome variieren in der Stärke und gehen nicht immer parallel miteinander. Eine typische Fieberkurve bilden die genannten Autoren ab; sie sei hier wiedergegeben. (s. Abb. 1).

Abb. 1. Temperaturkurve eines mit menschlichem Virus intranasal geimpften Frettchens nach SMITH, ANDREWES und LAIDLAW.



Das Virus war in beliebig vielen Passagen übertragbar. Benützt wurde zu diesem Zweck in der Regel die ausgekratzte Nasenschleimhaut eines auf der Höhe der Krankheit getöteten Tieres. Man brauchte hierbei nicht quantitativ zu verfahren. Selbst starke z. B. 100fache Verdünnungen einer mit Sand verriebenen Emulsion der Nasenschleimhaut wirkten noch infektiös. Nicht nur die Krankheit, sondern auch die Anwesenheit des Virus schien streng lokalen Charakters zu sein, denn in allen anderen bisher untersuchten Organen konnte das Virus nicht nachgewiesen werden. Nach Ueberstehen der Krankheit blieb eine aktive Immunität zurück, wobei alle bisher isolierten Stämme untereinander keine Differenzen aufwiesen und gekreuzte Immunität ergaben.

Angesichts der besonderen Beziehungen, die der *Influenzabazillus* zur Influenzakerkrankung hat, haben die Autoren auch geprüft, ob dieser Bazillus bei gleichzeitiger Verabreichung einen Einfluss auf den Verlauf der Krankheit ausübe. Alle bisherigen Versuche ergaben keinen Anhalt dafür, dass der Verlauf der Krankheit durch Zugabe von Influenzabazillen zu beeinflussen ist.

Zur Nachprüfung dieser interessanten Ergebnisse erbaten wir uns von den englischen Autoren (W. SMITH) ihr Virus und erhielten 2 Stämme,<sup>1)</sup> beide von influenzakranken Menschen

<sup>1)</sup> Wir möchten auch an dieser Stelle den englischen Autoren für ihr freundliches Entgegenkommen unseren Dank aussprechen.



gewonnen: WS strain 559 und BW strain 570. Beide Stämme, in abgeschlossenen Glasröhren befindliche getrocknete Nasenschleimhaut von Passagefrettchen, riefen das von den englischen Autoren beschriebene Krankheitsbild bei den von uns geimpften Frettchen hervor.

Schon bei diesem ersten Versuch trat die auch von SMITH, ANDREWES und LAIDLAW beobachtete Variation des Krankheitsbildes in Erscheinung, indem das mit WS 559 geimpfte Tier (Frett 1) kaum Fieber, aber schon nach 48 Stunden einen sehr charakteristischen Schnupfen bekam, während das mit BW 570 geimpfte Tier (Frett 3) mit beträchtlichem Fieber erkrankte, aber innerhalb der ersten Fieberperiode kaum Zeichen eines Schnupfens darbot: (s. Abb. 2 und 3).

Zum Studium der natürlichen Uebertragung setzten wir ein Frett (Frett 2) zu Frett 1 einen Tag nach Ausbruch des Schnupfens und erzielten auch bei diesem Tier das typische Schnupfenfieber; die Inkubationszeit betrug hier das doppelte: 4 mal 24 Stunden, während sie bei intranasaler Einträufelung ca. 30 bis 48 Stunden beträgt.

Von diesem Tier (Frett 2) ausgehend, prüfte ich am 3. Tag seiner Entfieberung, ob das *Virus noch im Tier und ob es auch am Käfige hafte*.

Ich brachte Frett 2 am 24. V. nach einer Sublimatabreibung mit einem neuen Frett (Frett 4) in einen neuen Käfig und setzte in den freigewordenen, gebrauchten Käfig des Frett 2 ein weiteres Frett 5. Beide Tiere (Frett 4 und 5) erkrankten nach 4 und 5 Tagen mit Fieber und besonders Frett 5 mit sehr starkem Schnupfen.

Zu Kontrollzwecken wurde einem akut an Erkältung erkrankten Mitarbeiter (v. d. Sch.) Nasenschleim und Rachenspülwasser abgenommen und auf zwei Frette (Frett. 8 und 9) intranasal verimpft. Beide Tiere blieben gesund. Ferner wurde einem an Conjunctivitis mit schleimiger Absonderung erkrankten Hunde Augensekret entnommen und auf ein Frett (Nr. 11) intranasal geimpft. Auch dieses Tier blieb gesund.

Ich habe noch auf 15 weitere Frette zu verschiedenen Zwecken Uebertragungen des englischen Virus und seiner Frett-Passagen vorgenommen und *ausnahmslos das geschilderte Krankheitsbild erzielt*.



Abb. 2. Frett 1.

Deutliche Schnupfensymptome fast ohne Fieber.

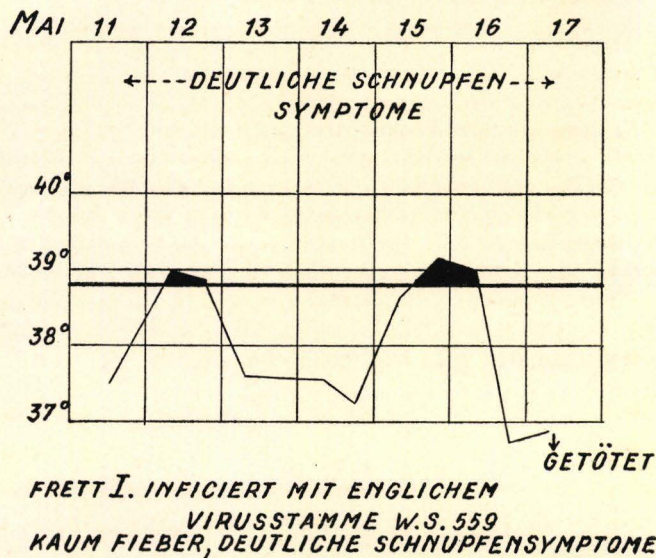
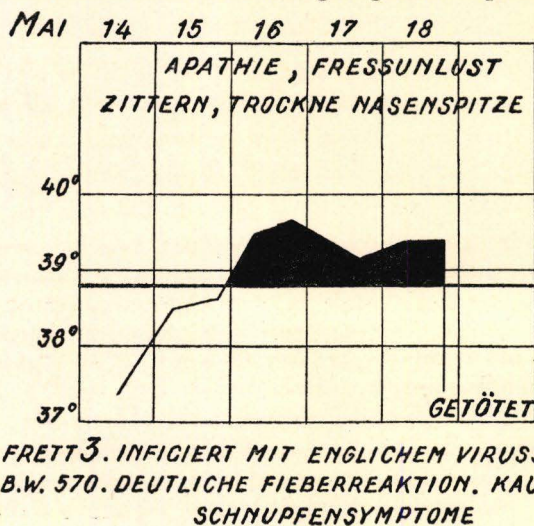


Abb. 3. Frett 3.

Beträchtliches Fieber mit nur geringen Schnupfensymptomen.





Wie in allem anderen, so kann ich die englischen Autoren auch darin bestätigen, dass das Arbeiten mit Fretten nicht ohne Schwierigkeit ist.

Der Umgang mit den zwar wilden, sich dem Festhalten oft heftig widersetzenden, aber doch nicht aggressiven Tieren lernt sich ziemlich leicht. Unangenehmer ist die Anfälligkeit der Tiere: Mundbodenabszesse und Vaginitis sind häufige intercurrente Krankheiten, und besonders störend für die Influenzaversuche ist das Vorkommen von spontanem fieberhaften, durch Kontaktinfektion übertragbaren Schnupfen, der klinisch von dem Virusschnupfen kaum zu unterscheiden ist<sup>1)</sup>. Man muss daher sehr auf gesunde Bestände achten und die Tiere vor der Benützung eine Zeitlang einzeln und in Beobachtung halten. Auch die Messung der Temperatur will bei den Fretten gelernt sein. Das Herabtreten des dünn-breiigen Darminhalts in die Ampulla recti während des Messens ist mit einer plötzlichen Temperaturerhöhung von etwa 0,5° verbunden.

Diese Schwierigkeiten, verbunden mit dem vergleichsweise hohen Preise der Frettchen legten den Gedanken nahe, die *Uebertragung des Virus auf andere Laboratoriumstiere* zu versuchen, um so bei Experimenten nicht nur auf das Frett angewiesen zu sein.

Meine dahingehenden Versuche erstreckten sich auf Mäuse, Kaninchen und Hunde. Da nach den von SMITH, ANDREWES und LAIDLAW berichteten Erfahrungen die einfache intranasale Einträufelung des Virrus bei anderen Tieren keinen Erfolg versprach und auch bei einigen eigenen Versuchen erfolglos blieb, wurde versucht, das Virus durch *besondere Mittel bei den genannten Tieren zum Haften zu bringen* und zwar:

1.) durch *verlängertes Verweilen des Virus an der Impfstelle*:

Virus filtriert und unfiltriert wurde mit kurz vor der Erstarrung stehendem Agar gemischt und danach das Gemisch auf 3 Hunde, 2 Kaninchen und 9 Mäuse verimpft. In der Regel wurde das Virus-Agar-Gemisch sofort nach der Mischung mit vorgewärmter Saugpipette in die Nasenöffnung gespritzt, in einzelnen Fällen unter Narkose, bei den Mäusen z. T. auch gleichzeitig intraperitoneal und intramuskulär gegeben.

---

<sup>1)</sup> Das Studium dieses Schnupfens, seiner Ursachen und seiner immunitären Beziehungen zu dem von Influenzakranken gewonnenen Virus der englischen Autoren ist begonnen worden, konnte jedoch vorläufig nicht weitergeführt werden.



2.) durch *Blockierung des reticulo-endothelialen Apparats*;

5 Mäuse wurden intraperitoneal oder intracerebral nach Vorinjektion chinesischer Tusche mit Virus oder Filtrat gespritzt.

3.) durch *Erhöhung der Infektionsdosis* vermittels vorhergehender Kultur;

Filtrate des Virus wurden nach dem Vorgang von WOODRUFF, GOODPASTURE und BUDDINGH <sup>1)</sup> auf das Allanto-Chorion 10 Tage alter Hühnerembryonen geimpft. Nach weiterer 4-tägiger Bebrütung wurde die beimpfte Partie der Eihäute zu einer Emulsion verrieben und einem Hund, einem Kaninchen und zwei Mäusen intranasal eingeträufelt <sup>2)</sup>).

*Keiner der genannten Impfversuche führte zu einer klinischen Erkrankung der geimpften Tiere oder zu einem greifbaren pathologisch-anatomischen Befund.* Trotzdem müssen, meines Erachtens, die Forschungen in dieser Richtung fortgesetzt werden. Denn eine der wesentlichen Aufgaben bleibt das Sich-Freimachen vom Frett als alleinigem Experimentaltier. Es drängt sich hier die Parallele mit der Psittacosis-Forschung auf, bei der das Studium der Natur des Virus und der Immunitätsverhältnisse durch die gelungene Uebertragung auf die Maus ausserordentlich gefördert worden ist. Das Frett ist bei aller Anfälligkeit doch ein sehr zähes Tier und erholt sich selbst von schweren Erkrankungen meist rasch. Das erschwert das experimentelle Arbeiten. So zeigt sich seine Widerstandskraft ja auch darin, dass bei keinem Uebertragungsversuch der englischen Autoren und ebenso bei keinem meiner eigenen Versuche die Erkrankung der oberen Luftwege auf die Lungen übergriff, und dass es so bisher an allen pathologisch-anatomischen Befunden fehlt. Selbst mehrfach von mir ausgeführte intratracheale und intrapulmonale Virus- und Bazillenimpfungen blieben stets ohne ernstere Schäden für die Tiere.

Neben den Virusstudien wurde von Anbeginn der Arbeiten an auch der PFEIFFER'sche *Influenzabazillus* in die Versuche

<sup>1)</sup> Americ. Journ. Path. VII, 209 und VIII, 271.  
Science, 1931, XXIV, 371.

<sup>2)</sup> Die Möglichkeit der Durchführung dieser Kulturversuche verdanke ich dem freundlichen Entgegenkommen der Herrn Prof. Bok und Dr. GAILLARD, denen auch an dieser Stelle nochmals bestens gedankt sei.



einbezogen. Meine durch 15 Jahre fortgeführten täglichen bakteriologischen Untersuchungen des Sputums von Influenza-kranken haben mich zu der Ueberzeugung geführt, dass der Influenzabazillus, wenn er nicht die massgebliche aetiologische Rolle spielt, so doch *von dem klassischen Krankheitsbild und der epidemischen und pandemischen Form der Influenza untrennbar* ist. Er unterscheidet sich in dieser Beziehung von allen anderen Bakterienarten, die im Sputum Influenzakeranker angetroffen werden und in ihrer Art sehr wechseln. Scharfe klinische Abgrenzung der Influenza von anderen Erkrankungen der Luftwege und eine einwandfreie Untersuchungstechnik<sup>1)</sup> vorausgesetzt — ist der Influenzabazillus bei Influenzakeranken mit der überhaupt zu erwartenden Regelmässigkeit anzutreffen und zwar meist um so zahlreicher und reiner, je besser die Untersuchungstechnik beherrscht und ausgeübt wird.

Ich schliesse mich in dieser Auffassung durchaus dem Standpunkt an, den R. PFEIFFER zuletzt auf dem Internationalen Kongress für Mikrobiologie im Jahre 1931 entwickelt hat, und den viele Forscher mit ihm teilen (u. a. MC. INTOSH SCOTT; OPIE, BLAKE, SMALL, RIVERS; MARTIN; UHLENHUTH; HILL; CROFTON.)

Zu diesen Namen gesellen sich auch die der THOMSONS, die sich in ihrer Monographie auf Grund des gesamten Influenzaschrifttums und ihrer eigenen ausgedehnten Erfahrungen wie folgt äussern:

Wir sind auf Grund 15 jähriger Erfahrung, davon überzeugt, dass der PFEIFFER'sche Bazillus, wie die Pneumococcengruppe, sehr pathogen ist, und dass er ausser ein gefährlicher secundärer Krankheitserreger zu sein, auch primär die Respirationsorgane krank machen kann.

Wie eingangs berichtet, haben SMITH, ANDREWES und LAIDLAW *vergeblich* versucht, durch Combination ihres Virus

---

<sup>1)</sup> *Tiefen-Sputum* muss *frisch* untersucht, sorgfältig gewaschen, auf stets kontrollierte, einwandfreie Influenzanährböden aufgestrichen werden, die Platten müssen sorgfältig durchgesehen werden, und die Untersuchung muss bei negativem Ausfall unter Einbeziehung der Maus-Peritonealimpfung wiederholt werden.



mit Influenzabazillen die Viruskrankheit der Frettchen zu verschlimmern, insbesondere eine Pneumonie hervorzurufen. Eine Angabe über das Alter und die Virulenz der benutzten Stämme fehlt. Sie wäre von Interesse, da bekannt ist, dass Influenzastämme auf künstlichen Nährböden sehr schnell ihre Virulenz verlieren.

Da zur Zeit meiner Untersuchungen Influenzafälle vollständig fehlten, suchte ich mir von verschiedenen Quellen Influenzabazillen-Stämme zu verschaffen. Ich arbeitete: 1.) mit humanen Sammlungskulturen, die mir Herr Kollege KORT-HOF freundlichst zur Verfügung stellte, und die ich durch passagenweise Verimpfung auf das Mäuseperitoneum in ihrer Virulenz zu steigern suchte, 2.) mit mehreren sog. COHEN'schen Meningitisstämmen, die ich Herrn Dr. KAPSENBERG verdanke 3.) mit 3 Influenza suis-Stämmen, die Herr Prof. WALDMANN (Riems) Herrn Dr. BIJL auf seine Bitte überliess und 4.) mit 5 für Kaninchen hochvirulenten Sputum- und Liquorstämmen, die mir Herr Dr. MULDER (Groningen) freundlichst zur Verfügung stellte.

In Bestätigung der von SMITH, ANDREWES und LAIDLAW mitgeteilten Beobachtungen gelang es auch mir in keinem der 14, in dieser Richtung angestellten Versuche, durch Zugabe von I.B. zum Virus eine Pneumonie hervorzurufen. Nur insoweit trat eine Verstärkung der Krankheit ein, als sich gelegentlich an den 2. Temperaturanstieg noch ein dritter anschloss, wofür zwei Beispiele wiedergegeben seien: (s. Abb. 4 und 5 s. 69.)

Schon von anderer Seite (Public Health Committee of the New York Academy of Medicine; BLOOMFIELD; KRISTENSEN;) ist die Vermutung ausgesprochen worden, dass die menschliche Influenzaerkrankung durch das Zusammenwirken eines Virus mit I.B.zustande kommt. Wenn dem so ist, dann kann man sich vorstellen, dass die initialen akuten Symptome an Rachen, Nase, Auge der Wirkung des Virus zuzuschreiben sind, und dass die eitrigen Entzündungen der Nebenhöhlen und Bronchien den auf dem Boden dieser Virusschädigung zur Wirkung kommenden Influenzabazillen zuzuschreiben sind. Da nun in die Nase von Frettchen verbrachte I.-B. oft schon



nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar sind, war es denkbar, dass mit dem Virus *zugleich* verimpfte I.-B. zu der Zeit, wo sie zur Wirkung hätten kommen können, nicht mehr vorhanden

Abb. 4. Frett III, 2.

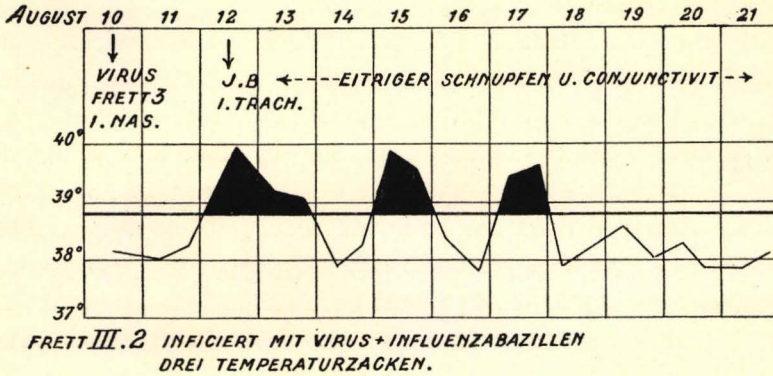
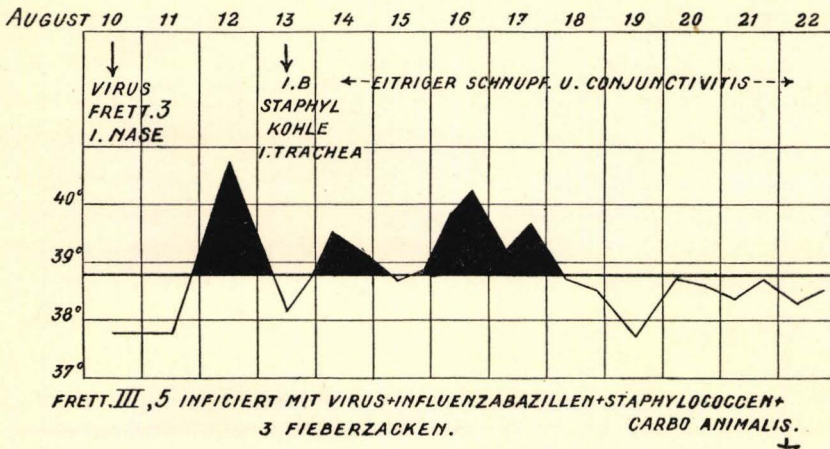


Abb. 5. Frett III, 5.



waren. Von dieser Vorstellung ausgehend, habe ich daher die I.-B. nicht nur gleichzeitig mit dem Virus, sondern grössten-  
teils erst *nach Ausbruch des Virusschnupfens* auf die Frettchen  
verimpft. Ferner habe ich, um die Bazillen sicher in die tieferen  
Luftwege zu bringen, in 7 Fällen die Bazillen intratracheal  
oder intrapulmonal injiziert und zur weiteren Schädigung der



Tiere diese Impfungen zum Teil unter gleichzeitiger Injektion von Kohle und lebenden oder abgetöteten haemolytischen Staphylococcen vorgenommen (Frette II, 2; II, 3; II, 4; III, 1; III, 2; III, 3; III, 5; VII, 1; VII, 2; VIII, 1; IX, 2;). Trotzdem konnte ich an dem klinischen Ablauf des Virusschnupfens nur die oben genannte dritte Temperaturzacke, aber keine Pneumonie erzielen und konnte bei frühzeitig getöteten Tieren auch pathologisch-anatomisch keine Zeichen einer bronchopneumonischen Erkrankung wahrnehmen.

