

# OVER DE BACTERIOLOGISCHE TYPHUSDIAGNOSTIEK.

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN  
GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE  
AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT  
OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS  
JHR. MR. B. C. DE SAVORNIN LOHMAN HOOG-  
LEERAAR IN DE FACULTEIT DER RECHTS-  
GELEERDHEID VOLGENS BESLUIT VAN DEN  
SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE  
BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER  
GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN OP DINSDAG  
5 MEI 1931 DES NAMIDDAGS TE 4 UUR DOOR

JOANNES GERARDUS SIESTROP  
ARTS, GEBOREN TE AMSTERDAM.



INSTITUUT VOOR PRAEVENTIEVE  
GENEESKUNDE LEIDEN

VAN GORCUM & COMP. N.V.  
UITGEVERS  
ASSEN



## STELLINGEN.

### I.

Febris undulans, tengevolge van infectie met *Brucella Bang*, is een ziekte, die ook vroeger bij den mensch voorkwam, maar tot voor korten tijd niet als zoodanig is herkend.

### II.

Bij het toedienen van adrenaline-bevattende preparaten aan lijders aan asthma bronchiale, verdient het gebruik van een inhalatorium de voorkeur boven subcutane injectie.

### III.

In den strijd tegen typhus behoort de prophylactische inenting in het algemeen een ondergeschikte plaats in te nemen.

### IV.

Bij de bestrijding van nekkramp in het leger verdient het nemen van algemeen hygiënische maatregelen de voorkeur boven isolatie van bacillendragers.

### V.

De epidemische influenza wordt niet verwekt door den bacil van PFEIFFER.

### VI.

Bij het zoeken naar een verklaring voor het ontstaan van het Röntgenulcus zal men zijn aandacht ook aan den inner-vatietoestand der bestraalde deelen moeten schenken.

### VII.

De behandeling van brandwonden met versch bereide waterige looizuoeroplossing beteekent een groote vooruitgang in de therapie der verbranding.

### VIII.

Bij actinomyose is het toepassen van Röntgentherapie naast chirurgische- en joodkalithherapie aan te bevelen.

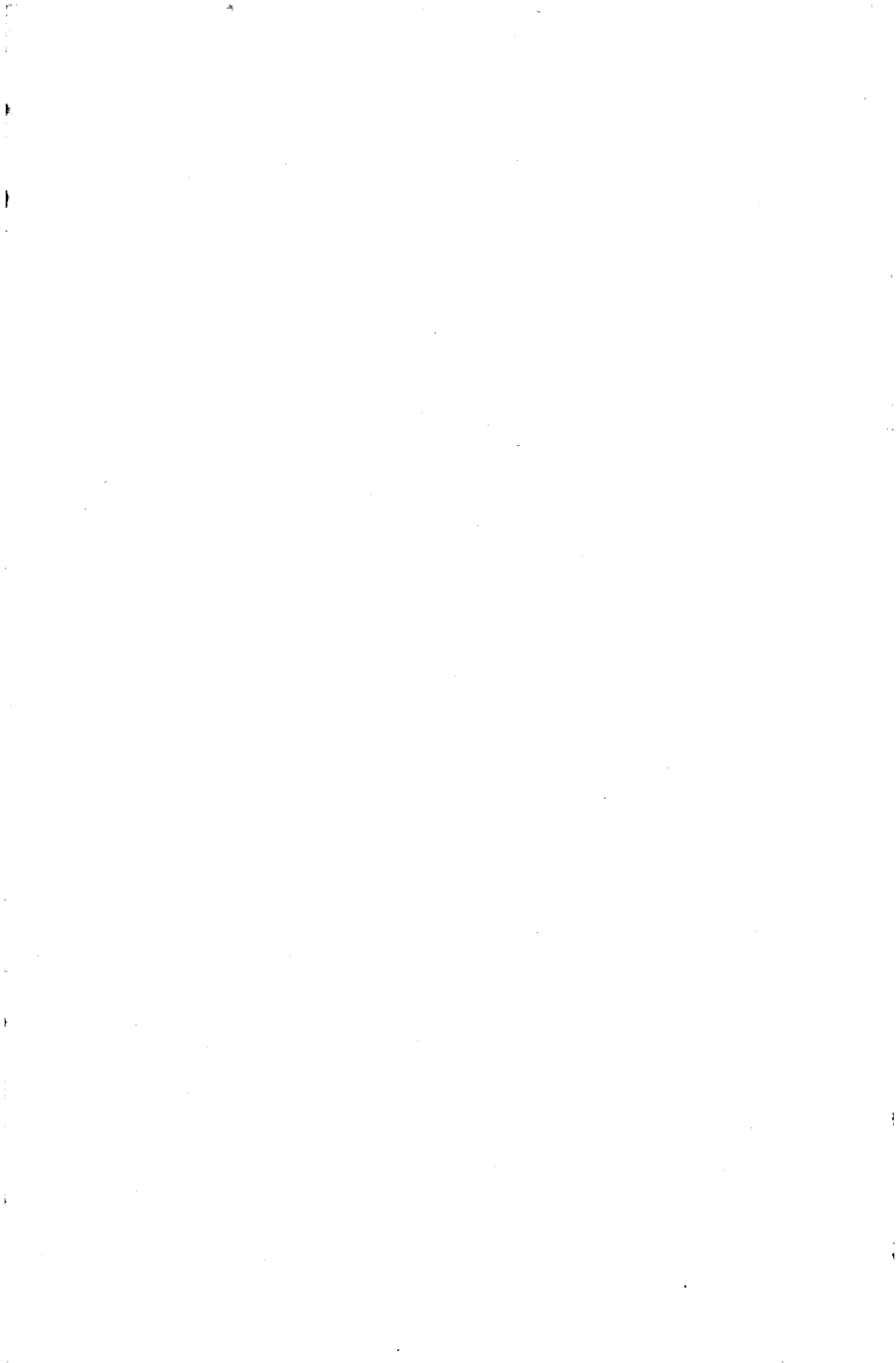
## IX.

Het ontstaan van icterus neonatorum kan het best verklaard worden door de minder goede zuurstofvoorziening van de vrucht voor de geboorte.

## X.

Secalepreparaten eischen nog grondige verbetering.

AAN DE NAGEDACHTENIS VAN MIJN VADER,  
AAN MIJN MOEDER,  
AAN MIJN VROUW.



## VOORWOORD.

Het verschijnen van dit proefschrift biedt mij een welkome gelegenheid, U, Hoogleraren der Medische en Natuurphilosophische faculteiten van Amsterdam, mijn dank te betuigen voor het onderwijs, dat ik van U mocht ontvangen.

U, Hooggeleerde WOLFF, hooggeachte Promotor, ben ik veel dank verschuldigd voor Uw steun bij de voorbereiding van dit proefschrift. De aangename wijze, waarop gij met mij de verschillende in mijn proefschrift behandelde vraagstukken hebt besproken, zal bij mij in dankbare herinnering blijven.

Hooggeleerde VAN LOGHEM, U dank ik zeer voor hetgeen ik van U leeren mocht, gedurende den tijd, waarin ik Uw assistent was.

U, Zeergeleerde BIJL, zeg ik hartelijk dank voor de wijze waarop gij mij, in de jaren, dat ik aan het Centraal Laboratorium verbonden ben, geleerd hebt kritisch wetenschappelijk te werken. Uw liefde voor het werk, Uw kennis en kunde strekken mij tot voorbeeld. Uw voorzichtigheid, Uw critiek en Uwe gave om zelfs op veel bewerkte gebieden een geheel nieuw licht te werpen, zullen mij onvergetelijk zijn. Ook voor de bereidwilligheid, waarmede gij steeds het benodigde materiaal te mijner beschikking steltet, ben ik U bijzonderen dank verschuldigd.

U, Zeergeleerde RUYS, dank ik voor de leiding, die ik van U mocht ontvangen tijdens mijn assistentschap aan het Laboratorium voor Gezondheidsleer te Amsterdam.

De tijd welke ik met U, Zeergeleerde KORTHOF en VAN DER HOEDEN, in het Centraal Laboratorium mocht samenwerken, zal mij steeds in aangename herinnering blijven.

Een woord van hartelijken dank geldt ook U, Mejuffrouw MULLER, voor Uw groote hulpvaardigheid mij steeds betoond bij de door mij verrichte onderzoekingen; ook voor de welwillende medewerking, die ik van het overige personeel van de bacteriologische afdeling van het Centraal-Laboratorium heb ondervonden ben ik dank verschuldigd.

Ik stel er prijs op eerbiedig hulde te brengen aan de na-

gedachtenis van mijn VADER en aan mijn MOEDER. Hun voorbeeld van krachtigen arbeid blijve mij steeds levendig in herinnering.