Man kann die Vorstellung eigentlich nicht als von vorneherein sehr einleuchtend bezeichnen, dass zum Zustandekommen der epidemischen Influenza zwei ganz fremde lebende Infektionsstoffe miteinander zusammenwirken müssen. Plausibler wäre diese Vorstellung, wenn zwischen den beiden Infektionsstoffen eine erkennbare *Beziehung* bestünde, und der einfachste Gedanke wäre dann der, dass das Virus dem Bazillus entstammt, und eine Beziehung, wie sie ähnlich von bei Tuberkelbazillenfiltraten und Tuberkelbazillus angenommen wird. In Sinne dieser Vorstellung verwertbar ist die Tatsache, dass man aus Filtraten von I.-B.-haltigen Aufschwemmungen Influenzaskulturen erhalten kann, während alle sonstigen, in der Aufschwemmung befindlichen Keimarten vom Filter zurückgehalten werden. Diese „Filtrierbarkeit“ von I.-B. ist bereits von PFEIFFER; PRAUSITZ; LUCKSCH; KENDALL beschrieben worden. Wie in früheren Jahren, so habe ich auch jetzt wieder mit Erfolg solche Filtrationen vorgenommen. Ich bin dabei teils von Reinkulturen ausgegangen, teils habe ich die granuläre Aufsplitterung der Bazillen vor der Filtration dadurch zu fördern gesucht, dass ich die Bazillen mit scharfem Sand kräftig verrieb habe oder die Bazillen in die Bauchhöhle von Meeresschweinen und Mäusen gespritzt habe, die gegen I.-B. immunisiert waren, und nach verschiedenen Zeiten die Bauchhöhle ausgespült und die Spülflüssigkeit filtriert habe. Die Filtrate waren, in verschiedener Kombination mit I.-B., zur Infektion von Fretten bestimmt, doch konnten diese Versuche zur fraglichen Zeit nicht auf eine genügend breite Basis gestellt werden und bedürfen erneuter Inangriffnahme.



*Zusammenfassend* hat sich aus den vorliegenden Untersuchungen folgendes ergeben: Das von SMITH, ANDREWES und LAIDLAW von 5 Influenzakranken gewonnene Virus war bei Nachprüfung auch hier imstande, bei gesunden Fretten regelmässig einen fieberhaften, mit Conjunctivitis einhergehenden, eitrigen, auf künstlichem und natürlichem Wege übertragbaren Schnupfen von dem gleichen Verlauf zu erzeugen, wie ihn die Engländer beschrieben haben. Der *Beweis*, dass die epidemische und pandemische Influenza des Menschen durch dieses Virus hervorgerufen wird oder dass dieses Virus wenigstens ein notwendiger aetiologischer Faktor ist, wird erst erbracht werden können, wenn die *Ergebnisse an neuem Epidemiematerial auf breiter Basis nachgeprüft* werden können. Die Zeit bis dahin kann nutzbar dafür verwandt werden, die *Natur des englischen Virus* näher zu studieren. Diese Studium könnte sehr erleichtert werden, wenn es gelänge, das Virus an *üblichen Laboratoriumstieren* zum Angehen zu bringen, ähnlich wie das Psittacosis-Experiment durch die gelungene Uebertragung auf die weisse Maus sehr gefördert worden ist. Weitere Bemühungen in dieser Richtung scheinen daher wünschenswert.

Ganz ungeklärt blieb bei den Virusstudien die Rolle des PFEIFFER'schen *Influenzabazillus*, der aus der Aetiologie der epidemischen Influenza kaum wegzudenken ist. Da beim Frettchen die Mitverimpfung von I.-B. nicht zu einer Verschlimmerung des Virusschnupfens, insbesondere nicht zu einer Pneumonie führt, ist das Frettchen vielleicht doch noch nicht das geeignetste Tier zur künstlichen Erzeugung der menschlichen Influenza. Jedenfalls bedarf es — sei es am Frettchen, sei es an anderen Experimentaltieren — weiterer Untersuchungen über die *Natur des Virus*, besonders über seine Beziehungen zum Influenzabazillus, und unter diese Forschungen scheint mir am belangreichsten die Prüfung der Frage zu sein, ob das *Virus dem I.-B. entstammt*, ob hier etwa ähnliche Beziehungen bestehen wie zwischen dem Tuberkelbazillus und Tuberkelbazillenfiltraten.

<sup>1)</sup> R. E. SHOPE, Journ. Exp. Med. 54, 349, 361, 373; 56, (1932); 59, 201 (1934) 60, 49 (1934); WALDMANN, Berl. Tierärztl. Woch. 49 (1933), KOBE.



## II.

Die Annahme, dass die Entstehung und der Verlauf der menschlichen Influenza dem Zusammenwirken eines Virus mit Influenzabazillen zuzuschreiben ist, hat in den letzten Jahren durch die Forschungen über die Hog-flu, Ferkel-grippe, ohne Frage an Wahrscheinlichkeit gewonnen. Anfänglich (1931) in Amerika, später (1933) in Deutschland wurde der experimentelle Nachweis erbracht, dass die als Hog-flu bzw. Ferkel-grippe bezeichnete Krankheit durch das Zusammenwirken eines Virus mit I.-B. hervorgerufen wird.

In Nordamerika kommt eine akute Schweineseuche vor, bei der die Krankheit plötzlich einsetzt und in so hohem Masse contagiös ist, dass in kürzester Zeit praktisch 100 % des betreffenden Bestandes von der Krankheit befallen werden. Die wichtigsten Kennzeichen sind Fieber, Fressunlust und Husten. So rasch wie die Krankheit entsteht, pflegt sie auch wieder zu verschwinden; nach 2—6 Tagen ist die grosse Mehrzahl der Tiere wieder gesund, nur einzelne (1—4 %) erliegen der Krankheit und bieten bei der Sektion den Befund einer stark oedematoesen Bronchopneumonie. Nachdem SHOPE als erster durch intranasale Verimpfung von Lungenpresssaft die Krankheit auf Schweine übertragen konnte, gelang ihm in Gemeinschaft mit Lewis der Nachweis, dass bei den erkrankten Tieren regelmässig ein haemoglobinophiles Stäbchen anzutreffen ist, das die beiden Forscher als *Hemophilus influenzae* (variety suis) bezeichneten. Anschliessend hieran wies dann SHOPE nach, dass ausser dem *H. influenzae* ein Virus im Spiel ist, das für sich nur eine leichte, fieberlos verlaufende Erkrankung hervorruft, dass aber ein Gemisch des Virus mit Reinkulturen von *H. influenzae* eine Krankheit bei Schweinen erzeugt, die das vollständige Ebenbild der Hog-flu ist. Es liess sich zeigen, dass die einzelnen Komponenten, Virus und Bazillus für sich, dieses Vermögen nicht haben, sondern nur bei gemeinsamer Einwirkung.

Angeregt durch diese Beobachtungen SHOPE's untersuchte KÖBE in O. WALDMANN's Forschungsanstalt auf der Insel Riems nach gleichen Gesichtspunkten eine Krankheit, die als *Ferkelkümern* in Deutschland bekannt ist, hier aber nicht als akute Seuche, sondern ausschliesslich enzootisch vorkommt und sehr verbreitet ist. Sie hat hier einen viel ernsteren Charakter, weil (nach KÖBE) 20—60—80 % der erkrankten Ferkel der Seuche zum Opfer fallen und die übrigen kümern und in der Entwicklung zurückbleiben. Ausser den allgemeinen Krankheitserscheinungen — starke Abmagerung, struppiges Haarkleid, schlechte Haltung, Apathie — ist das hervorstechendste Symptom der Husten, den die Tiere, soweit sie nicht zu grunde gehen, meist bis zur Schlachtung behalten, die nach Beendigung der Mastperiode im 8—10 Lebensmonat erfolgt. Besonders die Aehnlichkeit der pathologisch-anatomischen Befunde mit den Schilderungen von SHOPE veranlasste die Riemser Autoren das Ferkelkümern nach gleichen Ge-



sichtspunkten wie SHOPE zu untersuchen, und es ergab sich die überraschende Tatsache, dass bei 23 von 34 untersuchten Tieren das Bakterium *influenzae suis*, wie es die Autoren nennen, angetroffen wurde und zwar bei 15 von diesen in Reinkultur. Es ergab sich ferner, dass bakterienfreie Filtrate des Lungenpresssaftes dieser Tiere eine Art Viruskrankheit hervorrufen, bei der die Tiere zwar klinisch sehr schwer erkranken können, pathologisch-anatomisch aber nur eine geringe Schwellung der Lymphknoten und keine Krankheitsbefunde an den Lungen zeigen. Die Verimpfung von Kulturen des Bakterium *influenzae suis* allein, sei es subkutan oder intravenös oder intranasal oder intrapulmonal, rief keine Erkrankungen der Tiere hervor. Die kombinierte Infektion durch Filtrat und I-B. führte bei 2 von 11 intranasal geimpften Tieren die charakteristische Pneumonie herbei. Dass die Zahl der Erfolge hierbei nicht grösser war, lag aller Wahrscheinlichkeit daran, dass für die ersten 9 Tiere ältere Laboratoriumsstämme verwendet wurden, während für die letzten beiden Tiere Influenzabakterien benützt wurden, die sich erst in der vierten Passage ausserhalb des Tierkörpers befanden.

Obwohl der endgültige Beweis noch nicht erbracht ist, besteht doch eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die beiden so ähnliche Befunde liefernden Krankheiten, die akute Seuche in Amerika und die chronische Enzootie in Deutschland, die gleiche Ursache haben. Die Unterschiede des Verlaufs lassen sich vielleicht daraus erklären (WALDMANN), dass die Schweine in Amerika in der Regel in Herden im Freien gehalten werden und Stallhaltung seltener ist. So greift die Hog-flu in Amerika vielleicht ähnlich um sich, wie wir es von der Maul und Klauenseuche kennen, wenn sie einmal in ein Weidegebiet eingeschleppt ist. In Deutschland findet sich dagegen ganz überwiegend Stallhaltung, und WALDMANN ist der Meinung, dass für die Verbreitung der Ferkelgrippe nicht so sehr der Kontakt von Herde zu Herde, sondern der Verkauf von Zuchttieren verantwortlich zu machen ist.

Auch in ihrem jahreszeitlichen Verhalten stimmen die amerikanische und die deutsche Krankheit überein, indem sie vorwiegend im Herbst und frühen Winter vorkommen. WALDMANN glaubt im Sommer eine Besserung der Epizootie beobachtet zu haben, und damit scheint in Zusammenhang zu stehen, dass die *experimentellen Uebertragungsversuche in den warmen Monaten schwerer gelangen* als in der Zeit vom späten Herbst bis zum April.

Die Befunde von SHOPE und SHOPE und LEWIS veranlassten SMITH, ANDREWES und LAIDLAW, das *Virus der Hog-flu* mit ihrem von *influenzakeranken Menschen* gewonnenen Virus im *Frettchen-Versuch zu vergleichen*. Das Ergebnis war, dass das Virus der Hog-flu beim Frett eine Krankheit hervorrief, die sich *in nichts von der Humanvirus-Infektion unterschied*. Auch erwiesen sich Frette nach Überstehen der Humanvirus-Infektion als immun gegenüber der Hog-flu-Virus-Infektion und umgekehrt. Schliesslich ergab sich auch darin eine Parallele,



dass Mitverimpfung von *Hemophilus influenzae* (suis) mit dem Virus der Hog-flu bei den geimpften Fretten — ähnlich wie I.-B. bei dem Human-Virus — keinen Einfluss auf den Ablauf der Erkrankung hatte.

SHOPE, der nun nach diesem Vorbilde der englischen Autoren ebenfalls Uebertragungsversuch mit seinem Hog-flu-Virus auf *Frettchen* vornahm, bestätigte deren Ergebnisse und fand darüber hinaus, dass durch die kombinierte intranasale Virus-Bazillen-Infektion bei den Fretten doch eine schwerere, zur Pneumonie führende, gelegentlich sogar tötliche Krankheit erzeugt werden könne, wenn die Impfung unter leichter Aethernarkose vorgenommen würde. Vermutlich gelange dabei mehr Infektionsstoff in tiefere Teile der Luftwege, weil während der Narkose der Niesreflex aussetzt, unter dem die Tiere sonst einen beträchtlichen Teil des verimpften Materials rasch wieder von sich geben. Nach 16 Passagen durch das Frett erwies sich das Virus der Hog-flu im Gemeinschaft mit I.-B. unverändert pathogen für das Schwein.

Nach diesen Ergebnissen musste es von Interesse sein, zu prüfen, ob das vom influenzakranken *Menschen* gewonnene Virus auf das *Ferkel* übertragbar ist. Ein positives Ergebnis erschien nicht ganz ausichtslos. Auch ergab sich im Falle des Erfolges gleichzeitig die Aussicht, beim Humanvirus-Studium nicht mehr allein mit dem Frett, sondern auch mit dem Ferkel experimentieren zu können und damit gleichzeitig mit einer Tierart, die, wie der Mensch, bei Influenza leichter als das Frett unter den Zeichen einer Bronchopneumonie erkrankt. Dieser Nachweis gelang in der Tat. Es lies sich zeigen, dass das englische Humanvirus und seine Frettpassagen bei intranasaler Verimpfung auf das Jungferkel klinisch Apathie, Fressunlust, Gewichtsverlust, oft Temperaturerhöhungen und Husten hervorriefen; der Verlauf war deutlich schwerer, wenn Virus im Kombination mit I.-B. gegeben wurde, während I.-B. allein ohne Zeichen einer klinischen Erkrankung ertragen wurden und keinen oder fast keinen pathologisch-anatomischen Befund ergaben.



Ich begann meine Untersuchungen mit einer *Verimpfung von I.B.* auf Ferkel. 8 Tiere wurden intranasal, intrapulmonal oder intraperitoneal mit Kulturen der I.B. — entweder rein oder im Verein mit lebenden oder toten Staphylococcenkulturen — geimpft, ohne dass irgendwelche Zeichen von Erkrankung eintraten. Nur die zweimal ausgeführte intracardiale Infektion führte zu einer klinischen Erkrankung unter Apathie, Fressunlust, Zittern und zwei Tage anhaltender Temperaturerhöhung um ca. 1 Grad Celsius. Danach trat Entfieberung und wieder normales Verhalten ein. Das auf Fieberhöhe entnommene Herzblut, auf ein neues Ferkel überimpft, rief keine Krankheitszeichen hervor. Bei Tötung und Sektion der nach dem Fieber wieder äusserlich gesunden Tiere fand sich auch kein krankhafter Organ-Befund.

Schon bei diesen ersten Experimenten machte ich die Erfahrung, dass das Arbeiten mit Schweinen keineswegs angenehm oder einfach ist. Selbst die 2 bis 6 Wochen alten Tiere, mit denen ich in der Regel gearbeitet habe, widersetzen sich mit grosser Kraft, Wildheit und ohrenbetäubendem Schreien allen Eingriffen in ihre Freiheit. Der Umgang auch mit diesen Tieren will also gelernt sein.

Die ersten 4 Verimpfungen von Humanvirus (Virus III, 3, eine Frett-Passage des englischen Originalvirus BW 570) blieben erfolglos, d. h. es traten keine klinischen Krankheitszeichen ein und die Verimpfung von Lungen- und Drüsengewebe eines der getöteten Tiere auf 2 Frette verlief negativ. Das negative Ergebnis wird darauf zurückgeführt, dass die benutzten Tiere zu alt waren. KÖBE fand bei seinen Untersuchungen auf Riems, dass das Alter der Tiere von grösster Bedeutung ist. Seine anfangs mit 7—8 Wochen alten Ferkeln durchgeführten Experimente verliefen erfolglos, wurden dagegen regelmässig positiv, als er 2—4 Wochen alte Tiere benutzte.

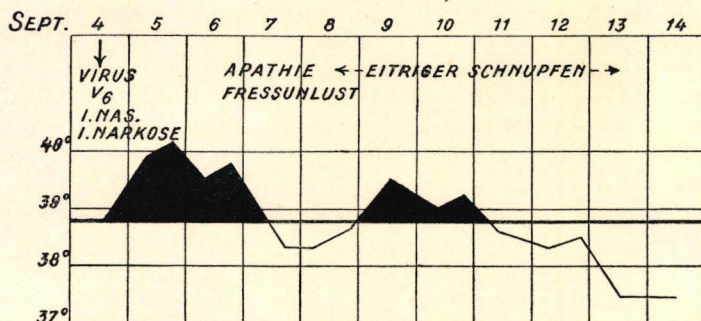
Am 28. VIII. wurde ein neuer Versuch angesetzt. Intranasal unter leichter Aethernarkose erhielt Ferkel V<sub>3</sub>: Humanvirus III, 3, Ferkel V<sub>5</sub>: Influenza-Bazillen und Ferkel V<sub>6</sub>: Virus + I.B. An einem Kontrollfrett wurde die Wirksamkeit der benutzten Virusaufschwemmung geprüft. Die Ferkel V<sub>3</sub>, V<sub>5</sub> und V<sub>6</sub> wurden am 30. VIII. mit den gleichen Materialien noch einmal nachgeimpft. Am 1. IX. zeigt das Ferkel V<sub>6</sub> als einziges einen Temperaturanstieg auf 39,2 Grad; es liegt teilnahmslos da, zittert, frisst nicht, während V<sub>3</sub> und V<sub>5</sub> in Wesen nicht verändert sind. 2. IX. gleicher Befund. 3. IX. V<sub>6</sub> erscheint etwas munterer. Temp. 38,3. Daher werden die Tiere getötet. Die Sektion ergibt bei V<sub>3</sub> bis zu einige leicht vergrösserte Drüsen keinen Befund, auch bei V<sub>5</sub> keinen Befund. Bei V<sub>6</sub> dagegen finden sich die sublingualen, submaxillaren, substernalen, peribronchialen und Hilusdrüsen vergrössert und mit Haemorrhagien durchsetzt. In beiden Oberlappen, rechts mehr als links, finden sich kleinere und grössere bronchopneumonische, dunkelrote Verdichtungsherde. Eine aus dem erkrankten Lungengewebe hergestellte Aufschwemmung wird am 4. II. auf Frett VIII, 1 und am 8. IX. auf Frett IX, 1 verimpft. Beide Tiere erkrankten in typischer Weise an fieberhaftem, eitrigem Schnupfen. (s. Abb. 6 und 7).

Auf Grund dieses ersten positiven Ergebnisses wird nun ein grösserer Versuch angesetzt. 12 Ferkel erhielten am 7. IX. intranasal unter leichter



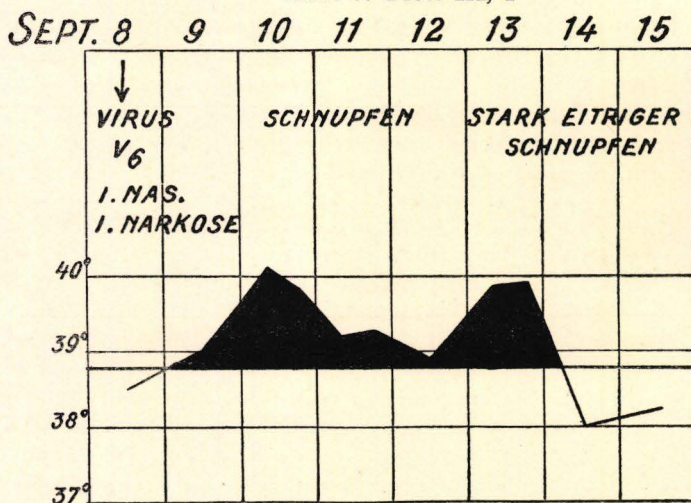
Narkose verschiedene Materialien in ca 10 ccm Impfmenge unter leichten Druck eingespritzt und wurden sämtlich nach 10 tägiger Beobachtung getötet und sezziert. Das Ergebnis ist aus Abb. 8 zu ersehen. Die Schwere der Ver-

Abb. 6 Frett VIII, 1



FRETT VIII, 1, INFICIERT MIT DEM DURCH DAS SCHWEIN PASSIERTEN HUMANVIRUS

Abb. 7. Frett IX, 1



FRETT IX, 1 INFICIERT MIT DEM DURCH DAS SCHWEIN V<sub>6</sub> PASSIERTEN HUMANVIRUS.

änderungen wird von ++++ bis (+) abgestuft, keine Veränderung ist mit — bezeichnet. (Abb. 8. Tabelle).

Man ersieht aus der Tabelle, dass die mit I.-B., geimpften Tiere ohne Krankheitszeichen blieben. Von den mit Filtrat und unfiltriertem Virus geimpften Tieren zeigten die mit dem



ABB. 8. TABELLE.

Name d. Ferkels	V 7	V 8	V 9	V 10	V 11	V 12	V 13	V 14	V 15	V 16	V 17	V 18
Impfmateriel	IB suis (3 Stämme)	IB hominis (5 Stämme)	Filtrat des Virus V 6 aus d. Schwein	Filtrat des Virus III, 3 aus dem Frett	Filtrat des Virus V 6 + IB human	Filtrat des Virus III, 3 + IB human	Virus V 6	Virus III, 3	Virus V 6 + IB human	Virus V 6 + IB suis	Virus III, 3 + IB human	Virus III, 3 + IB suis
Krankheitszeichen	Fieber ....	—	—	—	Das Tier wird wegen eines ausgedehnten durch Läusebisse entstandenen Ausschlags nach 4 Tagen aus dem Versuch gezogen.	—	—	++	+++	+++	—	+
	Apathie....	—	—	(+)		—	—	+	++++	++	++++	+
	Fressunlust	—	—	(+)		—	—	+	++++	++	++++	+
	Husten ...	—	—	—		—	—	—	+	—	(+)	+
Pathol. anatom. Befund	Drüsenvergrößerung u. Hämorrhagien	(+)	—	+	(+)	—	+++	+++	+	+(+)	+	+
	Bronchopneumonieherde	—	(+) ?	im r.O.—L. 1 Narbe mit entzündlicher Umgebung	+	++ (r. O.—L. und beide M.—L.)	++ (r. u. l. O.—L.)	++ (l. O.—M. und U.—L.)	++ beide Lungen in der ganzen Ausdehnung grau u. atelektatisch	+++ (r. O. und M.—L.)	beide Lungen in der ganzen Ausdehnung grau u. atelektatisch	++ (l. O.—L.)
	Sonst .....		Pericardflüssigkeit vermehrt	im l.U.—L. pleurit. Verwachsungen								Beträchtl. Pleuro-Pericarditis



durch das Schwein passierten Humanvirus (Virus V<sub>6</sub>) geimpften Tiere übereinstimmend keine klinischen Veränderungen, die mit dem durch das Frett passierten Humanvirus (III,3)geimpften Tiere dagegen zeigten klinische Krankheitszeichen und zwar das mit unfiltriertem Virus stärker, als das mit Filtrat geimpfte. Schwerere Krankheitsbilder ergaben sich durchgehend bei den mit Virus+Bazillen geimpften Tieren, und zwar waren die Erscheinungen ausgeprägter bei den mit Humanbazillen geimpften Tieren. Offenbar hängt das mit der Virulenz der Stämme zusammen: die Humanbazillen-Stämme waren für Kaninchen hoch pathogen, die Bact. infl. suis-Stämme waren für Kaninchen völlig apathogen.

In Uebereinstimmung mit den klinischen Krankheitsbildern finden sich die schwereren pathologisch-anatomischen Veränderungen bei den mit Virus und Virus+Bazillen geimpften Tieren. Die Abstufung kommt hier nicht so gut zum Ausdruck, wie beim klinischen Krankheitsbild, doch wird sich ein endgültiges Urteil hierüber erst gewinnen lassen, wenn die histologischen Befunde vorliegen, die bei der Zusammenstellung dieser Ergebnisse noch nicht vorliegen.

Zwei Umstände sind es besonders, die für meine Untersuchungen *ungünstig* waren: Erstens, dass die holländischen Schweinerassen, unter denen sowohl die akute amerikanische Seuche, wie das chronisch enzootische Ferkelkümern kaum vorkommt, offenbar besonders resistent sind, nur vergleichsweise leicht erkranken und sich sehr schnell wieder erholen. Zweitens, dass zur Zeit dieser Versuche gerade das ungewöhnlich trockene, warme Wetter war, das — wie oben bereits berichtet wurde — auch anderorts sich als ungünstig für die Influenzaexperimente am Schwein erwiesen hat.

Wenn also auch die Impferfolge *graduell* nicht sehr eindrucksvoll sind, so scheinen sie doch ausreichend zum Beweise, dass das durch SMITH, ANDREWES und LAIDLAW von influenza-kranken Menschen gewonnene Virus, besonders in Combination mit virulenten I.-B., intranasal Jungferkeln eingepfht, bei diesen Tieren die klinischen und pathologisch-anatomischen Zeichen einer Bronchopneumonie hervorzurufen imstande ist.



## SCHRIFTTUM.

- D. u. R. THOMSON, Ann. of the PICKETT—THOMSON Research Laborat. Bd. IX., Baillière Tindall a. Cox, 1933, London.
- WILSON SMITH, C. H. ADREWES u. P. P. LAIDLAW, The Lancet, 1933 p. 66, und 1934 2 p. 859.
- W. KRUSE, Münch. Med. W. 65, 140 (1918).
- NICOLLE en LEBAILLY, Compt. r. Ac. sciences 167, 607 (1918).
- H. G. GIBSON, BOWMAN F. B., CONNOR J. I. Brit. med. J. 14 Dec. 1918. S. 645 Spec. Reports 36. Med. Res. C. 1919.
- G. BOEHR, L. LOEWE, Arch. int. med. 30, 307 (1922).
- A. M. WOODRUFF u. E. W. GOODPASTURE, Americ. Journ. Path. VII. 209.
- Dieselben und G. J. BUDDINGH, Science, 1931, +. XXIV, 371 und Americ. Journ. Path. VIII. 271.
- G. ELKELES, Schweiz. Mediz. Wochenschrift 61, 677 (1931).
- R. PFEIFFER, Zentralblatt f. Bakteriologie, Abtlg. I. Orig. 121. 241 (1931).
- FONTÈS, Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. t. 18, fasc. I, p. 163. Centr. Bakt. Orig. 49, p. 317.
- A. CALMETTE, J. VALTIS, M. LACOMME. A. J. PASTEUR, XLII, p. 1149, Oct. 1928.
- A. CALMETTE, J. VALTIS. A. J. PASTEUR, XLIV, p. 629.
- F. J. H. VAN DEINSE, Versl. tub. studiee. 1932, VI 36.
- I. P. BIJL, Idem blz. 3.
- P. C. FLU, Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1934, 3019.
- H. HOPPE, Z. f. Hyg. 98, 130 (1922).
- DUJARRIC DE LA RIVIÈRE, C. r. Ac. Sc. 167, 606 (1918).
- G. GATES, P. K. OLITSKY, J. Am. med. Ass. 78, 1020 (1922).
- KENDALL, Science, 74, 129 (1931).
- R. E. SHOPE, Journ. Exp. Med. 54, 349 (1931).
- P. A. LEWIS und R. E. SHOPE ebenda 54, 361 (1931).
- R. E. SHOPE, ebenda 54, 373 (1931); 56, 575 (1932); 59, 201 (1934); 60, 49 (1934).
- K. KÖBE, Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 129, 161 (1933).
- O. WALDMANN, Berl. Tierärztl. Wochenschr. 49, Nr. 44 (1933).
- H. KIRCHENBAUER, Ztschr. f. Infekt. Krankh. etc. d. Haustiere 45, H. 4 (1933).
- K. Köbe u. W. SCHMIDT, Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 42, 145 u. 163 (1934).

## Anmerkung:

Bei vielfachen Temperaturmessungen zeigten normale Frettchen nur ausnahmsweise gelegentlich eine Temperatur von über 38,8°.

---



## DE REACTIE VAN PIRQUET BIJ 3000 PERSONEN

DOOR

Dr. H. D. BOER en J. P. BIJL, Artsen.

---

Het verheugende feit, dat de sterfte aan tuberculose in de laatste decennia sterk gedaald is, in ons land zelfs van  $\pm 20$  per 10.000 inwoners in 1900 op  $\pm 7$  per 10.000 inwoners in 1932, doet verschillende vragen rijzen. Is deze daling een gevolg van een hooger weerstandsvermogen, dat het tegenwoordige geslacht t.o.v. den tuberkelbacil heeft, heeft de tuberkelbacil in de loop der jaren veel van zijn virulentie ingeboet, is men thans in therapeutisch opzicht zooveel beter toegerust dan vroeger, is de kans op besmetting zooveel minder geworden? De doelbewuste strijd tegen den tuberkelbacil, de verbeterde omstandigheden waaronder de Nederlandsche bevolking tegenwoordig leeft, de huisvesting, de voeding, de arbeidsvoorwaarden, alle te zamen maken de kans op besmetting kleiner dan enkele tientallen van jaren geleden. A priori mag men dus wel aannemen dat in deze verminderde infectiekans althans één der oorzaken van de daling der tuberculose-sterfte gelegen is. Deze verminderde infectiekans zal tot uiting moeten komen bij een onderzoek naar de overgevoeligheid voor tuberculine. Door het verrichten van een dergelijk onderzoek stelden wij ons voor een antwoord te krijgen op een tweetal vragen: in de eerste plaats wilden wij nagaan welk percentage van bepaalde bevolkingsgroepen als besmet met tuberculose moet worden beschouwd, in de tweede plaats vroegen wij ons af hoe groot de kans op besmetting is van volwassenen, die nog nooit geïnfecteerd geweest waren.

Het onderzoek is nog in geen deele afgelopen, in het bijzonder hebben wij nog geen gelegenheid gehad een opzettelijk onderzoek betrekking hebbende op de tweede vraag in te stellen,



maar de tot nog toe verkregen gegevens wettigen het toch, thans reeds enkele mededeelingen te doen.

Wat de uitvoering van het onderzoek betreft, deden zich verschillende vragen voor. De eerste vraag betrof de wijze, waarop onderzocht zou moeten worden of een allergische toestand aanwezig is.

De verschillende tuberculine-tests hebben uit epidemiologisch oogpunt de beteekenis van een indicator te zijn van een te eeniger tijd plaats gehad hebbende infectie. Al naar gelang van de omstandigheden zal men aan de een of aan de andere test de voorkeur geven. Aangezien wij ons voorstelden een zeer groot aantal personen te onderzoeken, kwamen in aanmerking de reactie van Mantoux en die van PIRQUET.

Eerstgenoemde reactie heeft het voordeel, dat zij zeer gevoelig is, dat bekend is hoeveel tuberculine wordt ingebracht en dat zij ook quantitatief is te gebruiken. De reactie van PIRQUET geeft niet altijd een positieve uitkomst, waar de intracutane of subcutane dit wel doet. d' ARCY HART verzamelde uit de literatuur 4787 gevallen van klinische tuberculose, waarbij de reactie van PIRQUET verricht werd. Hiervan gaven 766 d. i. 16 % een negatieve uitkomst. HART wijst er evenwel op, dat vele onderzoekers de reactie met verdunde tuberculine verrichtten, dat niet altijd tuberculine van dezelfde herkomst gebruikt werd en dat de fout bij kinderen groter is dan bij volwassenen. Bovendien is bekend, dat bij bepaalde vormen van tuberculose de allergie-reacties negatief plegen te zijn. PEETERS, die onverdunde tuberculine gebruikte, kreeg bij tuberculeuse volwassenen slechts in 1.5 % der gevallen een negatieve reactie. Als bezwaar tegen de methode van PIRQUET wordt bovendien aangevoerd, dat zij moeilijk voor doseering vatbaar is daar men niet weet hoeveel tuberculine in de huid terecht komt.

Ondanks de bezwaren verbonden aan de PIRQUET-reactie, meenden wij toch aan deze methode de voorkeur te moeten geven boven die van MANTOUX. De negatieve uitkomsten bij tuberculose-patiënten toch, worden vooral waargenomen bij lijders in het laatste stadium, bij meningitis, miliair tuberculose en bij mazelen. Aangezien ons onderzoek in het bijzonder be-



trekking zou hebben op personen, die klinisch niet tuberculeus waren, zou reeds daardoor de fout kleiner worden. Bovendien zou door een zoo gevoelig mogelijke techniek toe te passen, gebruik te maken van onverdunde tuberculine en eventueel herhaling der reactie, de fout nog kleiner te maken zijn. Het groote voordeel van de methode van PIRQUET voor ons onderzoek lag evenwel in de eenvoudige techniek, waardoor zij gemakkelijk bij een groot aantal personen is toe te passen. Bovendien zou de PIRQUET-methode de beste vergelijking geven met de uitkomsten, die 20 à 25 jaar geleden verkregen zijn, toen die methode vrij algemeen werd toegepast.

Wij verrichtten de reactie volgens de scarificatie-methode. Eén scarificatie diende ter contrôle van twee scarificaties met tuberculine. Ook lichte reacties werden als positief aangemerkt.

De tweede vraag, die zich voordeed, betrefte de categorieën van personen, die onderzocht zouden worden. Deze vraag was gemakkelijk te beantwoorden omdat zij terug te brengen was tot de vraag welke categorieën beschikbaar waren.

Dank zij de van verschillende zijde ontvangen medewerking, hebben wij een onderzoek kunnen instellen bij, resp. gegevens ontvangen betreffende:

- 1<sup>o</sup>. medische studenten te Leiden
- 2<sup>o</sup>. militairen.
- 3<sup>o</sup>. personeel van de Willem Arntsz-Stichting.
- 4<sup>o</sup>. verpleegden van de Willem Arntsz-Stichting.

De derde vraag betrefte de anamnese. Uit statistisch oogpunt toch zou het van beteekenis kunnen zijn, bepaalde gegevens te vergelijken. Wij hebben op de volgende punten onzen aandacht gevestigd: geslacht, geboortejaar, woonplaatsen op verschillende leeftijden, beroep, tuberculose in omgeving, tuberculose in eigen anamnese.

Wat de uitkomsten van het onderzoek betreft kunnen wij het volgende mededeelen.

In het geheel zijn 3373 personen onderzocht; hiervan reageerden 1011 = 30 % negatief.

Bij nadere analyse van den leeftijd blijkt, dat van 696 personen,



die tusschen 1846 en 1900 zijn geboren, 32 negatief reageerden d. i. 5.9 %. Van 148 personen, die tusschen 1901 en 1905 zijn geboren reageerden 9 d. i. 6.1 % negatief.

Uit de uitkomst van dit onderzoek, betrekking hebbende op personen van wie men verwachten mag, dat zij met tuberkelbacillen besmet zijn geweest, blijkt dus, dat de fout welke de reactie van PIRQUET aankleeft zeer gering is. In het bijzonder blijkt hieruit, dat de wel eens naar voren gebrachte opvatting, dat de tegenwoordige tuberculine minder sterk zou zijn dan die welke 25 jaar geleden gebruikt werd, niet steek houdt.

Onderzocht zijn 2157 personen, die in de jaren 1911 t/m 1914 geboren zijn. Hiervan reageerden 876 negatief d. i. 41 %. Verwijderen wij uit deze statistiek de gevallen, waarin een op tuberculose wijzende aandoening in de anamnese voorkomt, dan krijgen wij de volgende getallen: 1839 personen, waarvan 864 d. i. 47.3 % negatief.

Wij kunnen dus de slotsom trekken, dat van jonge menschen van ongeveer 20—23 jarigen leeftijd, die niet aan tuberculose lijdten en ook geen op tuberculeuse aandoeningen wijzende anamnese hebben, ongeveer de helft een negatieve PIRQUET vertoonen.

De verdere analyse van de getallen heeft nog niet veel succes gehad. De getallen, die verkregen werden door volgens de be-roepen of de woonplaatsen in te deelen, bleeken te klein te zijn om daaruit een slotsom te kunnen trekken. Ter wille van een vergelijking met het, voor 25 jaar door Prof. NOLEN verrichte onderzoek, mogen de volgende getallen betrekking hebbende op studenten vermeld worden.

Prof. NOLEN (1911)	140 Leidsche studenten	8 % negatief
Prof. WOLFF (1934)	398 Utrechtsche	„ 40 % „
BOER en BIJL	225 Leidsche	„ 32 % „

Uit deze, zij het dan ook kleine getallen, kan toch de gevolgtrekking gemaakt worden, dat de infectiekans bij de beter gesitueerde Nederlanders in de laatste 25 jaar sterk gedaald is.

Een opzettelijk onderzoek naar de infectiekans van hen, die negatief reageerden, hopen wij het volgend jaar te verrichten. Toch is ons toevalligerwijze gebleken, dat 3 negatief reagerende



personen, van wie 2, volgens MANTOUX zijn onderzocht en ook daarbij negatief reageerden, als 't ware onder onze oogen een positieve PIRQUET hebben gekregen. Zij vertoonden bij klinisch onderzoek een min of meer duidelijke tuberculeuse afwijking; ook uit deze casuistische waarnemingen blijkt dus wel, dat men niet op een leeftijdsimmunitet mag rekenen.

Alvorens enkele beschouwingen te houden, waartoe dit onderzoek ons aanleiding gaf, willen wij nog een paar punten naar voren brengen.

Reeds spoedig werden wij voor de vraag gesteld of de reactie van PIRQUET absoluut ongevaarlijk is. In de literatuur hebben wij niets kunnen vinden wat op een nadeelige werking van de reactie wees. Een desbetreffende vraag, die wij tot de leiders der consultatiebureaux voor tuberculose richtten, werd door de meeste beantwoord met de mededeeling, dat zij nooit een ongunstige invloed gezien hadden. Sommigen deelden mede, dat de locale reactie wel eens zeer hevig was en gepaard ging met lymphangitis en lymphadenitis of zelfs lichte temperatuursverhooging. Ook werd mededeeling gedaan van meningitis bij jonge kinderen korten tijd na het verrichten van een PIRQUET, zonder dat evenwel gezegd kon worden, dat een oorzakelijk verband tusschen beide bestond. Prof. KUENEN met wien wij over vermeende nadeelige gevolgen der reactie spraken, heeft daarop de studenten, die een ietwat sterke reactie gehad hadden of zich onwel gevoeld hadden, nauwkeurig klinisch onderzocht. Geen van allen vertoonden evenwel verschijnselen, waaruit men de conclusie zou kunnen trekken, dat de „PIRQUET” gecontraindiceerd zou geweest zijn. Zelf hebben wij nooit eenige bedenkelijke complicatie waargenomen. Een enigszins sterke locale reactie met wat lymphklierzwellen en een enkele maal eenige temperatuursverhooging waren de hevigste verschijnselen, door ons geconstateerd. Hoe voorzichtig men moet zijn met subjectieve klachten bleek ons uit de mededeeling van een paar verpleegsters, die zich „den geheelen dag ziek” gevoeld hadden, hoewel met de beste wil van de wereld geen spoor van locale reactie was waar te nemen.



Wij zijn dan ook van meening, dat een onderzoek als het onze alleszins geoorloofd is.

Bij 167 studenten hebben wij de reactie zoowel met humane als met bovine tuberculine verricht. In slechts 3 gevallen bestond een duidelijk discordantie. Eén maal was de reactie met humane tuberculine positief en die met bovine negatief, tweemaal omgekeerd. Hoewel dit verschil tusschen de beide tuberculinen niet groot is, zullen wij aan dit punt bij ons verder onderzoek toch bijzondere aandacht schenken.

Wat het aflezen der reactie betreft hebben wij ook een lichte roodheid als positief beschouwd. Eénmaal bleek een aanvanke-lijk negatieve reactie, na ongeveer 10 dagen duidelijk positief te zijn.

Zooals gezegd is, hadden van 1839 personen, die tusschen 1911 en 1914 geboren waren, en in hun anamnese niets hadden wat op een tuberculeuse aandoening wees, 47.3 % een negatieve PIRQUET. Van 318 personen van denzelfden leeftijd, die wel een verdachte anamnese hadden, reageerden 12. d. i. 3.7 % negatief. Hieruit is dus te concludeeren dat „klieren”, „pleuritis” enz., in de anamnese, als regel op een tuberculeuse infectie wijst.

Welke conclusies kan men van praeventief geneeskundig standpunt uit de bovengenoemde feiten trekken?

Het feit, dat tegenwoordig een veel grooter percentage der bevolking van ongeveer 20—23 jarigen leeftijd PIRQUET-negatief reageert dan voor  $\pm$  25 jaren het geval was, wijst er op, dat althans één der oorzaken van de dalende tuberculosesterfte gelegen is in de geringere besmettingskans. Het gevolg hiervan is, dat men met de tuberculose-bestrijding, uit een oogpunt van bevolkingsimmunitet precies het tegenovergestelde bereikt van wat men bij andere infectieziekten nastreeft. Terwijl men t. o. v. pokken, roodvonk, diphtherie door kunstmatige actieve immunisatie tracht zoo'n groot mogelijk gedeelte der bevolking immuun te maken, wordt de immunitet t. o. v. tuberculose steeds kleiner. In de periode van voorspoed, die wij nog altijd beleven, zal deze verminderde bevolkingsimmunitet geen groot gevaar behoeven op te leveren. In tijden van vermeerderd in-



fectiegevaar, in oorlogstijd bijv., zal dit wel degelijk een ernstig gevaar beteekenen. Men denke slechts aan de hooge tuberculose-mortaliteit van de zwarte troepen tijdens den wereldoorlog.

Ten einde aan de gevaren, die de verminderde immuniteit oplevert, tegemoet te komen staan ons drieërlei soorten maatregelen ten dienste.

In de eerste plaats verdient een immunisatie met B. C. G. althans voor bepaalde personen, aan aanbeveling. Wij zullen hier niet nader op ingaan. Het voor- en tegen van de inenting CALMETTE-GUÉRIN is algemeen bekend.

In de tweede plaats zou men PIRQUET-negatieve personen van bepaalde beroepen kunnen uitsluiten. Men denke b.v. aan het beroep van arts, verpleegster, enz. De bezwaren aan een dergelijke maatregel verbonden, liggen voor de hand. Bovendien zou het zeer de vraag zijn of iemand, die het met een negatieve PIRQUET tot het eindexamen Gymnasium gebracht heeft, terwille van die negatieve PIRQUET, zijn plan om medicijnen te studeeren, zal opgeven.

In de derde plaats zouden wij willen wijzen op de beteekenis, die de allergische reacties in klinisch opzicht kunnen hebben. Gewoonlijk wordt opgegeven, dat het verrichten van de reactie van PIRQUET, alleen bij kinderen beteekenis heeft. Dit standpunt wordt o. a. nog verdedigd door d'Arcy HART in zijn in 1932 verschenen „special report” van de „Medical Research Council”. Ongetwijfeld was dit standpunt 25 jaar geleden, toen vrijwel alle volwassenen positief reageerden, juist. Tegenwoordig nu men kan aannemen, dat het aantal negatief reagerende volwassenen steeds groter wordt, zal het noodig zijn de vroegere opvattingen te herzien. Bij een steeds toenemend aantal volwassenen zal de reactie van PIRQUET wel degelijk klinische beteekenis hebben. Men moet daarom weten hoe de reactie vóór het ingestelde onderzoek verliep. Ten einde hiermede bekend te zijn, zouden wij een lans willen breken voor de invoering van de in Frankrijk wel in gebruik zijnde, carnets de santé. Deze kleine boekjes worden den ouders bij de aangifte van de geboorte van een kind ter hand gesteld, en bevatten een aantal bladzijden, waarop systematisch allerlei gegevens betreffende de



gezondheidstoestand kunnen worden vermeld: inenting, infectieziekten enz. Worden dergelijke boekjes ook in ons land ingevoerd, dan zou daarin ook het verloop der reactie van PIRQUET vermeld kunnen worden. Talrijke personen toch worden in den tegenwoordigen tijd zoo nu en dan „gepirquet”, b.v. op de vele consultatiebureaux. Gewenscht zou het zijn, dat ook bij het onderzoek door den schoolarts een tuberculine-reactie verricht werd. Wordt het resultaat van de reactie dan steeds in het „Carnet de Santé” vermeld, dan zal, indien bij een lijder aan een niet goed te diagnostiseeren ziekte, de voorheen negatieve PIRQUET in een positieve blijkt te zijn veranderd, een sterke aanwijzing op den tuberculeusen aard der ongesteldheid aanwezig zijn. Door aldus in het allereerste stadium de diagnose te kunnen stellen en de noodige maatregelen te kunnen nemen, zal groote kans bestaan, de ziekte tot stilstand te brengen.