En ten slotte een geschreven woord van dank aan mijn Vrouw, wier litteraire hulp mij bij mijn werk steeds van veel waarde is geweest.



## INLEIDING.

In dit proefschrift heb ik mij ten doel gesteld na te gaan, in hoeverre de tegenwoordig in gebruik zijnde methoden van onderzoek bij de bacteriologische typhusdiagnostiek in het algemeen, en in het bijzonder in hoeverre de methode van onderzoek, zooals die op de bacteriologische afdeling van het Centraal Laboratorium voor de Volksgezondheid te Utrecht in gebruik is, voor verbetering vatbaar zijn.

Het onderzoek op typhus, zooals dat in het Centraal Laboratorium geschiedt, kan niet geheel op één lijn gesteld worden met dat in de ziekenhuislaboratoria. Het gemakkelijk te verkrijgen contact met den patiënt, de mogelijkheid een ingesteld onderzoek zoo noodig snel te herhalen met nieuw materiaal, doen de ziekenhuislaboratoria een eenigszins bevoorrechte positie innemen ten opzichte van de bacteriologische afdeling van het Centraal Laboratorium. Nieuw materiaal, moet hier steeds aangevraagd worden, het contact met de kliniek is slechts beperkt, het te onderzoeken materiaal is soms 24 uur en langer geleden afgezonden. Hier komt nog bij, dat het aantal onderzoekingen op géén laboratorium in Nederland zóó groot is als op de medische afdeling van het Centraal Laboratorium. In 1928 en '29 bedroeg dit aantal 70.000; in 1930 steeg dit tot 87.000. Hierdoor worden wij genoodzaakt slechts dié methoden van onderzoek toe te passen, welke den minsten tijd eischen en toch een hooge mate van betrouwbaarheid bezitten. Omslachtige onderzoekingsmethoden, welke misschien iets betere resultaten opleveren, kunnen hier niet in gebruik worden genomen. In kleinere laboratoria is dit in de meeste gevallen wel mogelijk. We moeten dus niet uit het oog verliezen, dat verbeteringen in de diagnostiek, welke voor het Centraal Laboratorium bruikbaar zijn, aan eischen moeten voldoen, welke men op een ziekenhuislaboratorium niet altijd behoeft te stellen.

Het regelmatig verschijnen van mededeelingen over nieuwe voedingsbodems, welke voor het onderzoek van bloed, faeces of urine te verkiezen zouden zijn boven de in gebruik zijnde, doet ons wel den indruk krijgen, dat nog velen niet tevreden

zijn met de resultaten, welke zij tot nu toe konden boeken.

Op grond van verschillende publicaties zijn door mij onderzoekingen ingesteld. Het aan de praktijk toetsen van alle aangegeven verbeteringen was natuurlijk onmogelijk. Daarom heb ik hieruit een keus gedaan.

Geheel nieuwe werkwijzen heb ik alleen dan aan een vergelijkend onderzoek onderworpen, wanneer de resultaten met deze werkwijzen, door anderen verkregen, van dien aard waren, dat verwacht mocht worden, dat hiermede ook door mij betere resultaten, dan met de in gebruik zijnde onderzoekingsmethoden, zouden kunnen worden bereikt.

De door mij verrichte onderzoekingen betroffen de volgende onderwerpen:

- 1e) De langere kweektijd van de bloed-in-galmengsels.
- 2e) De belemmering van den groei van de proteusbacillen in de MULLERSche tetrathionaatvoedingsbodem.
- 3e) De belemmering van het uitzwermen van de proteus op de ENDO-plaat.
- 4e) De door RUYS beschreven brillantgroen-voedingsbodem, welke door haar als aanvulling van den tetrathionaatbouillon wordt beschouwd.
- 5e) De waarde van de complementbindingsreactie voor het serologisch typhusonderzoek.
- 6e) De waarde van de agglutinatieproef van WIDAL, verricht met op verschillende wijzen bereide suspensies van gedoode typhus- en paratyphusbacillen.

Het materiaal, dat ik voor deze onderzoekingen gebruikte, was het ter onderzoek ingezonden patiëntenmateriaal, dat door het Hoofd der bacteriologische afdeling van het Centraal Laboratorium zooveel mogelijk ook te mijner beschikking werd gesteld.

Er konden dus in een groot aantal gevallen vergelijkingen tusschen oude en nieuwe methoden worden gemaakt. Bij zeer groote drukte moest ik er echter toe overgaan slechts een gedeelte van het materiaal op deze wijze te behandelen. De hoeveelheid materiaal, welke ingezonden wordt, wisselt zeer; soms komen op één dag een kleine honderd faeces- en urine-monsters binnen; dan weer eens vier of vijf. Dat hierdoor mijn onderzoekingen wel eens in het gedrang kwamen, is dus wel te begrijpen. Hiertegenover staat, dat op geen laboratorium hier te lande een dergelijke hoeveelheid materiaal ten behoeve van een bijzonder onderzoek ter beschikking kan worden gesteld.

# HOOFDSTUK I.

## DE ONTWIKKELING VAN DE BACTERIOLOGISCHE TYPHUSDIAGNOSTIEK.

In 1880 werd de typhusbacil voor het eerst door **EBERTH** microscopisch in praeparaten van milt en mesenteriaalklieren van aan typhus gestorven personen gezien. Kort hierna vond **KOCH** in den darmwand, milt, lever en nieren deze bacillen. Eenige jaren later (1884) gelukte het **GAFFKY** de typhusbacillen in reïncultuur te kweken. Door deze vondsten was de weg gebaad voor uitgebreide onderzoekingen over het voorkomen van de typhusbacillen in het menschelijk lichaam en de wijze van besmetting en verspreiding.

In 1885 gelukte het **PFEIFFER** uit de faeces van twee zieken typhusbacillen in reïncultuur af te zonderen. Een groote moeilijkheid bij het zoeken naar typhusbacillen bleek te zijn gelegen in de voor het isoleeren van deze bacillen nu juist niet bijzonder geschikte voedingsbodems, welke men tot zijn beschikking had. Aanvankelijk werden faeces van patiënten op agar of gelatine uitgestreken, verdachte kolonies werden afgeënt en met behulp van de destijds veel in gebruik zijnde aardappelcultuur verder onderzocht. Vele onderzoekingen waren er dus op gericht om het isoleeren van de typhusbacillen te vergemakkelijken. Van veel belang bleken de onderzoekingen van **WURTZ** te zijn, welke met behulp van melksuiker en lakmoes een differentiatie van verschillende kolonies door kleurtegenstellingen trachtte te verkrijgen. Op deze onderzoekingen voortbouwend gelukte het **DRIGALSKI** en **CONRADI** een voedingsbodem samen te stellen (lakmoes — melksuiker — kristalviolet — agar), welke het isoleeren van typhusbacillen bijzonder vergemakkelijkte. Typhusbacillen groeien op dezen bodem als blauwe doorzichtige kolonies. Colikolonies zijn rood gekleurd.

Een volgende belangrijke vondst was de Fuchsinagarplaat van **ENDO**. Hierop groeien typhuskolonies kleurloos, colibacillen rood, vaak met metaalglans.

Met behulp van deze betere diagnostische hulpmiddelen gelukte het nu bij vele patiënten typhusbacillen uit de faeces en de urine te isoleeren.

Niettegenstaande de tegenwoordige bacteriologische techniek voor de typhusdiagnostiek belangrijk beter georiënteerd is dan vroeger, zijn we echter nog steeds niet in staat de typhusbacillen zoo gemakkelijk te vinden als b.v. de cholera-vibrionen. Een van de oorzaken hiervan is het zeer onregelmatig verdeeld zijn van de typhusbacillen in de faeces, terwijl bovendien de hoeveelheid bacillen, welke uitgescheiden wordt, sterk kan wisselen. (Ook de buitengewone bewegelijkheid der cholera-vibrionen speelt een rol van beteekenis bij hun isolatie.)

Talrijke onderzoeken hebben nu aangetoond, dat typhusbacillen vooral in de 3de ziekte-week in grooten getale worden uitgescheiden. Echter worden ook in den incubatietijd en de eerste ziekte-week wel eens typhusbacillen gevonden. Sommigen meenen, dat bij een groot aantal, vooral ernstig verloopende, gevallen de uitscheiding der typhusbacillen in de faeces pas 6—8 weken na het koortsvrij worden begint.

De boven beschreven voedingsbodems hebben er ook veel toe bijgedragen ons inzicht in het bacillendragersvraagstuk te verbeteren.

Zoo werden door DRIGALSKI en CONRADI, in de omgeving van typhuspatiënten, bij twee gezonde personen, typhusbacillen in faeces en urine gevonden. Zij stelden ook vast, dat personen welke lang te voren, soms zelfs jaren, aan typhus hadden geleden, nog bacillen in de faeces of urine kunnen blijven uitscheiden. Naast de bacillendragers, welke dit geworden zijn na de ziekte te hebben doorgemaakt, neemt men aan, dat er ook bacillendragers zijn, welke de ziekte nooit gehad hebben. Door CONRADI worden deze laatsten „Nebenträger”, de eersten „Hauptträger” genoemd.