De schaduwzijde verbonden aan den zegenrijken strijd tegen de tuberculose, de daling der bevolkingsimmunitet, behoeft ons dus geenszins te bezorgd te maken voor de toekomst. De praeventieve geneeskunde beschikt over verschillende middelen om de bezwaren aan die verminderde immunitet verbonden, te ondervangen.

#### SAMENVATTING.

Van 3375 personen reageerden 30 % PIRQUET negatief. Van degenen, die tusschen 1911—1914 geboren waren, en geen tuberculose in de anamnese hadden, reageerden ongeveer 50 % negatief. Van 225 studenten reageerden 32 % negatief. Prof. WOLFF vond, dat van 398 studenten 40 % negatief reageerden, terwijl Prof. NOLEN in 1911 vond, dat van 140 studenten 8 % een negatieve PIRQUET hadden. Men mag aannemen, dat de bevolkingsimmunitet tegen tuberculose in ons land sterk gedaald is en nog dalende is. De hieraan verbonden nadeelen kunnen op verschillende wijze ondervangen worden b.v. 1<sup>o</sup>. inenting met B. C. G., 2<sup>o</sup>. wering van PIRQUET-negatieve personen uit „gevaarlijke beroepen”, 3<sup>o</sup>. invoering van de in Frankrijk ge-



bruikelijke carnets de santé, waarop o. a. ook de uitkomst der reactie van PIRQUET vermeld moet worden, zoodat deze reactie ook bij volwassenen meer klinische beteekenis krijgt.

### ZUSAMMENFASSUNG.

Von 3375 Personen reagierten 30 % PIRQUET-negativ. Von denjenigen, die zwischen 1911 und 1914 geboren waren und keine Tuberkulose in der Anamnese hatten, reagierten etwa 50 % negativ. Von 225 Studenten reagierten 32 % negativ. Prof. WOLFF fand, dass von 398 Studenten 40 % negativ reagierten, während Prof. NOLEN 1911 feststellte, dass von 140 Studenten 8 % eine negative PIRQUET-Reaktion hatten. Man darf annehmen, dass die Bevölkerungsimmunität gegen Tuberkulose in Nederland stark gesunken ist und noch weiter sinkt. Die hiermit verbundenen Nachteile können auf verschiedener Weise vermieden werden, z. B. 1.) durch Impfung mit B. C. G. 2.) Fernhalten PIRQUET-negativer Personen aus „gefährlichen“ Berufen. 3.) Einführung der in Frankreich üblichen „carnets de santé,” auf welchen u. a. auch das Ergebnis der PIRQUETSchen Reaktion vermeldet werden muss, sodass diese Reaktion auch bei Erwachsenen mehr klinische Bedeutung erhält.

### SYNOPSIS.

Out of 3375 persons 30 % showed a negative PIRQUET-reaction. Out of those who had been born between 1911—1914 and had no tuberculosis in the anamnesis, about 50 % reacted negatively. Out of 225 students 32 % reacted negatively; Prof WOLFF found that out of 398 students 40 % reacted negatively, while in 1911 Prof. NOLEN found that out of 140 students 8 % had a negative PIRQUET. It may be assumed that the immunity of the population against tuberculosis has greatly decreased in our country and is still on the decrease. The disadvantages connected with this phenomenon can be obviated in different ways; e. g. 1. by inoculation with B. C. G. ; 2. by the exclusion of PIRQUET-negative persons from „dangerous professions”; 3. by the introduction of the „carnets de santé” which are



used in France, and on which, among other things, the issue of the reaction of PIRQUET must be stated, so that, also with adults, this reaction is clinically of more importance.

### RÉSUMÉ.

Chez 3375 personnes la cuti-réaction de PIRQUET était négative dans 30 p. 100. De ceux, nés entre 1911 et 1914 et sans antécédents tuberculeux 50 p. 100 environ avaient une réaction négative. De 225 étudiants un pourcentage de 32 était négatif. Le Prof. WOLFF constata que de 398 étudiants 40 p. 100 avaient une réaction négative; le Prof. NOLEN trouva en 1911 que de 140 étudiants 8 p. 100 avaient une réaction négative.

Il y a lieu d'accepter que l'immunité de la population contre la tuberculose a beaucoup diminué et qu'elle diminue toujours. On peut remédier aux inconvénients qui s'en dégagent de manières différentes:

- 1°. en vaccinant avec le B. C. G.
- 2°. en empêchant les personnes à une réaction négative d'entrer dans les métiers soi-disant dangereux.
- 3°. en introduisant des carnets de santé dont on se sert en France et dans lesquels le résultat de la réaction de PIRQUET doit être inscrite, de sorte que cette réaction aura, chez les adultes aussi, une signification plus clinique.

---

Voor de medewerking, die wij bij dit onderzoek ontvangen hebben, betuigen wij ook hier onzen dank aan Prof. Dr. W. A. KUENEN en het Bestuur van de Medische Studenten Faculteit te Leiden, Generaal Majoor S. W. PRAAG, Inspecteur van den Geneeskundigen Dienst der Landmacht en Dr. C. F. ENGELHARD, Geneesheer-Directeur van de Willem Arntsz-Stichting.

---



# ONDERZOEK NAAR HET VOORKOMEN VAN LEVENDE TUBERKELBACILLEN IN GEPASTEURISEERDE FLESSCHENMELK

DOOR

Dr. H. D. BOER, Arts

---

Pasteurisatie van melk beoogt door verhitting op een temperatuur, die de smaak van de rauwe melk zoo weinig mogelijk of niet verandert, een zekere verduurzaming te bewerken, en vooral eventueel aanwezige pathogene microben te doden. De afstervingstemperatuur van de pathogene bacteriën, die in melk kunnen voorkomen, is zeer verschillend. Afgezien van de in het algemeen voor de mensch niet pathogene sporenvormende bacteriën, is de afstervingstemperatuur van tuberkelbacillen hooger dan van alle andere. Aan een goede pasteurisatie van melk dient dan ook als eisch gesteld te worden, dat in de melk aanwezige tuberkelbacillen gedood worden, een eisch, die door alle onderzoekers, die een of andere wijze van pasteurisatie van melk op doeltreffendheid onderzochten, is gesteld. Het heeft geen zin voor mij hier een beschouwing te wijden over de desbetreffende onderzoekingen; ik kan hier volstaan met mede te deelen, dat het inderdaad mogelijk is melk door pasteurisatie te bevrijden van levende tuberkelbacillen. De vraag, die ons hier interesseert is, of dit in de praktijk der pasteurisatie ook steeds geschiedt. Het aantal onderzoekingen hieromtrent is niet groot. Voor wat Nederland betreft is mij alleen bekend een onderzoek verricht in de *Rijksseruminrichting* te *Rotterdam*, waar in 1925—1926 <sup>1)</sup> 190 monsters gepasteuriseerde flesschen-

---

<sup>1)</sup> Verslag Rijksseruminrichting 1925—1926.



melk van 3 melkinrichtingen vrij van levende tuberkelbacillen bleken te zijn, terwijl in 10 % van de monsters uitgeschonken verkochte <sup>1)</sup> melk van dezelfde melkinrichtingen wel levende tuberkelbacillen voorkwamen. In Schotland is in de laatste jaren een uitgebreid en nauwkeurig onderzoek ingesteld naar het voorkomen van tuberkelbacillen in melk, onder leiding van de *Medical Research Council* <sup>2)</sup>. In geen land ter wereld worden zooveel besmettingen van menschen met runder-tuberkelbacillen waargenomen als juist daar; en dit was de reden dat men juiste gegevens wilde verkrijgen over de voornaamste besmettingsbron: de melk. Men heeft daar een zeer groot aantal melkmonsters onderzocht, genomen op de boerderijen, uit de melkbussen, waarin de melk naar de stad gereden werd, uit tanks, waarin de melk verzameld werd, en ook o.a. „heat treated milk” en wel 291 monsters melk gepasteuriseerd door korte verhitting in een continupasteur, waarvan niet minder dan 24 dus 8 % levende tuberkelbacillen bevatten, en 1243 monsters melk, waar de pasteurisatie in een duurpasteur had plaats gehad, dus met langerdurende verhitting; van deze waren 35 monsters met de dierproef positief, dus  $\pm 3$  %.

In dit onderzoek viel vooral op, dat de resultaten van de pasteurisatie in de verschillende melkinrichtingen zeer uiteenliepen.

FRITZSCHE <sup>3)</sup> (bij KLIMMER te *Leipzig*) heeft een klein aantal monsters gepasteuriseerde melk uit een groote stad in Midden-Duitschland onderzocht, die geen van alle aan de eischen voldeden en o.a. veelvuldig levende tuberkelbacillen bevatten.

Waar mij gebleken is <sup>4)</sup>, dat in Nederland de rundertuberkelbacil een belangrijke rol speelt als oorzaak van tuberculose bij kinderen, is het gewenscht te weten, of gepasteuriseerde flesschenmelk een betrouwbaar product is, dat men kinderen zonder

---

<sup>1)</sup> Niet alle uitgeschonken verkochte melk is rauwe melk. Melkinrichtingen pasteuriseeren ook vaak deze melk om zuur worden te voorkomen, vooral in het warme jaargetijde.

<sup>2)</sup> Medical Research Council. Special Report Series No. 189.

<sup>3)</sup> Inaug. Diss. Leipzig 1931.

<sup>4)</sup> Maandschrift v. Kindergeneeskunde II 1933, 337.



bezwaar kan laten drinken. Vooral in den zomer toch geven velen de voorkeur aan deze flesschenmelk boven gekookte.

Wil ik van een aantal monsters melk weten, hoevele daarvan levende tuberkelbacillen bevatten, dan moet ik met ieder van deze, en liefst dan nog met het sediment + de room van een zekere hoeveelheid melk telkens 1 of 2 caviae inspuiten. Een dergelijk onderzoek zal zeer kostbaar worden, als ik een zoo groot aantal monsters wil onderzoeken, dat ik een idee kan krijgen, over de mate, waarin de melk met tuberkelbacillen besmet is. Ik heb daarom niet met ieder monster een nieuwe cavia ingespoten, doch met de verschillende monsters van dezelfde melkinrichting werd telkens dezelfde cavia ingespoten. Gemiddeld om de 5 dagen spoot ik een cavia onderhuids in met het sediment van  $\pm 70$  cc. melk, 10 minuten gecentrifugeerd (3000 toeren). Opzettelijk nam ik niet de room er bij, omdat ik vreesde, dat dit voor de dieren te veel zou zijn. Het bleek, dat zelfs niet alle dieren bestand waren tegen de inspuiting van het sediment alle 5 dagen, wel echter, toen ik (sinds 6 Nov.) het sediment  $1 \times$  uitwaschte met steriel physiologisch water, wat ik, 4 weken na het begin van de proeven, begonnen ben te doen. Alle proefdieren werden 1 keer per week onderzocht op overgevoeligheid voor tuberculine door intracutane inspuiting van  $\frac{1}{10}$  cc. 1 op 10 verdunde oud-tuberculine. Zoodra deze reactie positief uitviel, werd het dier niet meer met melk ingespoten, en werd een ander dier genomen. Aangezien voor de ontwikkeling van de tuberculine-allergie eenigen tijd — gemiddeld enkele weken — na een besmetting met t.b.c. bacillen noodig is, is het dus mogelijk, dat ik een cavia met meer dan 1 monster tuberkelbacillenhoudende melk heb ingespoten, aleer een positieve tuberculine-reactie is opgetreden. Ik zal dus uit het resultaat van deze proef niet kunnen afleiden precies hoeveel monsters melk levende tuberkelbacillen hebben bevat, doch wel *minstens* hoeveel van zulke er onder zijn geweest.

Voorts heb ik, zoodra een cavia op tuberculine reageerde, een der (dan ook altijd vergrootte) liesklieren verwijderd, waaruit ik de tuberkelbacillen kweekte op den voedingsbodem van LOEWENSTEIN. Als de cultuur duidelijk op den voedingsbodem



verschenen was, deed ik sectie op de cavia om de uitbreiding van de tuberculose na te gaan, terwijl met de cultuur een konijn besmet werd, óf 10 mgr. onderhuids, óf wel  $\frac{1}{100}$  mgr. intraveneus, ten einde na te gaan, of de geïsoleerde tuberkelbacillen van bovine oorsprong waren. In het onderzoek, waarvan ik hier verslag doe, heb ik betrokken gepasteuriseerde flesschenmelk van 6 melkinrichtingen, aan te duiden als A, B, C, D, E en F.

*Melkinrichting A:* Cavia 775 werd van 9 October '33 tot en met 19 April '34 ingespoten met het sediment van 35 monsters gepasteuriseerde flesschenmelk. De wekelijks verrichte reactie van MANTOUX was steeds negatief.

*Melkinrichting B:* Cavia 776 werd van 10 October '33 tot en met 16 Dec. '33 15 × ingespoten met een sediment. De wekelijksche MANTOUX reactie was voor het eerst positief op 16 December.

Cavia 861 werd sindsdien ingespoten tot en met 28 Februari '34 in totaal 12 ×, en had op 5 Maart een positieve MANTOUX.

*Melkinrichting C:* Cavia 780 werd 11 October '33 het eerst ingespoten en daarna nog 5 ×, stierf op 5 Nov. '33, met een acuut ontstekings-procesje in de milt en lies; passage op Cavia 804, die verder niet ingespoten werd en stierf op 22 Nov. '33 zonder macroscopische afwijkingen, en wiens liesklieren en milt werden ingespoten bij Cavia 824. Deze cavia, die pas op 16 Dec. '33 voor het eerst met melksediment ingespoten werd, kreeg in totaal tot en met 16 April 21 inspuitingen. De tuberculine-reactie was steeds negatief.

Cavia 806 werd ingespoten van 8 Nov. tot en met 7 Dec. '33 met 7 melk monsters. Op 4 Dec. was de tuberculine-reactie zwak + ?, op 11 December +.

*Melkinrichting D:* Cavia 781, die van 12 Oct. tot en met 4 Nov. '33 6 × ingespoten werd, stierf op 5 Nov. De acuut ontstoken liesklieren werden ingespoten bij Cavia 803, die van 5 Januari tot en met 17 April '34, 19 × werd ingespoten. Beide caviae reageerden geen enkele maal op tuberculine.

Cavia 807 werd van 9 November tot en met 30 Dec. '33 11 keer ingespoten; en reageerde op 8 Januari voor het eerst op tuberculine.

*Melkinrichting E:* Cavia 964 werd van 7 Maart '34 tot 31 Juli '34 35 keer ingespoten met het sediment van 35 monsters. Het dier reageerde geen enkele maal op tuberculine, waarmede overeenstemde de sectie op 17.10.'34.

*Melkinrichting F:* Cavia 26 werd van 26 April '34 tot 18 Augustus '34 35 keer ingespoten. Deze reageerde geen enkele maal op tuberculine. Gedood op 8.11.'34 vertoonde deze dan ook geen tuberculeuse afwijkingen.



Wanneer ik voor de overzichtelijkheid deze bevindingen in een tabel rangschik:

Melkinrichting	Aantal monsters	Aantal caviae t.b.c.	Aantal inspuitingen tot Mantoux +
A	35	0	
B	27	2	14 en 12
C	34	1	7
D	36	1	11
E	35	0	
F	35	0	
Totaal . . .	202	4	

dan blijken dus 4 van de met melksediment ingespoten caviae tuberculeus besmet te zijn; op melkinrichtingen A, E en F komt geen enkele; deze vormen wel een gunstig contrast met B, die in 27 monsters gepasteuriseerde melk minstens 2 had met levende tuberkelbacillen. De twee andere melkinrichtingen leverden beide 1 positieve cavia op resp. 34 en 36 monsters op.

Van de geïnfecteerde caviae heb ik, zooals gezegd, zoodra zij op tuberculine reageerden, een liesklier uitgenomen, en deze na fijnwrijven met zand, en behandeling deels met 5 % zwavelzuur, deels met 4 % natronloog, geënt op den voedingsbodem van LOEWENSTEIN. Het kweken van tuberkelbacillen uit tuberculeuse cavia-klieren is gemakkelijk, en men verkrijgt steeds een rijkelijke cultuur.

Uit de klier van cavia 776 (B) verkreeg ik zichtbare groei na 18 dagen op alle buisjes. De kolonies, die er toen nog glad uitzagen, vertoonden na langduriger groei, en vooral na overenting, het droge aspect, en de bloemkoolvormige groei van humane tuberkelbacillen.

De voedingsbodems beënt met een klier van cavia 861 (B), na behandeling met zwavelzuur, vertoonden na 23 dagen, na behandeling met natronloog, na 31 dagen groei. De groei op de eerste buisjes was rijkelijker dan op de laatste, waarop de kolonies verder uit elkaar stonden, en uitgroeiden tot groote verheven, vrij droge kolonies, met breede basis, die dus ook het humane karakter vertoonden.

Anders staat het met de cultuur uit een klier van cavia 806 (C), die met



het bloote oog zichtbaar was op alle buisjes na 17 dagen. De cultuur had hier het typische uiterlijk van een bovine stam.

Hetzelfde kan gezegd worden van de cultuur uit cavia 807 (D), die op de buisjes na zwavelzuurbehandeling na 13 dagen, op die na natronloog behandeling na 25 dagen zichtbaar was.

Zoodra ik een cultuur in handen had, werd de betreffende cavia afgemaakt en geseceerd; ik kan dienaangaande de volgende gegevens mededeelen:

Cavia 776 (B) sectie 5 weken na positieve MANTOUX. Gegeneraliseerde verkazende tuberculose.

Cavia 861 (B) gedood 1 maand na positieve MANTOUX. Begin van generalisatie.

Cavia 806 (C) gedood 6 weken na positieve MANTOUX. De haarden in de inwendige organen zijn al iets uitgebreider dan bij Cavia 861.

Cavia 807 (D) gedood 6 weken na positieve MANTOUX. Voortgeschreden gegeneraliseerde tuberculose.

De konijnproeven met de verkregen cultuur hebben het volgende opgeleverd:

Konijn 97 werd op 8 Januari '34 met een jonge van den voedingsbodem gewasschen cultuur uit cavia 776 (B) in de rechter achterpoot onderhuids ingespoten. Dit konijn, dat bij het begin van de proef 2220 gram woog, is afgevallen tot 2160 gram op 23 April, toen het gedood werd. Bij sectie vond ik slechts een groot abces op de injectieplaats en enkele kleine hyaline haardjes in de longen. Dit zijn de typische bevindingen bij een konijn, dat door onderhuidsche insputing besmet is met humane tuberkelbacillen.

Konijn 108 werd op 9 April '34 in een oorader ingespoten met  $\frac{1}{100}$  mgr. van de cultuur uit cavia 861 (B). Het konijn werd gedood op 4 Juli '34; het was toen aangekomen van 1850 tot 2200 gram. Bij sectie werden vrij veel hyaline haarden zonder reactieve ontsteking in de longen gevonden. Dit is dus ook een typisch beeld van een konijn, besmet met humane tuberkelbacillen.

Konijn 94 werd op 30 December '33 onderhuids ingespoten met een zeer jonge cultuur, van den voedingsbodem gewasschen, uit Cavia 806 (C), en werd gedood op 26 Maart '34. Dit konijn woog, toen het ingespoten werd, 2640 gram en was dus zwaarder dan de konijnen, die men voor deze proeven pleegt te nemen. Het dier werd na ongeveer 3 maanden afgemaakt, en vertoonde toen, behalve een ulcus op de insputingsplaats, uitgebreide verkazende tuberculose van de longen, benevens verscheidene tuberculeuse haarden in de nieren en enkele in de lever. Dus een typische bevinding voor besmetting met bovine tuberkelbacillen.

Konijn 102 werd op 30 Januari '34 in een oorader ingespoten met  $\frac{1}{100}$  mgr. cultuur uit cavia 807 (D) en stierf op 6 Maart, dus na 5 weken, met uitgebreide tuberculose van longen, milt en nieren. Dus ook weer typisch voor een besmetting met bovine tuberkelbacillen.

Het onderzoek heeft dus, samenvattend, het volgende aangetoond:

Op 202 monsters gepasteuriseerde flesschenmelk hebben er



minstens 4 levende tuberkelbacillen bevat, aangezien 4 der meermalen met melksediment ingespoten caviae tuberculose gekregen hebben. 3 van de 6 melkinrichtingen, waarop dit onderzoek betrekking heeft, hebben gepasteuriseerde melk geleverd met tuberkelbacillen, 2 daarvan minstens 1  $\times$ , en 1 minstens 2  $\times$ . 3 melkinrichtingen daarentegen hadden, in 35 monsters elk, nooit levende tuberkelbacillen.