De uitscheiding van typhusbacillen door de urine begint meestal, nadat, tengevolge van de bacteriaemie, metastatische haardjes in nier of blaas ontstaan zijn. Dat de bacillen bij een bestaande bacteriaemie niet door de onbeschadigde nieren heenloopen, is op te maken uit het niet samenvallen van bacteriaemie en de uitscheiding in de urine. In de eerste ziekte-week, wanneer de bacteriaemie haar hoogtepunt bereikt, worden in de urine meestal nog geen typhusbacillen gevonden. Bacteriurie komt bij ongeveer  $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$  der typhusgevallen voor.

Het ophouden van de uitscheiding der typhusbacillen

hangt samen met het genezen der metastatische haarden. Meestal is dit in de 3de — 8ste ziekte-week het geval. Bacillendragers welke regelmatig of intermitterend typhusbacillen in de urine uitscheiden, lijden vaak aan chronische aandoeningen van de urinewegen zooals blaassteen, hydronephrosen, enz.

Het uitscheiden van bacillen door de urine alleen komt slechts bij ongeveer 7% der bacillendragers voor. Het gevaar voor besmetting der omgeving is bij dezen echter belangrijk grooter dan bij bacillendragers, welke alleen met de faeces bacillen uitscheiden. Meestal zijn bij de eersten de typhusbacillen in grooten getale aanwezig, zoodat het bacteriologisch opsporen van deze dragers niet veel moeite kost.

Voor de dragers, welke met de faeces bacillen uitscheiden, is vooral het veelvuldig voorkomen en de sterke vermeerdering van typhusbacillen in de galblaas van veel belang.

De uitkomsten van de onderzoekingen, welke op de bacteriologische afdeeling van het Centraal Laboratorium werden verkregen, zijn in verband met het tijdstip waarop bacillen in bloed, faeces of urine gevonden worden niet van belang ontbloomt. In de volgende tabellen zijn de positieve uitkomsten van het onderzoek van faeces-, urine- en bloedmonsters, in de jaren 1925 tot en met 1928 verkregen, samengebracht; tevens is de ziekteduur op het tijdstip van inzending in deze tabel opgenomen.

faecesonderzoek positief:

	345 typhus.	556 paratyphus.
ziekteduur:		
minder dan 1 week	59	94
1—2 weken	106	129
2—3 weken	11	29
3—4 weken	12	16
meer dan 10 weken	5	19
meer dan 1 jaar	2	2

(Van een groot gedeelte der ziektegevallen werd geen ziekteduur opgegeven.)

urineonderzoek positief:

	81 typhus.	86 paratyphus.
ziekteduur:		
minder dan 1 week	9	20
1—2 weken	18	17
2—3 weken	4	5
3—4 weken	4	1
meer dan 10 weken	1	
meer dan 1 jaar	1	

bloedonderzoek positief:

	450 typhus.	78 paratyphus.
ziekteduur:		
minder dan 1 week	163	35
1—2 weken	182	35
2—3 weken	23	2
3—4 weken	4	1

Zoowel bij het faeces- als het urineonderzoek werd een groot gedeelte van de positieve uitkomsten verkregen in de eerste twee weken der ziekte. Wat betreft het bloedonderzoek kan opgemerkt worden, dat zelfs in de 3de en 4de week van de ziekte nog typhus- en paratyphusbacillen uit het bloed gekweekt werden.

Naast het onderzoek van faeces, urine en bloed komt slechts zelden ander patiëntenmateriaal ter onderzoek op typhus- of paratyphusbacillen.

Een enkele maal zijn eens in het sputum van een bacillendragers typhusbacillen gevonden, maar dit behoort tot de groote uitzonderingen. Wel ziet men soms, dat in het begin van de ziekte een angina voorkomt, waarbij typhusbacillen uit de keel gekweekt kunnen worden. Ook zijn gevallen van meningitis typhosa beschreven.

Eveneens kunnen in etterige processen, periost of beendermerg, nog jaren na het doormaken van een typhusinfectie, typhusbacillen voorkomen. Van meer belang is het vinden van typhusbacillen in de roseolen geweest. In aansluiting aan deze vondst werd getracht de bacillen uit het bloed te kweeken. Dit gelukte het eerst aan CASTELLANI. Vele onderzoekingen hebben nu aangetoond, dat vooral in de eerste ziekteweek het vinden van de typhusbacillen in het bloed in een groot aantal

der ziektegevallen gelukt. In de 2de en 3de week neemt dit aantal weer af. In de eerste week is dus de bloedcultuur van het meeste belang, in de volgende weken is dit het faeces- en urineonderzoek.

Naast het onderzoek der bloed-, faeces- en urinemonsters op de aanwezigheid van typhus- of paratyphusbacillen is door GRUBER en WIDAL het serologisch typhusonderzoek ingevoerd. Zij vonden, dat het bloed van typhuspatiënten agglutininen bevatte voor typhusbacillen en voerden de agglutinatiereactie in de bacteriologische typhusdiagnostiek in. Deze reactie begint meestal tegen het einde van de eerste ziekte-week positief te worden. Soms is dit reeds na enkele dagen het geval.

Wegens de gemakkelijke wijze van uitvoering is de agglutinatiereactie volgens WIDAL snel ingeburgerd. Dit is ook een van de oorzaken geweest, dat de complementbindingsreactie op typhus nooit een bijzondere belangstelling heeft genoten; de uitvoering van deze reactie is veel tijdroovender dan de agglutinatieproef en eischt bovendien een groote ervaring. (Ook meende men, dat de agglutinatieproef volgens WIDAL aan alle te stellen eischen voldeed.)

Daar ik de door mij ingestelde onderzoekingen op de Bacteriologische Afdeling van het Centraal Laboratorium verrichte, en ik mijn resultaten met die, welke op deze afdeling werden verkregen, vergeleek, lijkt het mij gewenscht in 't kort uiteen te zetten, op welke wijze het onderzoek op typhus en paratyphus in deze afdeling geschiedt.

De artsen, welke materiaal ter onderzoek willen inzenden, ontvangen op hun verzoek een „receptaculum”, bevattende: één buisje gedeeltelijk gevuld met rundergal, één buisje om faeces in te doen, één buisje voor urine en één buisje voor bloed. Aan het buisje met rundergal wordt patiëntenbloed, aan het ziekbed afgenomen, toegevoegd. Het buisje met bloed dient voor het verrichten van de agglutinatieproef volgens WIDAL. De vier buisjes zijn verpakt in een z.g. „blok”, waarin voor ieder buisje een ruimte is, waardoor schudden of breken zoo goed als uitgesloten kan worden (niet altijd wordt van iedere patiënt bloed, faeces en urine ingezonden. Zeer vaak wordt bloed of faeces alleen gestuurd).

Bij het receptaculum is een vragenlijst gevoegd, welke hierbij is afgedrukt.

## VRAGENLIJST.

Ty. enz. N<sup>o</sup>. .....

N<sup>o</sup>. ..... afd. B.

Door den arts nauwkeurig en leesbaar in te vullen.	Vermoedelijke ziekte.					
	Naam van de(n) lijder(es) en voorletters.		Geslacht			
			M.			
			V.			
	Woon- of verblijfplaats.					
	Hoe lang ziek.					
	Aard van het materiaal.					
	Wanneer genomen.					
	Waarop te onderzoeken.					
	Is reeds eerder materiaal van dezen patient bij mij ingezonden, zoo ja wanneer, en hoe was de uitslag.					
Verdere mededeelingen die voor het onderzoek van belang kunnen zijn, aan ommezijde te vermelden, (Klinische en epidemiologische gegevens.)						
Naam van den arts .....						
Adres „ „ „ „ .....						
Uitslag van het onderzoek.	Ty-phus	Paraty. B.	X 19.	Prot. A 1.		
Bloed.						Den <u>arts</u> inspecteur bericht gezonden
Faeces.						
Urine.						
Agglutinatieproef.						

Door een bij voorkeur eenigszins uitvoerige beantwoording van deze vragenlijst komt het laboratorium dus op de hoogte van den leeftijd, ziekteduur en -geschiedenis van den patiënt, benevens van eenige klinische verschijnselen, enz., zoodat dus het contact met de kliniek niet geheel verloren wordt.

Bovendien kunnen de klinische gegevens aanleiding zijn om naast de gevraagde ook nog andere onderzoekingen in te stellen. Een voorbeeld hiervan is b.v. het regelmatig zoeken



naar infecties met den bacil van BANG bij van typhus verdachte personen.

Het ingezonden bloed wordt gecentrifugeerd. Met het serum wordt de agglutinatieproef volgens WIDAL gedaan. Het buisje met het bloed-in-galmengsel wordt 24 uur bij 37° C. geplaatst; vervolgens worden eenige oogjes van het mengsel opeen ENDO-plaat uitgestreken, welke na 24 uur wordt afgelezen. Is nu groei ontstaan, dan worden verdachte kolonies afgeënt op een nieuwe ENDO-plaat, en vervolgens na 24 uur met deze cultuur een agglutinatie met een zeker typhus- en een zeker paratyphusserum ingesteld. Bovendien wordt nog van de reïncultuur geënt in peptonoplossing, lakmoesmelkwei van SEITZ, neutraalrood van OLDEKOPP, glucose-, lactose-, maltose-, saccharose- en mannitolagar. Indien na 24 uur de agglutinatie en de „bonte rij” typhus of paratyphus aangeven, wordt de diagnose typhus of paratyphus als vaststaand beschouwd. Van het buisje met faeces wordt een kleine hoeveelheid in een ander buisje met physiologische zoutoplossing gebracht en fijngewreven. Hiervan wordt na eenige uren van de oppervlakte een druppel op een tweetal ENDO-platen uitgestreken, en een druppel in een MULLER-buisje gebracht. De ENDO-plaat wordt na  $\pm$  24 uur afgelezen. Van het MULLER-buisje wordt den volgenden dag, bij voorkeur na 20 uur, een druppel op een ENDO-plaat uitgestreken, welke weer  $\pm$  24 uur later wordt afgelezen.

Van het buisje met urine wordt een druppel op een ENDO-plaat uitgestreken, en een druppel in een MULLER-buisje gebracht. De verdere behandeling is dezelfde als bij het faecesonderzoek. Verdachte kolonies worden afgeënt en van de reïnculturen worden de eigenschappen en agglutinaties nagegaan. In de verschillende hoofdstukken wordt de techniek van het onderzoek, de samenstelling van de voedingsbodems, benevens de bereiding van de bacteriesuspensies voor de agglutinatieproef uitvoerig besproken.

## HOODSTUK II.

### DE BLOED-IN-GALCULTUUR.

De bloed-in-galcultuur is door CASTELLANI in de typhusdiagnostiek ingevoerd. Aanvankelijk voegde hij nog 10% pepton en 10% glycerine aan de rundergal toe.

De onderzoekingen van KAYSER wezen echter uit, dat gesteriliseerde rundergal, zonder meer, minstens even gunstig werkt. Het voordeel van de bloed-in-galcultuur boven andere voedingsbodems is, dat het bloed niet stolt, zoodat een regelmatige verdeling door de gal mogelijk is, terwijl de gal op e.v.t. aanwezige typhusbacillen niet bactericide inwerkt. Bovendien is de gal een zeer gunstige voedingsbodem voor typhus- en paratyphusbacillen gebleken.

In de eerste week van de ziekte is het mogelijk in meer dan 90% der gevallen de bacillen uit het bloed te kweken; vele onderzoekers geven zelfs cijfers, die tusschen de 94 en 100 liggen.

KAYSER vestigde er in 1915 voor het eerst de opmerkzaamheid op, dat er in dien tijd door verschillende onderzoekers veelvuldig voorkomende negatieve resultaten met de bloed-in-galculturen werden verkregen bij gevallen, waar zeker een positief resultaat verwacht had mogen worden. Kort te voren was de inenting tegen typhus in het leger ingevoerd en KAYSER meent, dat verband gelegd moet worden tusschen dit feit en de minder gunstige uitkomsten met de bloed-in-galculturen.

Bovendien stelde hij aan de hand van eigen onderzoekingen vast, dat de oorzaak ook gelegen kan zijn in een te kleine hoeveelheid afgenomen bloed.

Hij geeft daarom aan, dat het noodzakelijk is om ten minste  $2\frac{1}{2}$  cc bloed af te nemen en dit in 5 cc gal bij 37° te plaatsen. Voor 1915 vond KAYSER op deze wijze op vele honderden onderzoekingen slechts tweemaal eerst na 48 uur een positief resultaat, terwijl eenmaal een typhuscultuur pas na  $3 \times 24$  uur werd geïsoleerd. Toen waren de positieve uitkomsten, die pas na den eersten dag werden verkregen, dus een vrij groote zeldzaamheid.

In 1918, te velde zijnde, kon KAYSER een groot aantal

onderzoekingen verrichten bij militairen die allen tegen typhus en paratyphus waren ingeënt.

Van 50 door hem verkregen positieve typhusuitkomsten werden 68% na 1—3 dagen gevonden; de overige 32% eerst na 4—7 dagen. Slechts 20% was na 24 uur reeds positief.

KAYSER meent hiermede een steun te hebben geleverd voor de theorie, dat de oorzaak van den langzamen groei der typhus- en paratyphusbacillen in de bloed-in-galbusjes gezocht moet worden in de inenting tegen typhus en paratyphus bij militairen. Verder wijst hij er op, dat de typhusbacillen in hun groei meer geremd blijken te worden dan de paratyphusbacillen. Hij besluit met de stelling, dat, zijns inziens, het onderzoek der bloed-in-galmonsters tot 7 dagen moet worden uitgebreid.

Vrijwel eensluidende uitkomsten vond SEELIGER in 1918.

Tegenover de meening van KAYSER staat die van LEDINGHAM.

LEDINGHAM vond, dat van 139 culturen uit bloed gekweekt, er 78 afkomstig waren van tegen typhus en paratyphus ingeënte personen, wat 56.1% beteekent. De overigen waren van niet ingeënte personen. Dit zegt echter weinig, daar LEDINGHAM niet zegt op hoeveel ingeënte en niet ingeënte personen deze resultaten betrekking hebben.

Zijn woorden: „there would therefore appear to be no justification for the assumption that in a mixed group of inoculated and uninoculated men, it is the latter which are most likely to yield positive blood cultures” zijn dan ook niet geheel zonder kritiek te aanvaarden.

HAGE ging in 1924 dit vraagstuk nog eens uitvoerig na. Hij breidde den onderzoekingsduur uit tot 18 dagen. De resultaten van zijn onderzoekingen aangaande de positieve typhusuitkomsten zijn in de volgende tabel weergegeven:

aantal positieve gevallen	ziekte week	na 24 uur positief.	na 48 uur positief.	na 3-18 dagen positief.
23	I	15	3	5
32	II	16	8	8
23	III	8	5	10
9	IV	4	4	1

Geen van deze patiënten was ingeënt tegen typhus. Van de positieve uitkomsten later dan na  $2 \times 24$  uur verkregen, waren er 2 eerst na 18 dagen, één na 15, twee na 14, één na 13,

één na 12, tien na 10, twee na 9, twee na 8, één na 7, één na 5 en één na 3 dagen positief.

Ook blijkt uit de tabel, dat in de 2de en 3de ziekte-week een langere bebroeding meer kans op succes geeft dan in de eerste ziekte-week. Aangaande de paratyphus B.-onderzoekingen noemt HAGE slechts enkele cijfers, daar het aantal onderzoekingen hier klein was. Ook hier vond hij echter na den eersten dag nog positieve uitkomsten (eenmaal zelfs nog na 8 dagen).

Het groot aantal positieve uitkomsten, dat HAGE na  $2 \times 24$  uur en nog later verkreeg, moet, mijns inziens, wel gedeeltelijk verklaard worden door het feit, dat het hem toegezonden materiaal in een deel der gevallen uit een wattenprop met bloed bestond.

Door uitdroging kon hier een belangrijk deel der bacillen dood gegaan zijn.

De invloed van de hoogte der agglutinatie volgens WIDAL, op den tijd, die verloopt, alvorens een cultuur verkregen wordt, is ook door HAGE nagegaan.

De volgende tabel geeft een overzicht van zijn resultaten.

WIDAL	b.i.g. na 24 uur. +	b.i.g. na 48 uur. +	b.i.g. later. +
negatief	7	3	5
I : 50 +	6	—	2
I : 100 +	4	2	4
I : 200 +	18	5	5
I : 300 +	I	—	—
I : 400 +	II	6	5
I : 800 +	I	—	—
I : 1000 +	—	—	I
I : 1600 +	—	I	—

Wij zien hieruit, dat de negatieve of zwak-positieve sera geen belangrijke verschillen geven met de sterker positieve sera. Uit de sterkte der WIDAL-reactie is dus volgens HAGE vooruit niets af te leiden in verband met den tijd, die noodig is om een cultuur uit het bloed te kweken.

Al deze mededeelingen gaven BIJL en VAN DER HOEDEN aanleiding, om in 1927 gedurende eenigen tijd de bloed-in-gal-culturen na één of meer dagen nogmaals uit te strijken.