De uit de besmette caviae gekweekte cultures van tuberkelbacillen vertoonden 2 keer het typisch voorkomen van het bovine type, 2 keer van het humane type.

De beslissende konijnproef toonde aan, dat de beide stammen, die in de kweekproef als humaan herkend werden, ook inderdaad van het humane type waren. In dit geval is hoogstwaarschijnlijk de melk door een tuberculoselijder verontreinigd met tuberkelbacillen (tijdens de behandeling van de melk, of door het aan de mond zetten van een flesch melk, die daarna niet behoorlijk gedesinfecteerd is). Zoo kan de melk pathogene bacteriën herbergen, die niet afkomstig zijn van de koe, in analogie dus met hetgeen bekend is van de typhusbacillen, die door den bacillen-dragenden mensch in de melk gebracht kunnen worden.

Gezien de groote verbreiding van de tuberculose onder het vee in de streek, waar de melkinrichtingen in kwestie gevestigd zijn, mogen wij aannemen, dat de melk vóór de pasteurisatie in een grooter percentage (vgl. de gegevens voor Rotterdam, op blz. 90 vermeld) tuberkelbacillen bevat heeft, en dat de pasteurisatie bij een gedeelte van de onderzochte melkmonsters wel doeltreffend is geweest, zeker althans in de melkinrichtingen A, E en F.

De caviae, die in mijn proeven tuberculeus geworden zijn, zijn dit ongetwijfeld geworden door de tuberkelbacillen uit de melk. Het zou een stoutmoedig fantastische gedachte zijn te onderstellen, dat de melkinspuitingen slechts indirect schuld waren aan de tuberculose, doordat deze bij sommige caviae sluimerend aanwezige tuberkelbacillen of een tuberculeus virus zouden geactiveerd hebben. Hoe onwaarschijnlijk ook een dergelijke veronderstelling mij voorkwam, heb ik toch de moeite



genomen 3 caviae Nos.: 896, 899 en 900 elk om de 3 à 4 dagen van 24 Januari '34 tot en met 16 April '34 ieder 18 keer met 1 cc. gekookte melk onderhuids in te spuiten en ook bij deze dieren regelmatig tuberculinereacties te verrichten. Tot geruststelling zij medegedeeld, dat deze steeds negatief zijn gebleven.

Verder mag ik uit de caviaproeven afleiden, dat het aantal tuberkelbacillen, dat in enkele melkmonsters aanwezig is geweest, niet onbelangrijk is geweest. Immers, wanneer een cavia, gedood 4 tot 6 weken, nadat de tuberculine-reactie voor het eerst positief wordt, uitgebreide afwijkingen heeft, is het zeker, dat de infectiedosis vrij groot geweest is. Het is van beteekenis dit te constateeren, daar voor het tot stand komen en het beloop van een tuberculeuse infectie de quantiteit tuberkelbacillen een groote factor is, waarover aanstonds nog nader.

Vragen wij ons af, of de onderzochte melk beantwoordt aan de eischen, die het *Melkbesluit* van 1929 (gewijzigd in 1929, '30 en '33) stelt: volgens de letter van de wet zou alle melk, die levende tuberkelbacillen bevat, niet in den handel gebracht mogen worden, want het *Melkbesluit* schrijft voor, dat pathogene microörganismen afwezig moeten zijn, en voorts, dat de melk moet verkregen zijn van koeien niet lijdende aan in voornoemd *Melkbesluit* met name genoemde ziekten, o.a. open tuberculose.

Deze bepalingen worden, wat de tuberculose betreft, niet nageleefd. Omtrent gepasteuriseerde melk voor menscheijk gebruik schrijft het *Melkbesluit* voor, dat deze geen kweekbare coli bacillen mag bevatten, dat het aantal micro-organismen minder dan 25.000 per cc. moet zijn en dat in het sediment geen staafvormige organismen in ongewoon groot aantal mogen voorkomen. Het komt mij waarschijnlijk voor, dat deze eischen niet voldoende waarborgen geven, dat geen levende tuberkelbacillen aanwezig zijn, want, zooals ik reeds in het begin vermeld heb, is de afstervings temperatuur van tuberkelbacillen hooger dan van de meeste andere pathogene organismen, die in melk kunnen voorkomen. Gezien de beteekenis van het voorkomen van levende tuberkelbacillen, behoorden de eischen aan gepasteuriseerde melk gesteld, strenger te zijn.

De wetgever laat de melkinrichting vrij in de wijze waarop zij



de melk pasteuriseert. Er zijn verschillende methoden van pasteurisatie, die verschillen o. a. in de duur der verhitting, en de temperatuur waarop de melk wordt verhit. Het is mij niet bekend op welke wijze gepasteuriseerd wordt in de melkinrichtingen A. B. C. D. en E. De melk in de inrichting F. was gepasteuriseerd volgens de methode van STASSANO. Eenig inzicht over de aangewende temperatuur heb ik wel doordat ik met een aantal monsters de STORCHS reactie verricht heb, een peroxydase reactie, die negatief uitvalt in melk, die 1 minuut op  $78-80^{\circ}\text{C}$  of 5 minuten op  $75^{\circ}\text{C}$  verhit is. Ik verrichtte deze reactie met 18 monsters van melkinrichting A, waarin deze steeds negatief was, met 10 monsters van melkinrichting B, waarin deze ook steeds negatief was, met 16 monsters van melkinrichting C, waarin deze  $1 \times$  sterk positief,  $15 \times$  negatief was, met 17 monsters van melkinrichting D, waarin deze  $2 \times$  zwak positief was, en  $15 \times$  negatief, met 17 monsters van melkinrichting E, die alle negatief waren, terwijl alle monsters van melkinrichting F (STASSANO) een positieve reactie gaven.

Het blijkt dus, dat met uitzondering van de inrichting F, waar de STASSANO methode wordt toegepast, in deze melkinrichtingen de melk verhit wordt op temperaturen boven  $75^{\circ}\text{C}$ . In 3 gevallen is echter blijkbaar niet de bedoelde temperatuur bereikt, waaruit de gevolgtrekking te trekken is, dat de pasteurisatie niet steeds met evenveel nauwkeurigheid is geschied. Hieruit blijkt wel, dat een nauwlettend toezicht op de pasteuriseerinrichtingen geboden is.

De gevolgtrekking, die uit het voormelde onderzoek is te trekken, is deze, dat het vertrouwen, ten opzichte van het vrij zijn van ziektekiemen, dat het publiek algemeen aan gepasteuriseerde melk schenkt, niet altijd gerechtvaardigd is.

Nu is hiermede natuurlijk geen vonnis geveld over de pasteurisatie van melk in het algemeen. Het is toch ongetwijfeld mogelijk, zooals door grondig onderzoek van bekende onderzoekers (zooals FORSTER, en zijn leerlingen; BANG; TJADEN, KOSKE en HERTEL; BARTEL en STENSTRÖM; SEELEMANN) is aangetoond, zoowel in laboratorium proeven, als in onderzoekingen in het melk-



bedrijf, de melk zoodanig te pasteuriseeren, dat tuberkelbacillen met zekerheid gedood worden.

Ik pleit dus voor een strengere contrôle op de pasteuriseerinrichtingen en strengere voorschriften in het *Melkbesluit* omtrent gepasteuriseerde melk. Met deze middelen kan men er in slagen de gepasteuriseerde melk betrouwbaarder te maken, zoodat deze zonder voorbehoud door iedereen genuttigd kan worden.

Er is veel voor te zeggen, dat de melkinrichtingen alle melk, dus ook die, welke niet gepasteuriseerd in flesschen verkocht wordt, pasteuriseeren, ook al weer mits de pasteurisatie betrouwbaar is. Ook de melk, die tot karnemelk en tot boterbereiding dient, moet degelijk gepasteuriseerd worden.

Met deze maatregelen worden dan diegenen beschermd tegen besmetting met rundertuberkelbacillen uit melk en melkproducten, die hun melk, karnemelk, enz. betrekken van een melkinrichting. Dat zijn dus voornamelijk de stadsbewoners. Hiermee is dan althans iets bereikt. Al mag het waar zijn, dat de meeste groote-stadsbewoners tegenwoordig al zoover hygiënisch opgevoed zijn, dat zij zelden rauwe melk drinken, zoo zijn er toch nog genoeg uitzonderingen, vooral in de kleine steden. Met deze maatregelen bereikt men echter niet de plattelandsbewoners. Op het platteland wordt nog zeer veel melk rauw gedronken. Daar wordt de melk vaak betrokken direct van den veehouder. Wanneer deze veehouder een kleine veestapel heeft met een aantal koeien met open tuberculose, (vooral de uiertuberculose is het, die aanleiding kan geven tot het verschijnen van groote hoeveelheden tuberkelbacillen in de melk) dan zal de melk, die hij verkoopt, dagelijks levende tuberkelbacillen bevatten. Het aantal tuberkelbacillen kan heel groot zijn, als de melk van de koeien met uier-tuberculose slechts met weinig melk van gezonde koeien gemengd wordt, in tegenstelling met de mengmelk van de melkinrichting, waar de tuberkelbacillen houdende melkportie grooter kans heeft sterk verdund te worden. De klanten van genoemden boer krijgen dus dagelijks in hun melk een groote quantiteit tuberkelbacillen geleverd. Experimenteel is bij dieren gebleken, en hetzelfde



heeft de ervaring bij den mensch geleerd, dat het aantal tuberkelbacillen, dat bij een eerste infectie in het organisme dringt, beslissend is voor het beloop van de tuberculose. Bij gastro-intestinale infectie moet voorts een zekere quantiteit bacillen overschreden worden, wil infectie optreden. Op het platteland, waar de kans op een intensiever besmetting van den mensch met rundertuberkelbacillen grooter is dan in de steden, moeten wij dus meer tuberculose, veroorzaakt door rundertuberkelbacillen, vinden dan in de steden. Mijn onderzoek bij kinderen van de Leidsche Kinderkliniek geeft inderdaad steun aan deze meening.

Het zal zeker moeilijk vallen, de plattelandsbevolking het besef bij te brengen, dat het noodig is de melk te koken, geen rauwe karnemelk te gebruiken en slechts boter te koopen van fabrieken, waar de room of de melk, waaruit de boter bereid wordt, goed gepasteuriseerd wordt. En zoolang dit niet gebeurt, zal de rundertuberkelbacil nog vele slachtoffers vooral onder kinderen eischen. Tenzij men er toe komt, de bestrijding van de tuberculose van het vee krachtig ter hand te nemen. Over de wijze, waarop dit geschieden moet, loopen de meeningen nog uiteen. Ik zie als eenig afdoend middel slechts de volledige uitroeiing van de tuberculose van het vee. Dit lijkt op het eerste gezicht practisch niet te verwezenlijken, tenzij misschien met enorme kosten. Indien men, zooals in vele staten van de Vereenigde Staten van Amerika, alle reactie-dieren afslacht (wat daar beter mogelijk was, dan het hier zou zijn, omdat de veestapel daar niet zoo sterk doorgeziekt was met tuberculose), dan zou men, evenals daar, zij het dan inderdaad met het offer van enorme geldsommen, zijn doel bereiken. Op deze wijze zou men dan den mensch gevrijwaard hebben tegen besmetting met rundertuberkelbacillen.

Echter hebben onze boeren in Friesland wel bewezen, dat het mogelijk is, de tuberculose onder het vee uit te roeien, ook zonder hooge kosten. In Friesland, waar, met het oog op de export van het Friesche vee, dat het buitenland weigert, indien de beesten op tuberculine reageeren, het tot verdwijnen brengen van de tuberculose van het vee dus in het eigenbelang was van



de veehouders, is het in tal van bedrijven mogelijk gebleken de tuberculose geheel tot verdwijnen te brengen.

Ook in Schotland, waar de tuberculose onder het vee zeker niet minder voorkomt dan in ons land, heeft men een proef genomen in een beperkt gebied, hoever men kwam met eenvoudige maatregelen <sup>1)</sup>. In 3 jaar tijds is het daar gelukt in dat gebied zonder noemenswaardige onkosten het meerendeel van de vee-bedrijven tuberculose-vrij te krijgen.

Wat tot nu toe in Nederland buiten Friesland door het particulier initiatief in deze richting gedaan wordt, is nog bedroevend weinig. De oorzaak ligt wel hierin, dat de veehouder geen voordeel in krachtige tuberculose-bestrijding ziet.

Slechts als de boer direct geldelijk belang ziet in de tuberculose-bestrijding (zooals in Friesland het geval is) zal hij daartoe te krijgen zijn. Het is gebleken, dat zonder meer de boeren niet te bewegen zijn tot een krachtige tuberculosebestrijding. Wil men dus de tuberculose van het vee met succes bestrijden, zal men dit zoo moeten organiseren, dat de boer, wiens veestapel vrij is van tuberculose, daarvan duidelijk geldelijk voordeel geniet.

Het belang voor de volksgezondheid van een krachtige bestrijding der tuberculose van het vee is te groot om deze te verwaarloozen.

### SAMENVATTING.

Het onderzoek naar het voorkomen van levende tuberkelbacillen in gepasteuriseerde flesschenmelk werd verricht door middel van de caviaproef. Caviae werden gemiddeld om de 4 dagen ingespoten met sediment van  $\pm 70$  cc. melk van eenzelfde melkinrichting, totdat zij op tuberculine reageerden. Uit geïnfecteerde caviae werden de tuberkelbacillen gekweekt, teneinde het type te bepalen uit de cultuureigenschappen en de virulentie voor konijnen. Melk van 6 melkinrichtingen werd op deze wijze onderzocht. Van iedere melkinrichting zijn 27

<sup>1)</sup> Medical Research Council. Special Report No. 184, 1933.

L. JORDAN. The eradication of bovine tuberculosis.



tot 36 monsters onderzocht. Drie melkinrichtingen bleken in 35 monsters geen levende tuberkelbacillen te bevatten; 3 andere melkinrichtingen wel. De tuberculose van de caviae openbaarde zich na 7 tot 14 inspuitingen. De cultures uit 4 caviae verkregen, waren in 2 gevallen van het bovine type, in de 2 andere gevallen, beide van dezelfde melkinrichting, van het humane type. Op grond van deze bevindingen pleit schrijven voor strengere voorschriften betreffende gepasteuriseerde melk in het Melkbesluit en betere controle van de melkinrichtingen. Door betere pasteurisatie is echter het gevaar van besmetting met rundertuberkelbacillen voor den mensch slechts zeer gedeeltelijk bestreden. Het eenige afdoende middel is uitroeijing van de tuberculose van het vee, welke niet meer als een onbereikbaar ideaal beschouwd moet worden

#### ZUSAMMENFASSUNG.

Untersucht wurde pasteurisierte Flaschenmilch von 6 Milchwirtschaften auf Anwesenheit lebender Tuberkelbazillen. Aus Ersparnisrücksichten erhielt je ein Meerschweinchen alle 4 Tage Milchsediment eingespritzt, bis es tuberkulinempfindlich wurde. Auf diese Weise wurden von jeder Milchwirtschaft 27 bis 36 Milchproben untersucht. Drei Milchwirtschaften hatten nie lebende Tuberkelbazillen in je 35 Proben, die 3 anderen dagegen wohl, 2 in mindestens einer Probe, 1 in mindestens 2 Proben. Von den aus den Meerschweinchen gezüchteten Tuberkelbazillen erweisen sich zwei Kulturen als von bovinem Typus (Kaninchenvirulenz) und die anderen zwei, beide aus Milch derselben Milchwirtschaft stammend, als von humanem Typus.

Strengere Vorschriften und Kontrollmassnahmen werden als notwendig erachtet, um solchen Vorkommnissen vorzubeugen. Um überhaupt die Gefahr der Milchinfektion mit Tuberkelbazillen zu beseitigen, ist vollständige Ausrottung der Viehtuberculose notwendig, welche Ausrottung heute nicht mehr als ein unerreichbares Ideal angesehen werden muss.



## SYNOPSIS.

The author has done some research-work regarding the incidence of living tubercle-bacilli in bottled pasteurized milk. From 27 to 36 samples of milk coming from 6 dairies were examined. Every 4 days a guinea-pig was injected with the sediment of a sample from the same dairy, till eventually it became hypersensitive to tuberculin. Next another guineapig was injected in the same way. Three guinea-pigs, each injected with the sediments of 35 samples from one dairy, never showed any symptom of tuberculous infection. Of the guinea-pigs injected with milk-sediments from the other three dairies, 4 became tuberculous after from 7 to 14 injections. The cultivated tubercle-bacilli, isolated from the guinea-pigs, were in two cases of the bovine type, but in the two other cases, both from one and the same dairy, of the human type, as was tested on rabbits. The author concludes that pasteurization of milk is not always executed with sufficient accuracy. Infection of men by tubercle-bacilli of bovine origin can be but partly prevented by efficient pasteurization; but, as a rule, prevention is only possible by eradication of bovine tuberculosis, which by no means must be considered a utopia.

## RÉSUMÉ.

Le lait pasteurisé vendu en bouteille pour la consommation humaine, contient-il des bacilles tuberculeux vivants? Des recherches sur ce sujet ont démontré que le lait de 3 sur 6 laiteries en contient quelquefois. Les cobayes furent injectés tous les quatre jours avec le sédiment de environ 70 cc. de lait jusqu'à l'apparition éventuelle d'une allergie tuberculinique, après quoi les bacilles tuberculeux furent isolés du cobaye par culture. Des 4 cultures ainsi obtenues deux se sont manifestées comme virulentes pour le lapin, tandis que les deux autres, toutes les deux cultivées de cobayes injectés avec le lait d'une même laiterie, étaient avirulentes pour le lapin; par conséquent elles étaient du type humain. Probablement le lait avait été



contaminé par un cracheur de bacilles. La pasteurisation du lait n' a pas été faite avec assez d' exactitude. Selon l' opinion de l' auteur, les prescriptions légales concernant la pasteurisation du lait ne sont pas assez rigoureuses et le contrôle des appareils est insuffisant. La pasteurisation d' une certaine partie de la quantité totale ne fera jamais disparaître la tuberculose humaine d' origine bovine. Nulle mesure, hors l' extermination totale de la tuberculose bovine n' est efficace. Il ne faut plus considérer l' extermination de la tuberculose bovine comme une utopie.

---



# ONDERZOEK NAAR HET VOORKOMEN VAN LEVENDE TUBERKELBACILLEN IN BOTER

DOOR

Dr. H. D. BOER, Arts

---

Naar aanleiding van de vondst van levende tuberkelbacillen in gepasteuriseerde flesschenmelk (zie vorig artikel), heb ik hierbij aangesloten een onderzoek van boter. De meeste boter, die hier in den handel komt, is afkomstig van zuivelfabrieken, die de boter bereiden uit room. Deze room wordt vooraf gepasteuriseerd op een temperatuur van 80° en hooger, teneinde zich anders soms ontwikkelende ongewenschte microörganismen te dooden. Het verzuren van de room geschiedt daarna door het toevoegen van een zuiver gehouden kweek van, voor het doel geschikte, microörganismen. Waar hier deugdelijke pasteurisatie van belang is voor het verkrijgen van een goed product, mag men *à priori* verwachten, dat deze in het algemeen wel nauwkeurig zal geschieden, zoodat de kans op het aantreffen van tuberkelbacillen in goede kwaliteit boter zeldzaam zal zijn.

Ik heb onderzocht monsters verpakte boter van 3 verschillende firma's, en daarnaast van 3 firma's onverpakte boter.

In een waterbad van 45° werd  $\pm$  50 cc. boter in een centrifugebuis gesmolten en daarna gecentrifugeerd; dan werd het gesmolten vet afgeschonken, en werd 1  $\times$  uitgewasschen met steriel aqua dest. Van het sediment en van de eventueel aanwezige scheidingslaag werd 1 à 2 cc. bij een cavia ingespoten, onderhuids in de dij. Deze insputingen geven nogal eens aanleiding tot het optreden van een phlegmone, waaraan eenige dieren ten gronde gaan. Van de gestorven dieren zijn meestal weer passages verricht op nieuwe dieren, na behandeling van stukjes organen met zwavelzuur.



*Verpakte boter Firma I. Cavia 950* is van 22 Febr. '34 tot 9 April '34 ingespoten. † 12 April zonder tbc.-afwijkingen. Passage op *cavia 19* die van 13 April '34 tot 1 Mei '34 is ingespoten, en daarna nog 1 keer op 23 Mei. Tusschen 7 Mei en 26 Juni is verder *cavia 28* eenige malen ingespoten. *Cavia 19* is gedood op 17 Sept.; vertoonde geen tuberculeuse afwijkingen. *Cavia 28* is gedood op 24-9-'34, evenmin tbc.-afwijkingen vertoonend. MANTOUX reacties van alle caviae waren steeds negatief. De dieren kregen tesamen 18 inspuitingen.

*Verpakte boter Firma II. Cavia 952 en 987* zijn afwisselend ingespoten van 23 Febr. '34 tot 28 Juni '34. Beide caviae, die nimmer op tuberculine reageeren, zijn afgemaakt op 17 Sept. '34 zonder tuberculeuse afwijkingen te vertoonen. De dieren hadden tezamen 20 inspuitingen gehad.