Het resultaat vatten zij als volgt samen: „hierdoor kregen wij evenwel niet meer positieve uitkomsten. Ook is nagegaan of verkleinen van den bloedkoek, door stuk knippen, andere resultaten oplevert dan het verwerken van den geheelen

bloedkoek. Verschillen werden echter niet gevonden. Ten slotte werd bij een kleine reeks onderzoekingen, waar de arts bloed-in-gal had toegezonden, ter vergelijking, tevens de bloedkoek uit het voor de „WIDAL” bestemde buisje door ons in gal gebracht. Nooit werden uit deze laatste typhusbacillen gekweekt, die niet ook in de door den arts toegezonden galcultuur waren gevonden. Het tegendeel kwam wel voor”.

Deze resultaten gaven bovengenoemden onderzoekers geen aanleiding verandering te brengen in de tot nu toe gevolgde werkwijze, om slechts éénmaal, en wel na 24 uur, het bloed-in-galmengsel uit te strijken.

In 1930 verscheen in het Zentralblatt een artikel over dit onderwerp van HORST HABS. Daar zijn onderzoekingen zich over een termijn van 7—8 jaren uitstrekken, heeft hij een groote hoeveelheid materiaal onderzocht, waardoor de waarde van zijn getallen zooveel grooter wordt.

Het grootste deel der bloed-in-galculturen werd door hem gemaakt van den bloedkoek van het ingezonden bloed. Slechts in enkele gevallen was het bloed aan het ziekbed in gal opgevangen. De bloed-in-galmengsels werden, na 24, 2 × 24 en 5 × 24 uur in de broedstof bij 37° te hebben gestaan, op een ENDO-plaat uitgestreken. Deze werd na 24 uur afgelezen.

In de periode van onderzoek (1921—1928) werden door HABS 174 positieve typhusuitkomsten verkregen en wel:

106 na	24 uur	(61%)
50 na	2 × 24 uur	(29%)
18 na	5 × 24 uur	(10%)

47 maal werden door HABS paratyphus B bacillen gevonden, waarvan:

20 na	24 uur	(43%)
21 na	2 × 24 uur	(44%)
6 na	5 × 24 uur	(13%)

In het totaal gelukte het hem, met inbegrip van positieve paratyphus A-, dysenterie- en enteritisuitkomsten, 227 maal bacillen uit de bloed-in-galmengsels te kweken. Deze uitkomsten werden als volgt verkregen:

128 na	24 uur	(56%)
74 na	2 × 24 uur	(33%)
25 na	5 × 24 uur	(11%)

HABS vond dus, dat na 2 × 24 uur evenveel paratyphus-culturen werden verkregen als na de eerste 24 uur; bij het

typhusmateriaal was dit slechts de helft. De vermeerdering der paratyphusbacillen ging dus langzamer dan die der typhusbacillen.

KAYSER kreeg juist den indruk, dat het omgekeerde het geval was.

Wanneer we nu de door de bovengenoemde onderzoekers opgeworpen veronderstellingen en verklaringen in verband met het vaak na meer dan een dag positief worden van de bloed-in-galculturen overzien, kunnen we hiervan de volgende samenvatting geven:

- 1e. De invloed van het al of niet tegen typhus en paratyphus ingeënt zijn van de patiënten is waarschijnlijk van geringe beteekenis. (HAGE, LEDINGHAM.)
- 2e. De hoogte der agglutinatie volgens WIDAL is niet van invloed op het tijdstip, waarop bacillen uit het bloed gekweekt worden.
- 3e. De gebruikte hoeveelheid bloed bij het maken van de bloed-in-galbuizen is van invloed op het resultaat. (KAYSER.)
- 4e. De ziekte-week, waarin het bloed afgenomen wordt, is van invloed op het tijdstip, waarop een positief resultaat met de bloed-in-galmengsels verkregen wordt. (HAGE.)

#### EIGEN ONDERZOEK.

Naar aanleiding van de mededeeling van HORST HABS, wiens onderzoekingen, zooals vermeld, op een periode van onderzoek van 7—8 jaar betrekking hebben, leek het mij gewenscht, niettegenstaande de weinig hoopvolle uitkomsten door BIJL en VAN DER HOEDEN in het Centraal Laboratorium in 1927 verkregen, nogmaals een dergelijk onderzoek in te stellen. Ik breidde den tijd van onderzoek echter uit tot 7 dagen (zooals door KAYSER werd aangegeven).

Van alle bloed-in-galmengsels werden iedere 24 uur eenige druppels op een ENDO-plaat gebracht, welke dan 24 uur later werd afgelezen. De bloed-in-galmengsels waren gedeeltelijk aan het ziekbed van den patiënt, gedeeltelijk uit den bloedkoek op het laboratorium gemaakt.

In totaal werden op deze wijze 300 monsters onderzocht, zoodat ongeveer 2100 ENDO-platen werden uitgestreken en afgelezen.

Uit deze 300 bloed-in-galmonsters werd 48 maal een typhus-

of paratyphusbacil gekweekt. Deze 48 gevallen zijn in de volgende tabel (I) samengebracht. 41 maal werd een typhusbacil en 8 maal een paratyphusbacil gevonden. Na 24 uur waren reeds 32 positieve uitkomsten verkregen, n.l. 27 maal typhus en 5 maal paratyphus.

TABEL I.

No.	Geslacht.	Ouderdom	1e dag	2e dag	3e dag	4e dag	5e dag	6e dag	7e dag	Bloed in gal	Ziekte-duur
2447	vrouwl.	25 jaar	+T							gemaakt	?
2448	manl.	6 "	+T							gemaakt	?
2524	manl.	45 "	+T								2 weken
2549	manl.	22 "	+T							gemaakt	10 dagen
2599	manl.	23 "	+PT							gemaakt	?
2622	vrouwl.	15 "	+PT								6 weken
2634	manl.	29 "	+T								1 week
2715	manl.	13 "	+T								6 dagen
2724	manl.	8 "	+T								10 dagen
2728	manl.	11 "	+T							gemaakt	?
2764	vrouwl.	40 "		+T						gemaakt	?
2770	manl.	27 "	+T								10 dagen
2806	vrouwl.	20 "	+T							gemaakt	4 dagen
2817	manl.	23 "	+T								1 week
2775	vrouwl.	14 "							+T		?
2820	vrouwl.	2 "			+T					gemaakt	9 dagen
2839	vrouwl.	51 "	+T							gemaakt	6 dagen
2842	manl.	16 "	+T								1 week
2876	manl.	?	+T								?
2947	?	?	+T								10 dagen
2997	manl.	59 jaar	+T								10 dagen
3036	vrouwl.	46 "	+T								3 weken
3057	vrouwl.	?	+T								10 dagen
3065	manl.	7 jaar		+T						gemaakt	5 dagen
3075	manl.	19 "		+T						gemaakt	?
3088	?	?	+PT								14 dagen
3092	vrouwl.	7 jaar				+PT					12 dagen
3112	vrouwl.	26 "	+T								8 dagen
3128	manl.	25 "	+T								10 dagen
3146	manl.	?				+T					10 dagen
3147	manl.	18 jaar			+T					gemaakt	6 dagen
3199	vrouwl.	22 "	+T								4 dagen
3205	vrouwl.	36 "	+T								2 dagen
3211	vrouwl.	18 "	+PT								14 dagen
3265	?	?				+T					2 weken
3266	?	?		+T						gemaakt	?
3269	vrouwl.	20 jaar	+T								10 dagen
3287	manl.	32 "	+T								2 weken
3309	vrouwl.	7 "				+T					14 dagen
3311	manl.	49 "	+T								6 dagen
3363	vrouwl.	25 "	+T							gemaakt	5 dagen
3380	vrouwl.	52 "		+PT						gemaakt	1 week
3382	manl.	26 "		+T							14 dagen
3421	vrouwl.	40 "		+T						gemaakt	3 dagen
3452	manl.	32 "		+T							3 weken
3463	manl.	21 "	+T								2 dagen
3496	manl.	60 "		+T							10 dagen
3521	manl.	15 "	+PT								?

Na  $2 \times 24$  uur werden nog 8 maal typhusbacillen en 1 maal paratyphusbacillen gevonden;

na  $3 \times 24$  uur werden  $2 \times$  typhusbacillen en  $0 \times$  paratyphusbacillen gevonden;

na  $4 \times 24$  uur werden  $3 \times$  typhusbacillen en  $1 \times$  paratyphusbacillen gevonden;

na  $7 \times 24$  uur werden  $1 \times$  typhusbacillen gevonden.

Het 7 dagen lang in de broedstoof laten bleek geen overdadig lange tijd te zijn, gezien de positieve typhusuitkomst op den 7en dag.

Bezien we nu de uitslagen, welke pas na  $2 \times 24$  uur en later positief zijn geworden, dan valt hierover het volgende op te merken:

8 maal was het bloed-in-galmengsel pas op het laboratorium met behulp van den bloedkoek, welke overbleef in het buisje, dat het serum bevatte voor de agglutinatieproef, gemaakt;

8 maal was het bloed-in-galmengsel aan het ziekbed gemaakt.

Van de op het laboratorium gemaakte bloed-in-galmengsels was de bloedkoek 5 maal zeer klein of klein: dit waren de gevallen: 2820, 3065, 3075, 3421 en 3266.

Hieruit zou dus de gevolgtrekking te maken zijn, dat zoowel bij het op het laboratorium als aan het ziekbed gemaakte bloed-in-galmengsel typhus- of paratyphusbacillen ook na  $2 \times 24$  uur en later kunnen worden gekweekt. Bovendien schijnt de meening van KAYSER bevestigd te worden, dat een geringe hoeveelheid bloed de mogelijkheid opent van een later positief worden der cultuur.

Aangaande de hoogte der agglutinatie (welke met gedoode bacillen werd verricht) valt op te merken, dat deze zeer vaak  $1/250$  of  $1/500$  bedroeg. Slechts  $2 \times$  was ze  $1/50$  en  $2 \times$   $1/100$ . Eenmaal zelfs (in voortgezette verdunningen)  $1/12800$  typhus. Dit was geval 3146. Het bloed-in-galmengsel was aan het ziekbed gemaakt. Hier werden eerst na  $4 \times 24$  uur typhusbacillen gevonden. Bij geen van deze 16 gevallen was de agglutinatieproef negatief. Vooral het geval 3146 kan mijns inziens een aanwijzing zijn, dat een hooge agglutinatie-titer van invloed kan zijn op het tijdstip van positief worden der bloed-in-galcultuur.

De tijd, dat de patiënt ziek was, wisselde in 12 gevallen van 3 dagen tot 3 weken. (In 4 gevallen werd hierover geen



mededeeling gedaan.) Hierbij moet in het oog gehouden worden, dat deze opgaven waarschijnlijk niet altijd even juist zullen zijn.

Hieruit zou dan te concluderen zijn, dat ook wanneer de patiënt nog maar betrekkelijk kort ziek is, een vertraging in den groei van de typhusbacillen in de bloed-in-galcultuur mogelijk is. (3065, 3421 en 3147)

In de 3 bovengenoemde gevallen was echter de bloed-in-galcultuur pas op het laboratorium gemaakt, zoodat dit het maken van een gevolgtrekking bemoeilijkte. Bovendien was in 2 van de 3 gevallen de bloedkoek zeer klein. Ik meen dan ook uit deze 3 gevallen niet te kunnen afleiden, dat een vertraagde groei ook in de eerste ziekteweek, als de agglutinatie nog betrekkelijk laag is, kan voorkomen. Aangaande den invloed van een eventueele vaccinatie op het tijdstip, waarop typhusbacillen uit het bloed gekweekt kunnen worden, kon ik geen materiaal verzamelen. Dit zal in Nederland wel onmogelijk zijn, daar slechts een zeer klein deel der bevolking vroeger tegen typhus en paratyphus ingeënt is. Hierdoor verkeeren wij, indien een invloed van de vaccinatie op het vinden van de typhus- en paratyphusbacillen mocht bestaan, dus in een gunstiger positie dan vele andere landen.

#### SAMENVATTING.

Bij 300 bloed-in-galmengsels werd nagegaan of een verlenging van den kweekduur het aantal positieve uitkomsten doet stijgen. Dit bleek inderdaad het geval te zijn. Na 24 uur werden 32 positieve uitkomsten vastgesteld. Na 7 dagen was dit gestegen tot 48, hetgeen dus een vermeerdering van 50% beteekent. Eveneens werden eenige aanwijzingen verkregen, dat de hoeveelheid bloed, welke afgenomen wordt voor het bloed-in-galmengsel, van invloed kan zijn op het tijdstip, waarop een cultuur verkregen wordt.

De andere uitkomsten, welke BIJL en VAN DER HOEDEN bij een langeren kweekduur verkregen, zijn gedeeltelijk te verklaren door het feit, dat zij slechts gedurende  $2 \times 24$  uur het onderzoek voortzetten. Mogelijk is ook het jaargetijde, waarin de onderzoekingen verricht werden, van invloed geweest.

## HOOFDSTUK III.

### DE AGGLUTINATIEPROEF VOLGENS WIDAL.

De agglutinatieproef volgens WIDAL wordt, volgens de opgave van de meeste onderzoekers, den 7den—10den dag van de ziekte positief. Een enkele maal komt het eens voor, dat de agglutinatie reeds een van de eerste dagen positief wordt, maar dit is slechts zelden het geval. (Hierbij moet men in aanmerking nemen, dat het begin der ziekte niet altijd even gemakkelijk is vast te stellen.) Het percentage positieve uitkomsten, dat met de agglutinatieproef aan het eind der eerste ziekteweek wordt verkregen, is, volgens OSTER, die 444 bloedonderzoekingen bij typhuspatiënten verrichtte, 54,2. Dit percentage stijgt in de 2de en 3de week nog wel, maar toch is het zeker, dat er typhus- en paratyphusgevallen voorkomen, waar de agglutinatieproef steeds negatief blijft, terwijl bacillen uit bloed, faeces of urine gekweekt worden. PIJPER vindt maar in ongeveer 60% der typhusgevallen een positieve WIDAL. HERDERSCHÉE vond, dat in de eerste ziekteweek 23% der ziektegevallen een negatieve WIDAL geven; in de 2de week is dit nog in 11% het geval. We dienen dus wel te bedenken, dat een negatieve WIDAL de mogelijkheid van typhus of paratyphus niet uitsluit. Een andere moeilijkheid wordt veroorzaakt door het verschijnsel, dat ook sera, afkomstig van personen, die, voor zoover bekend, nooit typhus of paratyphus doormaakten of tegen deze ziekte waren gevaccineerd, soms een alhoewel dan zelden hoge agglutinatie kunnen geven. De vraag rijst dan, waar de specifieke agglutinatie begint. Zeker is het, dat een agglutinatie bij een serumverdunding 1 : 10 niet, zooals WIDAL meende, als voldoende mag worden beschouwd om de diagnose typhus of paratyphus te stellen. In het algemeen wordt aangenomen, dat een duidelijke positieve reactie in een verdunding 1 : 50 als minimum eisch voor een positieve diagnose moet worden gesteld. Enkelen meenen zelfs, dat pas een agglutinatie in een serumverdunding van 1 : 100 hiervoor voldoende is. Vooral sinds de invoering van de immunisatie

tegen typhus en paratyphus, welke in den oorlog zoo'n groote vlucht nam, is de waarde van de agglutinatieproef volgens WIDAL, belangrijk gedaald. Het is n.m.l. gebleken, dat gevaccineerde personen soms nog jaren na de vaccinatie een vrij hooge agglutinatie-titer voor typhus- en paratyphus-bacillen kunnen hebben. HIRSCHBRUCH vond, dat 50% der gevaccineerden een agglutinatie geven bij een serumverduning van 1 : 100. Bovendien blijft de titergrens soms vrij hoog (6 of 8 maanden na de vaccinatie niet zelden gelegen bij 1 : 250 of 1 : 500).

HAGE vond bij 43 soldaten 2 jaar na de vaccinatie in 22 gevallen nog een positieve WIDAL; bij 44 andere soldaten nog 15. Verschillende onderzoekers zeggen dan ook, dat de agglutinatie volgens WIDAL, bij gevaccineerden geheel waarde-loos is en veilig achterwege gelaten kan worden. BARTHLEIN komt tot de slotsom: „eine positive WIDALSche Reaktion kann für sich allein die Typhusdiagnose nicht sichern. Nach vorausgegangener Schutzimpfung, sofern diese nicht schon mehrere Jahre zurück liegt und ein hoher Agglutinationstiter der Krankensera gefunden wird, ist ihr keine diagnostische Beweiskraft beizumessen". PIPPER zegt over de vaccinatie met typhus- en paratyphusbacillen in verband met de agglutinatie het volgende: „Typhoid infection in an inoculated person causes an increase in agglutination titre. This only happens in 53 percent of cases. Agglutination may be totally absent in inoculated persons, and if present and increasing during an attack of fever, it may be just coagglutination. Only a rather sudden increase in titre in such cases speaks for typhoid infection.”

Dat velen naar verdere volmaking van deze serumreactie zochten, is dus wel te begrijpen. Alvorens nu over te gaan tot een bespreking van verbeteringen, die in de agglutinatieproef van WIDAL kunnen worden aangebracht, is het noodzakelijk eenigszins uitvoerig het ontstaan van deze verbeteringen weer te geven. Ze berusten op de z.g. „qualitatieve receptoren analyse”, een begrip, dat door WEIL en FELIX in de bacteriologische diagnostiek is ingevoerd.