*Verpakte boter Firma III. Cavia 979* werd ingespoten van 8 Maart tot 12 April '34 † 14 April '34. Passage op *Cavia 21* die tot 30 Mei werd ingespoten, en stierf op 4 Juni. *Cavia 46* die op 6 Juni werd ingespoten, stierf reeds den 10den Juni, en is niet geseceerd. *Cavia 49* is vervolgens nog ingespoten van 11 tot 27 Juni. Gedood op 10 Oct. vertoonde deze bij sectie evenmin als de vorige caviae tuberculeuse afwijkingen. Geen der dieren reageerde ooit op tuberculine. In totaal zijn bij deze dieren 17 inspuitingen verricht.

*Onverpakte boter Firma IV. Cavia 949* is van 19 Febr. tot 5 April 7 keer ingespoten. Op 5 April was de reactie van MANTOUX +?, en 11 April +. Dienzelfden dag is een klier verwijderd waaruit een tuberkelbacillenstam gekweekt is, waarmee op 4 Mei *Konijn 116* werd ingespoten:  $\frac{1}{100}$  m.gr. intraveneus. Het dier stierf reeds op 31 Mei, vermagerd, met uitgebreide tuberculose van longen, milt en nieren.

*Onverpakte boter Firma V. Cavia 17* is éénmaal ingespoten op 19 April. Op 30 April was de tuberculine reactie twijfelachtig positief, en daarom werd op 2 Mei een vergroote liesklier verwijderd, waarin noch met het microscoop noch met kweekproef, tuberkelbacillen werden aangetoond. Toen het dier op 7 Juni gedood werd, had het dan ook geen tuberculeuse afwijkingen. Daarna is van 2 Mei tot 13 Juni *Cavia 27* nog 8 keer ingespoten. Deze vertoonde nooit positieve tuberculinereacties en had bij sectie op 24 Sept. geen afwijkingen.

*Onverpakte boter Firma VI. Cavia 70* is van 19 Juni tot 11 Sept. 17 keer ingespoten. Deze heeft tot nu tot geen positieve tuberculinereactie vertoond.

Zoo is dus de uitslag, dat verpakte boter van 3 firma's, waarvan, 16 tot 20 monsters elk, onderzocht werden, geen levende tuberkelbacillen bevatten; van onverpakte boter van 3 firma's bevatten monsters van 1 firma (IV) wel levende tuberkelbacillen, die bij de cavia aan te toonen waren na 7 inspuitingen, terwijl de beide andere boters in resp. 9 en 17 monsters geen aantoonbare levende tuberkelbacillen bevatten.

Dus blijken er ook in boter levende tuberkelbacillen wel eens



voor te komen. In verpakte boter is de kans daarop waarschijnlijk geringer dan in onverpakte.

### SAMENVATTING

Onderzocht werden monsters verpakte boter van 3 firma's en onverpakte boter ook van 3 firma's betrokken, op de aanwezigheid van levende tuberkelbacillen door middel van de caviaproef. Slechts de onverpakte boter van één der firma's bleek levende tuberkelbacillen van het bovine type te bevatten.

### RÉSUMÉ

Les recherches mentionnées ci-dessus ont démontré que le beurre, vendu en paquets fermés et obtenu de trois magasins, ne contenait pas de bacilles tuberculeux vivants. Les échantillons du beurre, emballé en tonneaux, d'un magasin, contenaient des bacilles tuberculeux vivants du type bovin, ceux de deux autres magasins n'en contenaient pas.

### SYNOPSIS

Butter was examined for the presence of living tubercle-bacilli. In the samples of butter sold in packets obtained from three shops, no such bacilli were found. In the unpacked samples of butter obtained from three other shops, living tubercle-bacilli of the bovine type were demonstrated in the samples from one shop.

### ZUSAMMENFASSUNG

Untersucht wurde das Vorkommen lebender Tuberkelbazillen in Butter. In der in Pappschachteln verkauften Butter aus 3 verschiedenen Läden wurden keine lebende Tuberkelbazillen angetroffen; dagegen wurden in der in Läden ausgewogener Butter einer Firma lebende Tuberkelbazillen vom Typus bovinus gefunden, nicht aber in der Butter zweier anderen Firmen.

---



# ACTIVEERING VAN DEN FILTREERBAREN VORM VAN DEN TUBERKELBACIL DOOR ACETONEXTRACT VAN TUBERKELBACILLEN

DOOR

Dr. H. D. BOER

---

## I.

De onderzoekingen over den filtreerbaren vorm van den tuberkelbacil in het Institut PASTEUR te Parijs traden in een nieuwe phase, toen VALTIS en VAN DEINSE in het acetonextract van tuberkelbacillen een middel ontdekten, waarmee in de dierproef deze filtreerbare vorm geactiveerd kon worden. Deze onderzoekers slaagden er in uit caviae, ingespoten met filtraat, na een reeks inspuitingen met het acetonextract, tuberkelbacillen te kweken, en bovendien, wanneer de behandeling lang genoeg werd voortgezet, en eventueel eenige passages verricht werden, tuberculose bij de proefdieren te verwekken.

Geheel afgezien van de gevolgtrekkingen, die sommigen ten aanzien van het bestaan van een levenscyclus met filtrabel stadium van den tuberkelbacil, uit de filtraat-onderzoekingen meenen te mogen trekken, zijn deze proeven van het allergrootste belang, mits zij van verschillende zijden bevestigd worden. Dit is echter tot nu toe nog niet het geval, en daarom meen ik goed te doen hier mededeeling te doen van eenige onderzoekingen met positief resultaat.

Reeds in 1932 en begin 1933 had ik een onderzoek verricht over kaarsfiltraten van Vallée-cultures. Ik filtreerde jonge op Sauton gegroeide door Chamberland L II kaarsen, onder negatieve druk van hoogstens 25 c.M. Hg. (techniek overeenkomstig de voorschriften van NINNI<sup>1)</sup>). In 3 proefreeksen

---

<sup>1)</sup> Annales PASTEUR 46. 1931. 598.



spoot ik in totaal 12 caviae onderhuids in met 8 tot 15 cc. filtraat. Bij geen van deze dieren heeft zich tuberculose ontwikkeld, evenmin bij passagedieren, na observatieduur van 7 tot 9 maanden. Het gelukte mij niet bij enkele proefdieren, die ik na één tot twee weken afmaakte, zuurvaste staafjes in de organen aan te treffen. Inspuitingen met acetonextract (aan de bereiding waaraan echter nogal wat haperde) bleven zonder resultaat. Het negatieve resultaat van deze proeven ontslaat mij van den plicht deze proeven uitvoerig te vermelden.

In het najaar van 1933 ben ik een tweede onderzoek begonnen. Ik vond hiertoe aanleiding toen collega R. STROOP in het Instituut voor Praeventieve Geneeskunde te Leiden gast-vrijheid vroeg voor een aantal caviae, die hij te Parijs bij VAN DEINSE met filtraat had ingespoten. Ik besloot toen, terwille van een goede vergelijking van beide proefreeksen, in de eerste plaats dezelfde stam te gebruiken, als STROOP voor zijn onderzoek gebruikt had.

De stam „Gijsman” dankt zijn ontstaan aan een patiënt van de Leidsche Kinderkliniek. Bedoelde patiënt, geb. 8-6-1922, werd opgenomen op 29-12-1930 wegens verdenking op tuberculose (kliniek 1930—'31. 546.). De jongen hoestte wat het laatste jaar en was vermagerd; hij klaagde ook veel over moeheid. De anamnese leverde niet veel bijzonders op. Tuberculose kwam waarschijnlijk niet in het gezin voor; contact met tuberculoselidrs buiten het gezin was niet bekend. Ook bij het onderzoek werden geen duidelijke verschijnselen, die op tuberculose wezen, gevonden. In de borstkas werden, ook Röntgenologisch geen afwijkingen gevonden. De reactie van PIRQUET was negatief, het bloedbeeld normaal. De temperatuur was 's avonds verhoogd tot 37.7. Als eenige afwijking werden gedissemineerde choreoretinitische haarden in fundo oculi waargenomen, waarvan de oorzaak onbekend bleef (bloed WASSERMANN negatief). Tot mijn verbazing vond ik in buisjes BESREDKA-vloeistof, die ik beënt had met bloed, talrijke microkolonies van zuurvaste staafjes, terwijl op de LOEWENSTEIN-voedingsbodems niets gevonden werd. Deze zuurvaste staafjes waren niet voort te kweeken, en waren avirulent voor caviae. De patiënt, die



intusschen na 14 dagen uit de kliniek was ontslagen, keerde ruim 2 maanden daarna op 20 Maart 1931 op de polikliniek terug met een scrophuloderma op een handrug. Deze is genezen met achterblijven van een lidteeken. Andere tuberculeuse aandoeningen hebben zich bij dezen knaap nooit voorgedaan. Ik ben namelijk in de gelegenheid geweest hem te blijven volgen. Herhaalde malen heb ik zijn gevoeligheid voor verschillende tuberculines nagegaan, steeds met negatieve uitslag van de reacties, o. a. na intracutane inspuiting van 1 op 100 verdunde tuberculine. Toen het mij in 1931 nog 2 keer gelukte in met zijn bloed beënte BESREDKA-vloeistof, microkolonies van zuurvaste staafjes aan te toonen, heb ik op 14 Juni 1931 bij hem een reactie gedaan met gesteriliseerd filtraat van tuberkelbacillen (mij welwillend toegezonden door VAN DEINSE) waarvan  $\frac{1}{10}$  cc. intracutaan op de onderarm werd ingespoten. Hij reageerde hierop met een flinke reactie, in den vorm van een hyperaemische en geïnfiltreerde plek van 20 bij 35 m.M., die het intensiefst was na 24 uur en in de loop van een week gaandeweg verbleekte. (Zie photo). Na overleg met VAN DEINSE heb ik hem toen nuchtere maaginhoud van dezen patiënt gezonden, nadat ik zelf reeds eenige malen geconstateerd had, dat in de maaginhoud geen virulente tuberkelbacillen voorkwamen. VAN DEINSE is er in geslaagd met behulp van aceton-extract inspuitingen uit een cavia een stam tuberkelbacillen te kweken, die verschillende eigenaardigheden, eigen aan „filtraat-stammen” vertoont. De stam, die STOOP en ik bij ons onderzoek gebruikten, was de R variant, virulent voor cavia en konijn.

Daarnaast heb ik een tweede stam voor de proeven gebezigd, n.l. „Chrétien”. „Chrétien”<sup>1)</sup> is een stam te Parijs geïsoleerd uit een cavia, ingespoten met microcultures in BESREDKA vloeistof, welke verkregen waren door enting van bloed van een kind lijdend aan een endocarditis rheumatica. De R variant van deze stam, die evenals „Gijsman” R volkomen in groei het uiterlijk van een humane stam heeft, werd in mijn proeven

---

<sup>1)</sup> J. VALTIS, G. PAISSEAN en F. VAN DEINSE. C. R. Soc. de Biol. 112. 1933. 742.







gebruikt, omdat deze stam vele filtrable elementen zou bevatten.

Voor mijn proeven heb ik cultuurfiltraten en filtraten van cavia-organen gebruikt.

Voor de cultuurfiltraten ben ik uitgegaan van hoogstens 1 week oude vliezen op Sauton, die na afzuigen van de cultuur-vloeistof in steriel physiologisch water ( $\pm 10$  cc. per kolf van 250 cc.) gesuspendeerd werden door schudden met glasparels. De suspensie werd na filtratie door papier Chardin, snel gefiltreerd door Chamberland-kaarsen L I en daarna met negatieve druk van hoogstens 25 c.M. Hg. door L II (grootendeels nieuwe kaarsen, groot model, filtratie van buiten naar binnen). De techniek en apparatuur waren gelijk aan die van het Institut Pasteur, zooals STOOPE deze bij ons introduceerde. (Het voornaamste verschil met de vroegere werkwijze is, dat de suspensies van cultures of organen niet vóór de filtratie eenige dagen in de ijskast bewaard worden).

Het orgaanfiltraat werd bereid door in een mortier de organen met veel zand en wat physiologisch water tot gelijkmatige brij te wrijven, die daarna met  $\pm 100$  cc. physiologisch water aangelengd werd. Het zand en de grove weefselpartikels werden door kort centrifugeeren verwijderd, en de bovenstaande vloeistof op dezelfde wijze behandeld, als zoojuist voor de cultuurfiltraten beschreven.

De aldus verkregen filtraten spoot ik bij de caviae in de buikholte. Ongeveer de helft van de dieren werden 2 keer per week ingespoten met acetoneextract, dat VAN DEINSE zoo welwillend was mij geregeld toe te zenden. De proeven hebben het volgende beloop gehad:

Op 14-1-'34 werden van een cavia, die 12 dagen te voren onderhuids met  $\frac{1}{2}$  mgr. Chrétiencultuur was ingespoten, de lever en milt, die met het bloote oog geen tuberculeuse afwijkingen vertoonden, uitgenomen. Met het filtraat van deze organen werden 4 caviae intraperitoneaal ingespoten, en wel 878 en 879 met 10 cc. en 880 en 881 met  $7\frac{1}{2}$  cc. De beide eerste dieren werden 2  $\times$  per week de geheele duur van de proef met acetoneextract ingespoten. Minstens 1 keer per maand deed ik een MANTOUX reactie met 1 op 10 verdunde tuberculine bij alle dieren. Terwijl de controledieren tot heden nooit op tuberculine gereageerd hebben, was de tuberculine-reactie bij de acetoneextract-dieren op 15 April, dus bijna 3 maanden na het begin van de proef voor het eerst positief. Voordien had ik op 16-3-'34 bij 878



uit de rechter lies, waar het dier met acetonextract werd ingespoten, een abcesje en een iets vergroote lymphklier verwijderd. In de etter vond ik veel zuurvaste substantie, blijkbaar afkomstig van het ingespoten acetonextract, en enkele zuurvaste staafjes. Klier en etter werden na  $H_2SO_4$ -behandeling op LOEWENSTEIN-buisjes geënt, met negatief resultaat. Het acetonextract werd daarna bij cavia 878 verder in de linker lies ingespoten. Op 18-7-'34 is het dier afgemaakt. De linker liesklieren bleken sterk vergroot te zijn, waarin, evenals in de vergroote linker ileale klier ook verkaasde tuberculeuse haardjes gevonden werden. De milt was weinig vergroot, met enkele boven het oppervlak uitpuilende haardjes.

In een uitstrijk-preparaat van de milt waren eenige zuurvaste staafjes te vinden. Verder was de subhepatische klier vergroot. Dit dier had dus tuberculose, uitgegaan van de linker lies, bezig zich te generaliseeren. Ook cavia 879 kreeg tuberculose, waaraan het dier stierf op 13-9-'34. Ik moet er op wijzen, dat ik in deze proef caviae 878 en 879 beide telkens met dezelfde naald het acetonextract inspoot, voor iedere groep gebruikte ik één naald. Het feit, dat in deze en de andere proeven beide met acetonextract behandelde proefdieren gelijkelijk reageeren, behoeft dus niet daaraan te liggen dat bij beide dieren de filtreerbare elementen geactiveerd zijn, dit kan ook bij slechts één van beiden het geval geweest zijn, terwijl de naald bewerkt kan hebben, dat kiemen van de eene cavia op de andere zijn overgebracht. Het ware beter geweest, voor ieder dier een aparte naald te gebruiken, doch aan de beteekenis van deze proeven verandert dit niets.

Van beide caviae 878 en 879 entte ik op LOEWENSTEIN voedingsbodemp, wat een rijke cultuur van droge wasachtige kolonies opleverde. De bacillen waren, in de hoeveelheid van  $\frac{1}{10}$  mgr. intraveneus ingespoten, sterk pathogeen voor een konijn No. 137, dat op 25-8-'34 ingespoten precies een maand later stierf met zeer talrijke kleine grijze haardjes in longen en lever, met collaterale ontsteking, verder enkele haardjes in de weinig vergroote milt en talrijke kleine haardjes in de nieren.

Het contrôledier 881 is gedood op 19-7-'34. Dit dier had geen enkele afwijking. Een suspensie van milt en lymphklieren werden ingespoten bij cavia 85, die tot nu toe evenmin als het andere contrôledier op tuberculine reageert.

### *Samenvatting.*

Een filtraat van lever en milt van een cavia, die 12 dagen te voren met tuberkelbacillen van een cultuur „Chrétien” onderhuids is ingespoten, veroorzaakt bij geen van de beide contrôle caviae, die met  $7\frac{1}{2}$  cc. in de buikholte worden ingespoten, tuberculose, terwijl de beide dieren, die met 10 cc. in de buikholte zijn ingespoten, en daarna regelmatig met acetonextract zijn behandeld, typische tuberculose krijgen. Uit hunne organen wordt een wasachtige cultuur van tuberkelbacillen verkregen, welke virulent zijn voor konijnen.



Op 19-2-'34 filtreerde ik cultuurvliezen van dezelfde „Chrétien”-stam afkomstig en spoot cavia 946 en 947 met 6 cc intraperitoneaal in. De eerste werd behandeld met acetoneextract. Reeds na ruim 6 weken op 5-4-'34 reageerde 946 met een flinke reactie op een intracutane tuberculine-inspuiting; 947 was en bleef ongevoelig voor tuberculine. Dit laatste dier werd afgemaakt op 12-6-'34, dus bijna 4 maanden na de inspuiting; het had geen tuberculeuse afwijkingen. Passage werd verricht op cavia 50, die tot heden niet op tuberculine reageert. Bij cavia 946 heb ik op 4-4-'34 de als gevolg van de acetoneextract inspuitingen iets vergroote rechter liesklieren verwijderd, die geënt werden op LOEWENSTEIN voedingsbodem, welke steriel bleven. In de linker lies, waar sindsdien het acetoneextract ingespoten werd, zwollen de lymfklieren snel tot een veel grooter klierpakket, dan zich rechts eerst had gevormd. Het klierpakket verwijderde ik op 7-5-'34 in zijn geheel: De klieren waren week, met elkaar vergroeid, daar tusschen enkele abcesjes, waarin ik weer veel zuurvaste substantie aantrof, van fijn gruis tot grove brokken. Een gedeelte van deze klieren werd ingespoten bij cavia 29 in de rechter lies, die eveneens met acetoneextract werd behandeld, het andere gedeelte entte ik op LÖWENSTEIN voedingsbodem. Cavia 946 is evenals cavia 29 gestorven aan gegeneraliseerde tuberculose, resp. op 10-8-'34 en 22-7-'34.

De kweekproef van 7-5-'34 leverde een klein aantal kolonies na 5 weken. De kolonies waren wit, tamelijk glad, gemakkelijk in hun geheel van de voedingsbodem te lichten. De subculturus hadden het wasachtige karakter eigen aan humane tuberkelbacillen. Eenige malen echter, zoowel op aardappel als op LOEWENSTEIN voedingsbodem, trof ik cultures aan, die, als zij volgroeid waren, aan de oppervlakte het typische weeke, gladde, ietwat slijmige karakter hadden van een aviaire cultuur. Het was dus of deze stam een dubbel karakter had, van zoowel R als S. Het was niet mogelijk de stam te dissocieeren in 2 typen kolonies.

Met deze stam heb ik op 28-6-'34 ingespoten konijn 131  $\frac{1}{10}$  mgr. intraveneus, cavia 76  $\frac{1}{10}$  mgr. onderhuids, en haan 3, 2 mgr. intraveneus. Konijn 131 stierf op 30-7-'34, dus na ruim 1 maand, sterk vermagerd, met talloze verkaasde haardjes in de longen, talrijke kleine haardjes in de vergroote milt, iets minder talrijke in de lever, en enkele haarden in de nieren. Cavia 76 stierf bijna 2 maanden na de inspuiting op 23-8-'34 aan gegeneraliseerde, sterk verkazende tuberculose. Haan 3 werd gedood op 27-9-'34 3 mnd. na de inspuiting. Het dier was in uitstekende voedings-toestand. Als eenige afwijking vond ik enkele kleine haardjes in de lever, waarin weinig bacillen te vinden waren.

Zoowel uit cavia 29 als uit konijn 131 heb ik teruggekweekt. Steeds weer verkreeg ik cultures van overwegend R-karakter, met nu en dan kolonies, die naderde tot het S-type. Microscopisch waren de bacillen met S- en R-karakter ook niet met zekerheid te onderscheiden; beide waren overwegend korte bacillen, meer of minder gegranuleerd, met vele in het ZIEHL NEELSEN-preparaat donker gekleurde korrels.



*Samenvatting.*

Met 6 cc. van een cultuurfiltraat Chrétien worden 2 caviae in de buikholte ingespoten. Terwijl het ééne niet behandelde dier en het passagedier nooit op tuberculine reageeren, ontwikkelt zich bij het met acetonextract behandelde dier, en een passagedier tuberculose. De uit deze dieren gekweekte stam is wasachtig, virulent voor konijnen; de subcultures krijgen aan de oppervlakte het karakter van een weeke cultuur.

Op 29-2-'34 bereidde ik ten tweede male een filtraat van CHRÉTIEN-cultures, waarvan bij cavia 954, 955 en 957 ieder 9 cc. en bij 956 7 cc. in de buikholte werd gespoten. 954 en 956 werden bestemd voor acetonextract-inspuitingen.