#### QUALITATIEVE RECEPTOREN ANALYSE.

Tijdens onderzoekingen over de serologische diagnose van vlektyphus (1916) vonden WEIL en FELIX, dat, terwijl

de proteus vulgaris X 19 en de Proteus vulgaris X 2 beiden geagglutineerd werden door het serum van een vlektyphuspatiënt of van een van deze ziekte herstellende, deze agglutinaties voor de proteus X 19 stammen in een veel hoogere verdunning nog optrad, dan voor de proteus X 2 stammen.

Het serum van konijnen, welke geïmmuniseerd waren met proteus X 19 of proteus X 2 stammen gaf echter geheel andere reacties. Deze sera agglutineerden de proteus X 19 en proteus X 2 stammen in gelijk hoge verdunningen. Bovendien werd nog een belangrijk verschil vastgesteld tusschen deze laatste en de eerste agglutinaties, n.m.l. de aard der vlokken: patiëntenserum gaf volgens WEIL en FELIX steeds een langzaam ontstaande fijnvlokkige agglutinatie; het konijnenserum gaf steeds een grofvlokkige snel ontstaande agglutinatie.

Bij het verdere onderzoek bleek nu, dat het patiëntenserum alléén proteus X stammen agglutineerde en dat geen gewone proteus vulgarisstam werd gevonden, welke ook met patiëntenserum een agglutinatie gaf. Het konijnenserum deed dit echter wel: dit agglutineerde dus zoowel proteus X- als een groot aantal saprophytische proteus vulgarisstammen. Dit verschil in werking van twee typen van sera (patiënt- en konijnenserum) was zoo opvallend, dat bovengenoemde onderzoekers hieruit de gevolgtrekking maakten, dat de in het bloed van vlektyphuspatiënten aangetoonde agglutinen niet opgewekt waren door de X stammen, daar dan een agglutinatie moest worden verkregen, welke overeenstemde met die van het immuun-serum van het konijn. Op grond hiervan twijfelden zij er dan ook aan of de proteus X 19 wel de verwekker van den vlektyphus is en niet als een begeleidende infectie moet worden beschouwd. In 1917 vonden WEIL en FELIX bij hun onderzoekingen over de antigenestructuur van de proteus X stammen, dat culturen van deze stammen op agarplaten twee groeiwijzen te zien geven. Het meerendeel der stammen groeide met uitzwerming; deze stammen noemden zij H (Hauch) stammen. Een klein gedeelte der stammen groeide zonder dat zelfs na eenige dagen teekenen van uitzwerming konden worden vastgesteld; deze stammen noemden zij O (Ohne Hauch) stammen. De O-stammen zijn niet beweeglijk en hebben geen flagellen, in tegenstelling met de H-stammen.

Wanneer nu met deze XO-stammen konijnen werden

geïmmuniseerd, werd een serum verkregen, dat alléén de X-stammen en dan fijnvlokkig agglutineerde. Geen gewone proteus vulgaris-stam werd door deze sera geagglutineerd.

Wanneer men echter konijnen immuniseerde met levende XH-stammen, werd een serum verkregen, dat zoowel Proteus X- als vele saprophytische proteusstammen agglutineerde. Deze agglutinaties waren steeds grofvlokkig. Verder bleek, zooals ook vroeger reeds gevonden was (1916), dat in vlektyphuspatiënten-serum alleen O-agglutinenen aanwezig zijn. In konijnen-immuunserum, bereid met X-stammen, waren echter bovendien nog H-agglutinenen aanwezig. Serologisch werd dus een groot verschil gevonden tusschen H- en O-stammen: immuun serum van de O-vorm (bereid met OX 19 of OX 2 stammen) bevat slechts één agglutinine, dat alleen met den homologen bacil een agglutinatie geeft en wel fijnvlokkig; immuunserum van de H-vorm (bereid met HX 19 of HX 2 stammen) bevat echter twee agglutinenen, een specifiek fijnvlokkend en een niet specifiek grofvlokkend; het eerste reageert slechts met den homologen stam, het laatste doet dit zoowel met homologe-, als heterologe stammen.

In het kort kan dus gezegd worden, dat de antigene structuur van de proteus XO-stammen bestaat uit slechts één receptor (O-receptor); die van de proteus XH-stammen uit twee receptoren (H- en O-receptor). Patiëntens serum is identiek met een immuunserum, bereid met OX 19 stammen; zij bevatten beiden slechts één agglutinine (het O-agglutinine). Bijna alle saprophytische proteusstammen hebben O- en H-receptoren. De H-receptoren zijn voor de geheele proteusgroep gelijk. De O receptoren zijn echter voor ieder genus specifiek. SACHS, FELIX en MITZENMACHER ontdekten echter in 1918, dat HX stammen, welke tot 80° C. verhit waren, zich geheel gedroegen als de O-vorm van deze stammen. Hieruit maakten zij de gevolgtrekking, dat tengevolge van deze verhitting de H-receptor verloren was gegaan, terwijl de O-receptor nog aanwezig was. De H-receptor is dus thermolabiel, de O-receptor thermostabiel. Aangezien de H receptor door verhitting vernietigd kan worden, wordt ook wel gesproken van den thermolabielen receptor, in tegenstelling met den O-receptor, welke de thermostabiele receptor is genoemd.

De agglutinenen, welke met den O-receptor agglutineeren, worden de O agglutinenen genoemd of de fijnvlokkende agglutinenen; die met den H-receptor agglutineeren worden de H- of grofvlokkende agglutinenen genoemd.

Het bleek nu aan WEIL en FELIX, dat de O-agglutinenen thermolabiel zijn. (Door vlektyphusserum 1 uur bij 56° te verhitten verdwijnen alle genus-specifieke agglutinenen: dat wil dus zeggen, alle agglutinenen, die met OX stammen agglutineeren.)

De H-agglutinenen zijn thermolabiel. Indien dus een proteusinfectie in het spel is, zal het patiëntenserum zoowel X 19 als proteus vulgaris grofvlokkig agglutineeren (door middel van den gemeenschappelijken H receptor). Zijn we bovendien in het bezit van den proteusstam, welke de infectie veroorzaakt, dan zal deze door het patiëntenserum zoowel grof- als fijnvlokkend worden geagglutineerd.

Het tot 56° verwarmde patiëntenserum agglutineert met dezen stam alléén grofvlokkend, daar dan de fijnvlokkende agglutinenen verdwenen zijn.

Tot 56° verwarmd vlektyphusserum (hetwelk alleen O agglutinenen bevat) agglutineert dus niet meer met een OX 19 stam.

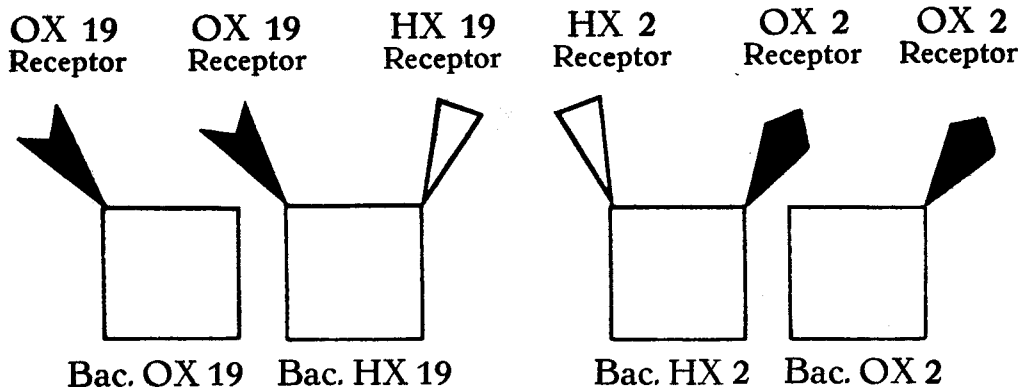
In het volgende schema (1) is weergegeven hoe men zich de antigene structuur van OX 19-, HX 19-, HX 2- en OX 2 stammen kan voorstellen.

De stammen OX 19 en OX 2 bezitten slechts één receptor, aangegeven als OX 19- en OX 2 receptor, welke niet gelijk zijn. Immunoserum, met deze stammen bereid, agglutineert dus nooit deze beide stammen tegelijk. Het OX 19 immunoserum agglutineert alleen den OX 19 stam, het OX 2 serum agglutineert alleen den OX 2 stam. De stammen HX 19 en HX 2 bezitten twee receptoren, n.m.l. de HX 19 stam : een OX 19- en een HX 19 receptor; de HX 2 stam: een OX 2- en een HX 2 receptor. Immunoserum met den HX 19 stam bereid, agglutineert den HX 19-, maar ook den HX 2 stam en bovendien den OX 19 stam. Immunoserum met den HX 2 stam bereid, agglutineert den HX 2 stam en den HX 19 stam, maar ook den OX 2 stam.