Deze proef heeft tot heden een negatief resultaat opgeleverd. Bij cavia 956 werd op 6-4-'34 en bij cavia 954 op 16-4-'34 een wat vergroote liesklier verwijderd, waarmee een kweekproef gedaan werd, die negatief uitviel. Zoowel de met acetonextract behandelde dieren, als de contrôledieren hebben tot heden niet op tuberculine gereageerd. Cavia 955 is op 17-5-'34 gestorven zonder tuberculeuse afwijkingen. Carvia 954, 956 en 957 zijn gedood op 18-10-'34, allen zonder tuberculeuse afwijkingen te vertoonen.

*Samenvatting.*

Filtraat van „Chrétien”-cultuur wordt bij 4 caviae in de buikholte gespoten, in een hoeveelheid van 7 en 9 cc. Noch de beide met acetonextract behandelde dieren, noch de beide contrôledieren krijgen ondanks dat de proef bijna 8 mnd. is voortgezet, tuberculose.

De volgende proefreeks betrof een cultuurfiltraat GIJSMAN. Op 27-2-'34 spoot ik 4 caviae, n.l. 958, 959, 960 en 961 10 cc. hiervan in de buikholte. De beide eerste dieren waren weer de dieren, die met acetonextract werden behandeld. Deze reageerden voor het eerst op tuberculine na 4 resp. 5 mnd. Kweekproeven met liesklieren op 6-4-'34 en 1-5-'34 van beide dieren waren negatief. Als gevolg van de acetonextract-inspuitingen in de linker lies sinds 6-4-'34 ontwikkelt zich daar bij 958 een abcesje, in de etter waarvan ik talrijke zuurvaste, sterk gegranuleerde staafjes vond, lange en korte, ten deele meerdere bijeen, die vaak in korte ketens lagen. Zoowel uit deze etter, als uit een tamelijk vergroote liesklier, kweekte ik zonder moeite een rijkelijke cultuur met uitgesproken droog, wasachtig karakter.

Cavia 958 en 959 zijn beide resp. op 26-7-'34 en 25-9-'34 gestorven aan gegeneraliseerde tuberculose, uitgegaan van de linker lies.

De uit cavia 958 gewonnen t.b.c.-stam was in de dosis van  $\frac{1}{10}$  mgr. intraveneus sterk pathogeen voor een konijn. Konijn 136 op 21-8-'34 in-



gespoten stierf op 12-9-'34, met multiple kleine haardjes in longen, lever, milt en nieren.

Cavia 960 en 961 zijn beide nog in leven, en reageeren niet op tuberculine.

### *Samenvatting.*

In deze proefreeks ontwikkelt zich weer bij de beide dieren, die behalve 10 cc. cultuurfiltraat Gijsman regelmatig acetone-extract-inspuitingen krijgen, tuberculose, terwijl de niet verder behandelde dieren gezond blijven. De gekweekte bacillen wijken niet af van die welke voor de proef gebezigd zijn.

*Samenvattend* hebben dus 1 proef met een orgaanfiltraat van een met „Chrétien” besmette cavia, en 1 proef met cultuurfiltraat van „Chrétien”, en een proef met cultuurfiltraat van „Gijsman” een positief resultaat opgeleverd, waartegen één proefreeks met filtraten van „Chrétien”-cultuur een volkomen negatieve uitslag heeft gegeven. Terwijl alle contrôledieren, die met filtraat zijn ingespoten, evenals passagedieren van deze contrôledieren, nooit tuberculeuse afwijkingen vertoond hebben, en ook nooit op tuberculine gereageerd hebben, heeft zich in de positieve proefreeksen bij alle dieren, die behalve met filtraat regelmatig met acetone-extract zijn ingespoten, tuberculose ontwikkeld, die zich reeds aankondigt in gevoeligheid voor tuberculine,  $6\frac{1}{2}$  week tot 5 maanden na de filtraatinspuiting.

De uit de tuberculeuse caviae gekweekte tuberkelbacillen groeien in droge, wasachtige cultuur, behalve één stam geïsoleerd uit een „Chrétien” cultuurfiltraat-cavia, die eenige neiging vertoont in een weeken, vochtigen vorm te groeien.

Overigens gelijken de stammen geheel op de oorspronkelijke stammen, waarvan ik was uitgegaan, ook wat betreft de virulentie voor konijnen.

### CONCLUSIE.

In kaarsfiltraten van tuberkelbacillen-cultures, en organen van tuberculeuse caviae, kunnen zich elementen bevinden, die ingespoten bij caviae, geen tuberculose verwekken, tenzij de



proefdieren regelmatig met acetonextract van tuberkelbacillen worden ingespoten. Materiaal, dat een negatieve caviaproef levert, kan desniettemin een tuberculeuse smetstof bevatten.

### RÉSUMÉ.

Dans les expériences décrites ci-dessus des filtrats de cultures de bacilles tuberculeux et d'organes de cobayes tuberculeux injectés en grande quantité dans le péritoine de cobayes ne tuberculisent pas les animaux. Dans trois des quatre séries d'expériences les injections d'extrait acétonique de bacilles de Koch ont activé les éléments filtrables jusqu' à la production d'une tuberculose généralisée.

### SYNOPSIS.

Filtrates of cultivated tubercle-bacilli and organs of guinea-pigs infected with tuberculosis became active by reiterated injections of an acetic extract of tubercle-bacilli, in 3 out of 4 experiments, in which the filtrate was injected into the peritoneal cavity of guinea-pigs.

### ZUSAMMENFASSUNG.

In 3 von 4 Versuchsreihen, in welchen Meerschweinchen mit grossen Mengen Filtrat von Tuberkelbazillenkulturen und Organen von tuberkulös infizierten Meerschweinchen in die Bauchhöhle eingespritzt wurden, bekamen diejenigen Tiere, welche mehrere Monate mit Azetonextrakt von Tuberkelbazillen behandelt wurden, typische Tuberkulose, während die Kontrolltiere völlig frei blieben.

---



# ACTIVEERING VAN DEN FILTREERBAREN VORM VAN DEN TUBERKELBACIL

DOOR

Dr. H. D. BOER en R. STOOP, artsen

## II.

De hieronder te beschrijven onderzoeken zijn begonnen in het Institut Pasteur te Parijs, waar een onzer (S) bij VAN DEINSE de filtraten bereid en ingespoten heeft. Nadat medio December 1933 de proefdieren naar Leiden overgebracht zijn, is het onderzoek door den ander onzer (B) voortgezet.

Dit onderzoek betreft uitsluitend de stam „Gijsman” R, waarover in het vorig artikel mededeelingen zijn gedaan. Wat wijze van filtratie en verdere inrichting van de proeven betreft, verwijzen wij ook naar het vorig artikel.

Den 6-11-'33 werd een cavia afgemaakt, die 16 dagen te voren onderhuids ingespoten was met  $\frac{1}{10}$  mgr. cultuur „GIJSMAN” R. Uit lever en milt werd direct op de gebruikelijke wijze een filtraat bereid, waarvan bij 3 caviae 90/6, 90/8 en 90/10 10 cc. werd ingespoten in de buikholte. Van deze werd alleen 90/6 van den dag na de inspuiting af 2 keer per week met aceton-extract ingespoten in de rechter lies. Cavia 90/10 stierf na ruim 7 weken op 28-12-'33 zonder tuberculeuse afwijking, evenzoo Cavia 90/80 op 5-2-'34, of wel 3 mnd. na de filtraatinspuiting. Met een suspensie van organen van de gestorven dieren werden weer 2 nieuwe dieren ingespoten, en wel 872 en 914. Cavia 872, die evenals de andere contrôle cavia nooit op tuberculine reageerde, werd gedood op 5-4-'34, 5 mnd. na het begin van de proef; deze had geen tuberculeuse afwijkingen. De andere passage cavia 914 is nog in leven, heeft nooit op tuberculine gereageerd. Bij het proefdier 90/6, dat op 18-5-'34 voor de laatste maal met aceton-extract werd ingespoten (eerst in de rechter lies, na 16-3-'34 in de linker lies), zijn ook steeds alle tuberculine-reacties negatief uitgevallen. Het dier is nog in leven. Kweekproeven uit een vergroote liesklier rechts, en een abces in linker lies op resp. 16-3-'34 en 18-5-'34 vielen negatief uit. De etter van het op 18-5-'34 geopend abces werd ingespoten bij Cavia 30 en Cavia 31, waarvan Cavia 30 met aceton-extract werd behandeld. Terwijl het laatste dier tot nu toe niet op tuber-



Deze merkwaardige bacil hebben wij nader bestudeerd. Ofschoon hij in groeiwijze aan een aviaire bacil deed denken, week hij hiervan toch reeds af, doordat hij de Sauton sterk zuur (pH 5.5) maakte. Aviaire bacillen toch zouden de Sauton alcalisch maken. Ook in de dierproef week hij in meerdere opzichten af. De jonge haan No. 1, die op 26-4-'34 met 2 mgr. intraveneus was ingespoten, stierf binnen 6 weken op 8-6-'34, sterk vermagerd. Haardvormige afwijkingen waren afwezig. In uitstrijkpraeparaten van longen, lever en milt werden zuurvaste staafjes gevonden, het meest in dat van de lever, waarin uiterst talrijke bacillen in groote groepen bijeen gevonden werden. Deze bacillen waren wel duidelijk gegranuleerd. Uit de lever werd weer dezelfde week, zooveen beschreven cultuur verkregen. Met deze werd een tweede haan No. 2 intraveneus ingespoten, nu echter in de dosis van  $\frac{1}{10}$  mgr. op 5-7-'34. Op 27-9-'34 hebben wij het vermagerde dier afgemaakt. De lever was sterk vergroot, zag bruingeel, was blijkbaar gedegenereerd en zat vol met kleine gele haardjes. In een uitstrijkpraeparaat werden slechts enkele zuurvaste bacillen gevonden, terwijl in de licht vergroote milt talrijke bacillen in hoopjes bijeen aangetroffen werden. De cultuur is dus pathogeen voor kippen, al verwekt hij niet de voor aviaire tuberculose typische afwijkingen.

Voor een konijn bleek de cultuur matig pathogeen. Konijn 110, bij het begin van de proef 2140 gram, werd op 19-4-'34 met  $\frac{1}{10}$  mgr. intraveneus ingespoten. Het dier viel in de eerste 4 weken af tot 1880 gram en kwam daarna in 2 weken weer 80 gram bij tot 1960 op 29-5-'34, toen het gedood werd. Als eenige afwijking vonden wij in de goed samenvallende longen matig veel kleine hyaliene haardjes en een licht vergroote milt. Uit de longen werd met kweeken weer dezelfde week cultuur verkregen. Konijn 130 dat op 28-6-'34 met  $\frac{1}{10}$  mgr. van de uit haan 1 geïsoleerde bacillen was ingespoten, is gedood op 9-10-'34 in vrij goede voedingstoestand. In longen en lever waren talrijke zeer kleine haardjes aanwezig, de milt was licht vergroot.

Voor caviae was de S-cultuur avirulent. Cavia 45 op 1-6-'34 met  $\frac{1}{10}$  mgr. cultuur van cavia 902 onderhuids ingespoten, heeft nooit een positieve tuberculinereactie vertoond; deze werd gedood op 17-10-'34 en had toen geen tuberculeuse afwijkingen. Cavia 75 op 28-6-'34 ingespoten met  $\frac{1}{10}$  mgr. cultuur uit de lever van haan 1, reageert ook meermalen op tuberculine-inspuitingen in de huid met infiltraten, doch pas op 14-11-'34 met een infiltraat en necrose.

Cavia 8, het passagedier van cavia 902, is door een ongeval om het leven gekomen en kon niet geseceerd worden. Nu zijn in de plaats daarvan op 24-9-'34 caviae 110 en 111 met  $\frac{1}{100}$  mgr. cultuur subcutaan ingespoten. Cavia 110 wordt nu regelmatig met acetoneextract behandeld. Het onderzoek is nog niet beëindigd.

### *Samenvatting.*

Van twee caviae, die met cultuurfiltraat „Gijsman” R worden ingespoten, sterft het contrôledier na bijna 5 maanden zonder tuberculeuse afwijkingen. Het acetoneextract-dier sterft na  $2\frac{1}{2}$



maand zonder tuberculeuse afwijkingen; het passagedier, dat ruim 2 mnd. later gedood wordt, vertoont evenmin tuberculeuse afwijkingen, doch wel abcesjes en vergroote klieren in de lies en abcesjes in het omentum. Uit de etter van liesklieren van dit dier wordt een uitgesproken weeke cultuur van zuurvaste bacillen gekweekt, die pathogeen zijn voor kippen, zonder typisch tuberculeuse afwijkingen te verwekken, tamelijk weinig pathogeen voor konijnen en in het geheel niet pathogeen voor caviae. VAN DEINSE en andere onderzoekers uit het Institut Pasteur hebben overeenkomstige cultures beschreven, verkregen bij hun filtraatproeven. Uit hun proefdieren, die dergelijke cultures geleverd hadden, isoleerden zij later, na meer aceton-extract inspuitingen en eventueele passages, stammen met geheel ander karakter. Helaas werd de proef met onze passagedieren afgebroken door een ongeval met een cavia. Wij zullen nog nader onderzoeken of het gelukt door middel van aceton-extractinspuitingen bij een met cultuurbacillen ingespoten cavia het karakter van de bacillen te veranderen.

De uitkomsten van deze proef zijn dus: in 2 van 4 proefreeksen is een positief resultaat verkregen. In een van overigens negatief verlopen proefreeksen is tuberculose opgetreden bij het passagedier van een contrôlecavia. Zooals bij de beschrijving van de proef is betoogd, moeten wij concludeeren, dat dit niet het gevolg is geweest van te groote doorlaatbaarheid van het gebruikte kaarsfilter, doch moet de contrôlecavia al reeds voor de proef met tuberkelbacillen besmet zijn geweest.

Overigens is nooit tuberculose geconstateerd bij de met filtraat ingespoten contrôledieren en de passagedieren van deze. In de beide negatieve proefreeksen is groote sterfte onder de dieren voorgekomen; dit is een van de oorzaken, waarom het onderzoek in deze proefreeksen niet lang (genoeg?) is voortgezet en niet in alle proefreeksen de contrôlecaviae zoo lang geobserveerd zijn, als wenschelijk ware geweest. Daardoor verkrijgt deze proefreeks minder bewijskracht, dan de in het vorig artikel beschrevene.

Positieve resultaten zijn bereikt in één proefreeks met orgaan-



filtraat, en in de proefreeks met cultuurfiltraat. In de eerste proefreeks is een met acetonextract behandeld passagedier aan typische tuberculose gestorven. De uit dit dier gewonnen cultuur had alle eigenschappen van de cultuur „Gijsman” R, waarvan bij deze proef was uitgegaan.

In de bedoelde andere proefreeks verwekte het cultuurfiltraat bij het acetonextract-dier en diens passagedier geen tuberculose, maar wel kon uit het passagedier een cultuur van atypische tuberkelbacillen gekweekt worden. De bacillen van deze cultuur gelijken wat cultuur en pathogene eigenschappen betreft, het meest op aviaire tuberkelbacillen. Zij verschillen van „Gijsman” R, die VAN DEINSE geïsoleerd heeft daarin, dat zij vrijwel niet pathogeen zijn voor konijnen, en dat zij minder pathogeen zijn voor kippen.

Dit onderzoek laat dezelfde conclusie toe, als waarmee het vorig artikel besluit.

Op de vraag naar de verklaring van deze proeven, blijven wij het antwoord schuldig. Zooals bekend, heeft o.a. FLU tegenover de leer van de Fransche school, dat de bijzondere eigenschappen van de filtraten berusten op de aanwezigheid van filtreerbare vormen, die een bepaald stadium in de levenscyclus van de tuberkelbacil vertegenwoordigen, de stelling verdedigd, dat men de verklaring van de verschijnselen moet zoeken in de aanwezigheid van enkele tuberkelbacillen in de filtraten. Nu willen wij ons niet aan de zijde van deze of gene partij stellen, omdat o.i. de kennis omtrent deze kwestie nog onvoldoende is om een definitief oordeel uit te spreken. Naar aanleiding van de zienswijze van Prof. FLU, zooals hij die in enkele artikelen in het Ned. Tijdschr. v. Geneeskunde 1934 ontwikkeld heeft, willen wij echter een en ander opmerken.

Wanneer men aanneemt, dat de positieve resultaten bij de filtraatproeven het gevolg zijn van de aanwezigheid van enkele bacillen in het filtraat, dan zou men bij de ingespoten proefdieren een zich langzaam ontwikkelende tuberculose mogen verwachten, zooals DOERR <sup>1)</sup> en VAN DER LEE <sup>2)</sup> dat gezien

<sup>1)</sup> Zeitschr. für Immunitätsforschung 74. 1932, Heft 1—2.

<sup>2)</sup> Diss. Utrecht. 1928.



hebben bij caviae, die zij met één of enkele, getelde tuberkelbacillen besmetten. Dit ziet men echter niet bij de filtraatdieren. Men moet dan dus zijn toevlucht nemen tot de veronderstelling, dat de kaars een selectieve werking uitoefent en slechts de avirulente bacillen doorlaat. Een andere veronderstelling, dat een tuberkelbacil door het passeeren van de poriën van een kaars dusdanig beschadigd wordt, dat hijzelf en generaties van bacillen, die uit hem voorkomen, geheel andere eigenschappen verkrijgen, is moeilijk in te denken. De eerste veronderstelling was dan nog verkieslijker. DOERR en GOLD <sup>1)</sup> vonden bij hun onderzoek, dat slechts 1 van 6 caviae, die met 1 tuberkelbacil uit bijv. een Vallée-cultuur besmet werden, tuberculose kreeg, waaruit zij de gevolgtrekking trekken, dat slechts 1 van 6 bacillen uit de cultuur leeft en de andere dood zijn. Nu zou men kunnen gaan veronderstellen, dat die andere 5 bacillen niet dood waren doch avirulente vormen voorstellen, en dat juist deze de bacillen zijn, die de kaars passeeren. Een dergelijke verklaring lijkt wat gedwongen, maar laat zich denken, bijv. door andere oppervlakte toestanden van de avirulente vormen te veronderstellen. Men zou deze hypothese kunnen toetsen aan een onderzoek, waarbij men een groot aantal caviae besmette met 1 geïsoleerde bacil, en met deze dieren onderzoekingen ging verrichten, als met filtraatdieren (bijv. voor een gedeelte behandelen met acetonextract). Zooals echter reeds naar voren gebracht is in het vorig artikel, doet voorloopig het ontbreken van een algemeen geaccepteerde verklaring niet af aan de genoemde gevolgtrekkingen, die men uit dergelijke proeven kan maken.

### SYNOPSIS

Filtrates such as were used in the experiments of the foregoing article became active in 2 out of 4 experiments.

In one of these experiments the culture obtained from a guinea-pig differed widely from the culture used for the preparation of filtrates.

---

<sup>1)</sup> Zeitschr. für Immunitätsforschung 74. 1932. Heft 1—2.



### RÉSUMÉ

Des expériences similaires à celles décrites dans l'article précédent ont donné des résultats dans 2 des 4 expériences. L'une des deux cultures isolées a presque les mêmes caractéristiques que la culture de bacilles tuberculeux aviaires.

### ZUSAMMENFASSUNG

Die in diesem Artikel erwähnten Untersuchungen sind gleich denen im vorigen Artikel, mit dem Unterschied, dass die Untersuchungen zum Teil im Institut Pasteur ausgeführt sind, während die ersten Untersuchungen ganz in Holland stattfanden. In 2 von 4 Versuchsreihen hat man positive Resultate bekommen mit der Aktivierung der Filtrate mittels Azetonextrakt. Der eine der aus den Versuchstieren gezüchteten Tuberkelbazillenstammen ähnelt am meisten einem aviären Bazillus.

---



# HETEROPHIEL ANTIGEEEN IN CARCINOOMWEEFSEL

(eerste mededeeling)

DOOR

L. DE KROMME

Bioloog b. h. carcinoom-laboratorium „de Bruïne Groeneveldt”

---

De maligniteitseigenschappen van de kankercel zijn erfelijk (transplantaties, weefselculturen, glycolyse-proeven enz.) Aan deze maligniteit moeten derhalve veranderingen in de fijne chemische celstructuur inhaerent zijn, welke niet onmogelijk met de methoden der serologie tot uitdrukking kunnen worden gebracht.

A priori laat zich denken, dat deze structuurafwijkingen in verschillende richtingen gezocht en op verschillende wijzen aangetoond zouden kunnen worden.

In deze eerste mededeeling, verslag gevende van de resultaten in ons Instituut verkregen bij onze pogingen om specifieke kankercelstructuren aan te toonen, wil ik vaststellen, dat door middel van een eenvoudige uitvlokkingreactie kan worden aangetoond, dat carcinoomweefsel heterophiel antigeen bevat.

In de loop der onderzoeken van WATERMAN en DE KROMME werd het verschijnsel ontdekt van de agglutinatie van kankercellen door verdund menselijk bloedserum (Biochem. Zeitschr. 205. H 1/3 1929; Zeitschr. f. Krebsf. Bd. 29 H. 4 1929); een verschijnsel, dat indien rekening gehouden wordt met de bijzondere proefvoorwaarden, als algemeen en universeel kon worden bestempeld. Het bleek vervolgens dat de sera van sommige diersoorten dit vermogen eveneens, van andere niet bezitten.

Mijn voorganger in het Lab. „de Bruïne Groeneveldt”, Dr. H. W. JULIUS, kon deze waarnemingen bevestigen en wendde



pogingen aan om het verschijnsel te interpreteren. (JULIUS, Tijdschr. v. Hyg. 6, 71, 1931.)

Het viel hem daarbij op, dat kankercellen juist door de sera van die dieren konden worden geagglutineerd, welke behoorden tot de z.g.n. konijnengroep in het heterogenetisch systeem van FORSSMAN (mensch-konijn-rund-varken-rat enz.) JULIUS maakte bovendien suspensies van orgaancellen van dieren uit de beide FORSSMAN'sche groepen en vond, dat de normale lichaams-cellen van de cavia-groep in 't algemeen alléén geagglutineerd werden door de sera der konijnengroep en dat normale lichaams-cellen van dieren uit deze laatste groep voor alle normaal-sera inagglutinabel waren. Hij stelde de hypothese op, dat de beschreven agglutinatie der kankercellen zou berusten op het in deze cellen voorkomende heterophiel antigeen. Immers had LEHMANN-FACIUS, steunende op oudere onderzoekingen o.a. van DÖRR en PICK reeds eerder pogen aan te toonen, dat kankerweefsel heterophiel antigeen bevat.

Terwijl nu andere onderzoekers (HIRSZFELD-HALBER e.a.) daarentegen de mogelijkheid van het voorkomen van heterophiel antigeen in de kanker cel met stelligheid van de hand wijzen, scheen het ons van overwegend belang in dit probleem tot een definitieve oplossing te komen.

Reeds in 1920 gaven SACHS en GUTH een methode aan volgens welke heterogenetische antigenen en antilichamen konden worden aangetoond. Op overeenkomstige wijze als bij de reactie van SACHS-GEORGI werden serumverduunningen saamgebracht met in keukenzoutoplossing geëmulgeerde alcoholische orgaan-extracten. Er ontstaat een troebeling, veelal slechts lichte opalescentie, indien men op deze wijze een zeker heterogenetisch antiserum met een heterophiel antigeen in reactie brengt. De reactie is specifiek. Zij blijft in 't algemeen uit, indien men in plaats van b.v. schapenbloed-antiserum, normaal konijnenserum <sup>1)</sup> of met schapenbloed voorbehandeld antiserum bezigt,

---

<sup>1)</sup> In de reactie van S. en G. wordt slechts zeer zelden met normaal konijnenserum een zwak positieve reactie verkregen (niet met norm. cavia-serum), welke dan is toe te schrijven aan de norm. praecipitinen van heterog. karakter.



en ook indien men het alcoholisch extract van cavia-groep-organen vervangt door dat van de konijnengroep.

Hoewel wij het principe dezer, ook door LEHMANN FACIUS bij zijn onderzoekingen toegepaste, reactie als feitelijke grondslag voor het aantoonen van heterogenetische antigenen en antilichamen wel konden erkennen, gaf zij ons in de practijk toch in zooverre onbevredigende resultaten, dat de waargenomen verschillen in opalescentie dikwijls zeer gering zijn en moeilijk afleesbaar, terwijl de uitvoering verder niet zeer geëigend is voor proefneming op groote schaal.

Uitstekende resultaten werden echter verkregen toen we extract en serum voorzichtig in ringreactie boven elkaar inzetten. Op het scherpe scheidingsvlak vormt zich, (meestal binnen enkele minuten) een opalescentie, daarna een zeer fijnvlokkige ring.

Wij verkregen de heterogenetische antisera door konijnen te immuniseeren door intraveneuse injecties van natief en gekookt schapenbloed, suspensies van cavia en paardenier alsmede van muizen ca-cellen. Meest werden de konijnen verbloed nadat de titer van de schapenbloedhaemolyse tot  $1/5000$  of  $1/10000$  gestegen was. Inmiddels werden met lager geimmuniseerde dieren dikwijls goede resultaten verkregen. (Tabel I.)

De aldus verkregen immuunsera werden in ringreactie ingezet met de gecholesterineerde alcoholische orgaanextracten van allerlei dieren en het bleek nu, dat deze ringreactie volkomen geëigend is tot het aantoonen van heterophiel antigeen en dat de indeeling der dieren (in hoofdzaak verkregen door immunisatie- en absorptieproeven) volkomen beantwoordt aan de met deze praecipitatiereactie verkregen resultaten.

De vraag of ook menschelijk kankerweefsel met deze antisera een specifieke binding kan geven bestudeerden wij aan de hand van 5 menselijke tumoren. Het uit tabel II afleesbare resultaat van dit onderzoek was nu, dat ieder heterogenetisch antiserum in staat was een specifieke ringreactie te geven met



TABEL I.

Serum	Alcoholische orgaanextracten in NaCl.																																
	Cavia- nier			Rat- nier			Paard- nier			Mamma Ca.			Twort Ca.			Ehrlich Ca.			Rund- nier			Konijn- nier			Paard- bijnier			Schaap erythr.			Varken- nier		
	Nº.			Nº.			Nº.			Nº.			Nº.			Nº.			Nº.			Nº.			Nº.			Nº.			Nº.		
Mensch N <sup>1)</sup> A 78	1 2 3	— — —		1 2 3	— — —		1 2 3	— — —		1 2 3	— — —																						
Mensch N A 23	4 5	— —		4 5 6	— — —		4 5 6	— — —		4	—		1	—		1	—		1 2	— —													
Mensch N A 28	4 5	+ +		4 5 6	— — —		4 5 6	+ + +		4	+		1	+		1	—		1 2	— —		1	—		1	±							
Mensch Ca. A 79	1 2 3	+ + +		1 2 3	— — —		1 2 3	+ + +		1 2 3	+ + +																						
Mensch Ca. A 2	4 5	+ +		4 5 6	— — —		4 5 6	+ + +		4	—		1	—		1	—		1 2	— —		1	—		1	—							
Mensch Ca. A 5	4 5	— —		4 5	— —		4 5 6	— — —		4	—		1	—		1	—		1 2	— —		1	—		1	—							
Mensch Ca. A 17	4 5	— —		4 5	— —		4 5 6	— — —					1	—		1	—		1 2	— —		1	—		1	—							

<sup>1)</sup> Het gedrag van normale en carcinomateuse sera vindt een uitvoerige bespreking in een der eerstvolgende mededeelingen.



TABEL I (Vervolg).

P.

Serum	Cavia- nier		Rat- nier		Paard- nier		Mamma Ca.		Twort Ca.		Ehrlich Ca.		Rund- nier		Konijn- nier		Paard- bijnier		Schaap erythr.		Varken- nier		
	Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		
Mensch Ca. A 18	{	4	—	4	—	4	—	1 3 3	— — —	4	—	1	—	1	—	1	—	1	—	1	—		
		5	—	5	—	5	—									2	—						
						6	—																
Cavia 1	{																						
Cavia 2	{	4	—	4	—	4	—			4	—	1	—	1	—	1	—	1	—	1	—		
		5	—	5	—	5	—							2	—								
						6	—																
Cavia 3	{	10	—	7	—					7	—	6	—	2	—	6	—	1	—	4	—	1	—
Cavia 4			11	—						8	—			3	—	7	—						
Cavia 5	{	10	—	7	—	8	—			7	—	6	—										
		11	—							8	—	7	—										
												8	—										
Cavia 6	{	12	—	8	—	9	—					9	—			8	—	2	—	5	—		
		13	—									10	—			9	—						
Cavia 7	{	15	—	9	—	10	—					11	—	4	—	3	—			6	—	2	—
		18	—	10	—	11	—					12	—	5	—	4	—			7	—	3	—
																						4	—
Cavia 8	{	24	—	15	—	11	—					12	—	4	—	4	—					6	—
		26	—	16	—											5	—					7	—
		27	—	17	—																		
				18	—																		

10



TABEL I (Vervolg).

Serum	Cavia- nier		Rat- nier		Paard- nier		Mamma Ca.		Twort Ca.		Ehrlich Ca.		Rund- nier		Konijn- nier		Paard- bijnier		Schaap erythr.		Varken- nier	
	Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		Nº.	
Konijn N 1	4 5	— —	4 5	— —	4 5 6	— — —			4	—	1	—	1	—	1 2	— —	1	—	1	—		
Konijn N 2	5	+	4	—	4 5 6	+ + +			4	+	1	+										
Konijn N 3	10 11	+ +	7	—					7 8	— —	6	+	2 3	— —	6 7	— —	1	—	4	—	1	—
Konijn N 4	15	+	11	—	9	—					9	+	2 3	— —	8 9	— —			2 3	— —		
Konijn N 5	15 16 17 18	+ + + +	17 18	— —	10 11	+ +					10 11	+ +	4 5	— —	10 11 12	— — —			5 6 7	— — —	3 4 5	— — —
Schaap N	4 5	— —	4 5	— —	4 5 6	— — —			4	—	1	—	1	—	1 2	— —	1	—	1	—		
Kip N	4 5	— —	4 5	— —	4 5 6	— — —			4	—	1	—	1	—	1 2	— —	1	—	1	—		
Rat 1	4 5	+ +			4 5 6	+ + +			4	+	1	+	1	—	1 2	— —						



TABEL I (Vervolg).

Serum	Cavia- nier		Rat- nier		Paard- nier		Mamma Ca.		Twort Ca.		Ehrlich Ca.		Rund- nier		Konijn- nier		Paard- bijnier		Schaap erythr.		Varken- nier	
	N <sup>o</sup> .		N <sup>o</sup> .		N <sup>o</sup> .		N <sup>o</sup> .		N <sup>o</sup> .		N <sup>o</sup> .		N <sup>o</sup> .		N <sup>o</sup> .		N <sup>o</sup> .		N <sup>o</sup> .		N <sup>o</sup> .	
Rat 2	10 11	+ +	7	—					7 8	+ +			2	—	6 7	— —	1	+	4	—	1	—
Rat 3	12 13	— —	8	—	9	+					9 10	— +			8 9	— —	2	—	5	—		
Rat 4	15 18	+ —			10 11	+ +					11 12	+ +	4 5	— —	3 4	— —	6 7	— —			2 3 4	— — —
Anti sch. bl. imm. ser. N <sup>o</sup> . 8	4	++	4	—	4	++			4	++	1	++	1	—	1	—	1	++	1	+	1	—
	5	++	5	—	5	++			5	++	2	++	2	—	2	—	2	++	2	++		
	6	++	6	—	6	++			6	++	3	++	3	—	3	+			3	++		
	7	++			7	++			7	++	4	++	4	—	4	+			4	+		
	8	++			8	++			8	++	5	++	5	—	5	—						
	10	++	7	—							6	++			6 7	— —						
Anti sch. bl. imm. ser. N <sup>o</sup> . 24	12	++			9	++					9	+			8	—	2	s.	5	+		
	13	++			10	++					10	++			9	—	3	s.				
	14	++			11	++											3	+				
	15	++																				
10* Anti sch. bl. (gekookt) imm. ser. N <sup>o</sup> . 25	12	++	9	—	9	++					9	++			8	—	2	s.	5	+		
	13	++	10	—	10	++									9	—	3	s.	6	++		
	14	++	11	—	11	++									3	—	6	s.	7	++		
	15	++	12	—											4	—	7	+				
			13	—																		
			14	—																		
			15	—																		
			16	—																		



TABEL I (Vervolg).

Serum	Cavia- nier		Rat- nier		Paard- nier		Mamma Ca.		Twort Ca.		Ehrlich Ca.		Rund- nier		Konijn- nier		Paard- bijnier		Schaap erythr.		Varken- nier	
	N <sup>o</sup> .		N <sup>o</sup> .		N <sup>o</sup> .		N <sup>o</sup> .		N <sup>o</sup> .		N <sup>o</sup> .		N <sup>o</sup> .		N <sup>o</sup> .		N <sup>o</sup> .		N <sup>o</sup> .		N <sup>o</sup> .	
Anti cavia nier imm. ser. N <sup>o</sup> . 9	4	++	4	—	4	++			4	++	1	++	1	—	1	—	1	++	1	++	1	—
	5	++	5	—	5	++			5	++	2	++	2	—	2	—	2	++	2	++		
	7	++	6	—	6	++			6	++	3	++	3	—	3	+	3	++	3	++		
	8	++	7	—	7	++			7	++	4	++	4	—	4	+	4	+	4	+		
	9	++			8	++			8	++	5	++	5	—	5	—						
	10	++									6	++	6	—	6	—						
	11	++											7	—	7	—						
Anti cavia nier imm. ser. 27	12	++			9	++					9	+	2	—	8	—			5	+		
	13	++											3	—	9	—						
	14	++																				
	16	++	17	—	10	++					10	++	4	—	10	—			6	+	2	—
	17	++	18	—	11	++					11	++	5	—	11	—			7	+	3	—
	18	++									12	++			12	—					4	—
	19	++																		5	—	
	20	++																		6	—	
	21	++																		7	—	
	22	++																		8	—	
	23	++																				
	24	++																				
25	++																					
26	++																					
27	++																					
Anti cavia nier imm. ser. N <sup>o</sup> . 29 en 31	12	+			9	++					9	+	2	—	8	—			5	+		
	13	+											3	—	9	—						
	14	+																				
Anti Ca. (Ehrl.) ser. N <sup>o</sup> . 15	4	+	4	—	4	+			4	+	1	+										
					5	+																
					6	+																



TABEL I (Vervolg).

Serum	Cavia- nier		Rat- nier		Paard- nier		Mamma Ca.		Twort Ca.		Ehrlich Ca.		Rund- nier		Konijn- nier		Paard- bijnier		Schaap erythr.		Varken- nier	
	Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		Nº.		Nº.	
Anti Ca. (Ehrl.) ser. Nº. 16	4	+	4	—	4	+			4	+	1	+										
					5	+																
					6	+																
Anti Ca. (Ehrl.) ser. Nº. 18	12	++			9	++					9	++			8	—	2	+	5	+		
	13	++									10	++			9	—	3	+				
	14	++																				
Anti Ca. (Ehrl.) imm. ser. Nº. 19	15	++	8	—	9	++					9	++			8	—	2	++	5	++	2	—
	16	++	9	—	10	++					10	++			9	—	3	++			3	—
	17	++	10	—	11	++									3	—	6	++			4	—
	18	++	11	—											4	—	7	++			5	—
			12	—																	6	—
			13	—																	7	—
			14	—																	8	—
			15	—																		—
			16	—																		—
Anti Ca. (Ehrl.) imm. ser. Nº. 21	12	++			9	+					9	+			8	—	2	S.	5	+		
	13	++									10	+			9	—	3	S.				
	14	++																				
Anti paard- nier imm. ser. Nº. 22	12	++			9	+					9	+			8	—	2	S.	5	+		
	13	++									10	+			9	—	3	S.				
	14	++																				



de alcoholische extracten van ieder dezer menschelijke tumoren.

Hoewel de door immunisatie met muizen-ca-cellen verkregen antisera vrijwel de sterkste reactie gaven, zou deze reactie alléén er slechts op behoeven te wijzen, dat met het muizen-kankerweefsel (waarin de factor muis) een tegen het menschelijk kankerweefsel gericht antilichaam is verkregen, hetgeen reeds op een partieele receptorengemeenschap tusschen muizen- en menschenkanker zou wijzen.

De positieve reacties met het cavianier-antiserum bewijzen echter, dat hier heterophiel antigeen aanwezig is. (Tabel II.)

TABEL II.

Konijnen imm. sera	<i>Alcoholische orgaanextracten.</i>				
	Mamma Ca. 21 Mrt	Rectum Ca. 17 Sept. bl. gr. O.	Mamma Ca. 18 Sept. bl. gr. O.	Mamma Ca. 20 Mrt	Periton. metast. 13 Aug.
Anti Ehrl. Ca. 18. . .	++	++	++	++	+
" " " 19. . .	+++	+++	+++	+++	++
Anti paarde-nier 22. . .	+	+	+	+	±
Anti sch. bl. 24. . .	+	+	+	+	—
" " " 100° 25. . .	+	+	+	+	—
" " " 100° 26. . .	++	+	++	++	—
" " " 8. . .	++	++	++	++	+
Anti cavia nier 9. . .	++	++	++	++	+
" " " 27. . .	++	+	++	++	+
" " " 29. . .	+	+	+	+	+
" " " 31. . .	+	+	+	+	±
Norm. cavia ser. 1. . .	—	—	—	—	—
" " " 2. . .	—	—	—	—	—
Norm. kon. ser. 1. . .	—	—	—	—	—
" " " 2. . .	+	+	+	+	—

Dit bewijs van de heterophiele antigeenstructuur van de kankercel kan echter eveneens gebracht worden door de immunisatie proef. (Tabel III.)

Uit de reeds genoemde onderzoeken van HIRSZFELD (Zeitschr. f. Imm. f. Bd. 75 1932 H. 3/4) blijkt, dat deze zich op het standpunt stelt, dat zoowel het verkrijgen van heterogenetische antisera door immunisatie met menschelijk kankerweefsel, als de reactie tusschen een zeker heterogene-



TABEL III.

Alcoh. org. extr.	<i>Konijnen imm. sera.</i>				
	17 mamma ca.	9 cavia nier	Norm. 0	8 sch. bl.	Norm. cavia
Paarde-nier I . . . .	++	++	—	++	—
„ II . . . .	+	++	—	++	—
Ratte-nier . . . . .	—	—	—	—	—
Twort ca. 9 Juli . . .	+	+	—	+	—
Ehrl. ca. 9 Juli . . .	+	±	—	+	—
Cavia nier . . . . .	++	++	—	++	—
Mamma ca. 21 Mrt . .	++	++	—	++	—

tisch antiserum en een alcoholisch kankerweefsel-extract verband zou houden met de bloedgroepen. Zooals bekend zijn de bloedlichaampjes A en AB mede gekarakteriseerd door het gehalte aan heterophiel antigeen.

Onze eigen proeven, ook met de bloedgroepen B en O ver-richt, wijzen er echter op, dat het voorkomen van heterophiel antigeen in kankerweefsel niet met het voorhanden zijn van bepaalde bloedgroepen kan worden verklaard. (Serologische Missbildungen? HIRSZFELD.)

Als verklaringsmogelijkheid van de divergeerende uitkomsten zou ik op de verschillende methodiek willen wijzen.

De resultaten van HIRSZFELD en HALBER nl. berusten in hoofdzaak op complementbindings reacties.

Ook naar onze meening verkrijgt het kankervraagstuk, in 't bijzonder het probleem der serologische kankerdiagnostiek, een geheel nieuw aspect door deze feiten in het centrum van de beschouwingen te trekken en worden zekerlijk nieuwe wegen voor een serologische kankerdiagnostiek geopend.

In een volgende mededeeling zullen we hier uitvoeriger op ingaan, onder critische beschouwing der literatuur.



### SAMENVATTING.

1. Als verklaringsmogelijkheid van het verschijnsel van de agglutinatie van kankercellen (WATERMAN en de KROMME) wordt door JULIUS de hypothese opgesteld, dat dit zou berusten op het voorkomen van heterophiel antigeen in kankerweefsel.

2. Aan de hand van een aantal onderzoeken wordt met behulp van een eenvoudige uitvlokkingsmethode de waarschijnlijkheid betoogd, dat kankerweefsel heterophiel antigeen bevat.

3. Er blijkt tevens uit, dat het voorkomen van heterophiel antigeen in kankerweefsel niet alleen bij de bloedgroepen A. en A. B. voorkomt.

4. Uitvoerige discussie met betrekking tot de mogelijkheid eener serologische kankerdiagnostiek wordt in uitzicht gesteld.

### SUMMARY.

1. As a possible explanation of the phenomenon of the agglutination of cancer-cells (WATERMAN and de KROMME) JULIUS has drawn up the hypothesis that this phenomenon should be founded on the occurrence of heterophilous antigene in cancer-tissue.

2. From a number of investigations the probability has been furnished with the aid of a simple method of flocculation that cancer-tissue contains heterophilous antigene.

3. From this it becomes evident at the same time that the occurrence of heterophilous antigene in cancer-tissue is not limited to the bloodgroups A. and A. B.

4. The prospect of detailed discussion with reference to the possibility of serological cancer-diagnostics is held out.

### ZUSAMMENFASSUNG.

1. Als Erklärsmöglichkeit der Erscheinung der Agglutination von Krebszellen (WATERMAN und de KROMME) wird von JULIUS die Hypothese aufgestellt, dass dieselbe auf dem Vorkommen heterophilen Antigens in Krebsgewebe beruhen soll.



2. An Hand einer Reihe von Untersuchungen wird mittels einer einfachen Ausflockungsmethode die Wahrscheinlichkeit erwiesen, dass Krebsgewebe heterophile Antigen enthält.

3. Zugleich erhellt hieraus, dass das Vorkommen heterophilen Antigens im Krebsgewebe nicht auf die Blutgruppen A. und A. B. beschränkt ist.

4. Es wird in bezug auf die Möglichkeit einer serologischen Krebsdiagnostik eine eingehende Besprechung in Aussicht gestellt.

### RÉSUMÉ.

1. JULIUS, pour faire comprendre le symptôme de l'agglutination de cellules cancéreuses (WATERMAN et de KROMME), pose l'hypothèse que ce symptôme se base sur la présence d'un antigène hétérophile dans le tissu cancéreux.

2. Par un examen détaillé et moyennant une simple méthode de floculation on a pu démontrer que le tissu cancéreux contient vraisemblablement un antigène hétérophile.

3. Il se trouve que la présence d'un antigène hétérophile dans le tissu cancéreux n'est pas limité aux groupes sanguins A. et A. B.

4. Une ample discussion se rapportant à la possibilité d'un diagnostic sérologique du cancer est en perspective.

---