Uit het schema is duidelijk te zien, dat de groepspecifieke receptoren bij de OX 19- en OX 2 stammen niet aanwezig zijn.

# SCHEMA 1.

H. X19 Receptor = H. X2 Receptor



In aansluiting aan de onderzoekingen over het receptoren-apparaat van *Proteus X 19* en *Proteus vulgaris* stelden WEIL, FELIX en MITZENMACHER (1918) voor de typhus-, paratyphus- en enteritidisgroep eenzelfde schema op. Zij kwamen proefondervindelijk tot de volgende resultaten:

1e. In sera van konijnen, welke geïmmuniseerd waren tegen verschillende genera van de typhus-, paratyphus- en enteritidisgroep, zijn twee soorten van agglutinen aanwezig: fijn- en grofvlokkende.

2e. Elk organisme van deze groep heeft een antigene structuur welke,

a. uit labiele receptoren (H) bestaat, reagerende met de grofvlokkende agglutinenen.

b. uit stabiele receptoren (O) bestaat, reagerende met de fijnvlokkende agglutinenen.

3e. De labiele receptoren zijn specifiek voor ieder genus der groep.

4e. De stabiele receptoren zijn nog te verdeelen in:

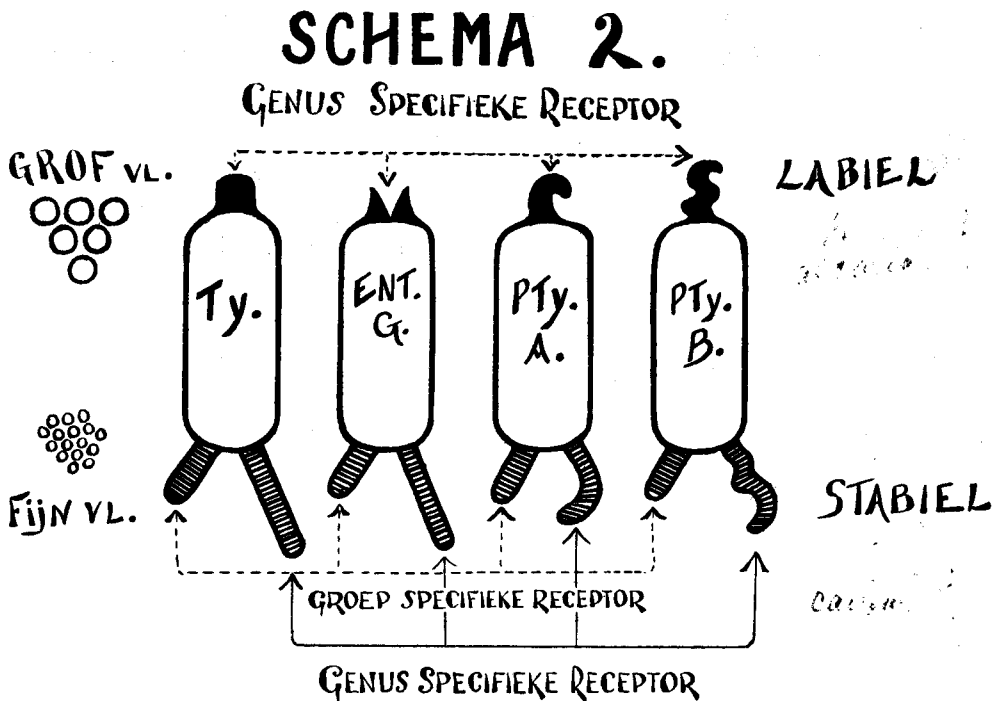
a. genusspecifieke receptoren,

b. groepspecifieke receptoren.

5e. Een genusspecifieke agglutinatie wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door de grofvlokkende agglutinenen, terwijl groepagglutinatie wordt veroorzaakt door het grootste deel der fijnvlokkende agglutinenen.

6e. De thermostabiele receptoren van het *Bact. typhosum* en het *Bact. enteritidis* GÄRTNER zijn identiek.

In schema gebracht kunnen deze punten op de volgende wijze worden weergegeven. (schema II)



Hierbij valt op te merken, dat bij de typhus-, paratyphus- en enteritidisgroep dus gedeeltelijk het omgekeerde werd vastgesteld als bij de proteusgroep. In de proteusgroep is juist de fijnvlokkige agglutinatie genusspecifiek; bij de typhusgroep is dit de grofvlokkige agglutinatie.

Het bleek nu verder, dat de H-receptoren te vernietigen zijn door alcohol. De O-receptoren worden hierdoor niet aangetast. Carbol en formaline vernietigen de O-receptoren.

De verschillen, welke tusschen de grof- en fijnvlokkige agglutinatie bestaan, zijn in de volgende punten samengevat:

- |   |   |
|---|---|
| <p>grovvlokkige agglutinatie:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1°. ontstaat snel,</li> <li>2°. zakt snel uit,</li> <li>3°. vlokken zijn van onregelmatige grootte,</li> <li>4°. veel sediment,</li> </ol> | <p>fijnvlokkige agglutinatie:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1°. ontstaat langzaam,</li> <li>2°. zakt langzaam uit,</li> <li>3°. kleine vlokken van gelijke grootte,</li> <li>4°. weinig sediment,</li> </ol> |
|---|---|



- 5°. sediment gemakkelijk van 5°. sediment zit vast aan den bodem op te wervelen, bodem gehecht,  
6°. bovenstaande vloeistof 6°. bovenstaande vloeistof vaak troebel. vaak helder.

Door OLITZKY, SCHIFF, STUART, KRIKORIAN, GARDNER e.a. werden deze hoogst belangrijke proeven van WEIL en FELIX bevestigd en aan de praktijk getoetst. Verder stelden FELIX en OLITZKY vast, dat de fijnvlokkende agglutinenen identiek zijn met de complementbindende antistoffen.

#### PRACTISCHE TOEPASSING VAN DE QUALITATIEVE RECEPTORENANALYSE.

Aanvankelijk werd de agglutinatieproef volgens WIDAL steeds met levende bacillen uitgevoerd; bij voorkeur werd dan meer dan een stam gesuspendeerd in physiologische zoutoplossing. Van deze suspensie werd een druppel gevoegd bij verschillende serumverduunningen; vervolgens werd de proef 2 uur bij 37° C. gezet en daarna bij kamertemperatuur tot den volgenden dag, waarna werd afgelezen. Bij sterk positieve uitkomsten is vaak na 2 uur reeds een duidelijke agglutinatie te zien.

Het werken met suspensies van levende typhus- en paratyphusbacillen in groote, en in mindere mate ook in kleine laboratoria, levert echter vooral bij groote drukte, wanneer snel gewerkt moet worden, gevaren op, welke niet onderschat mogen worden. Bovendien neemt het dagelijks overenten en controleeren der stammen veel tijd in beslag. Het gebruik van suspensies van levende bacillen is dan ook in de meeste laboratoria vervangen door dat van suspensies van gedooide bacillen.

Aanvankelijk meende men, dat hiermede gelijke resultaten werden verkregen als met suspensies van levende bacillen. Het bleek echter alras, dat de hoogte der agglutinatie vaak aanmerkelijk verschilde en dat zelfs wel met gedooide bacillen een negatieve uitkomst werd verkregen, terwijl die met levende bacillen duidelijk positief uitviel. In het algemeen worden de gedooide suspensies verkregen door toevoeging van formaline of carbol. Minder algemeen is het gebruik van een met toluol gesteriliseerde cultuur. (Het Ficker's reagens bevat 0,5 % phenol.)

Zooals door WEIL en FELIX werd aangetoond worden door

carbol of formaline echter de O-receptoren vernietigd of geremd. Dit verklaart dus de minder gunstige resultaten, welke met door carbol of phenol gedooide culturen werden verkregen. Het was dus begrijpelijk, dat gezocht werd naar een suspensie van gedooide typhus- of paratyphusbacillen, waarmede dezelfde resultaten konden worden verkregen als met levende bacillen. Daar het BIEN gebleken was, dat 30 % alcohol juist in staat was om de H-receptoren te vernietigen, werd door FELIX naast de „formaline” Ficker een „alcohol” Ficker bereid. Theoretisch moeten deze beide Fickers dus een uitkomst geven, welke overeenkomt met den uitslag der agglutinatie met levende bacillen. De uitkomsten, met deze beide Fickers verkregen, zijn echter waardevoller dan die met levende bacillen.

In de eerste plaats kan bij agglutinatie met levende bacillen een grof- en fijnvlokkige agglutinatie door elkaar tot stand komen, hetgeen praktisch niet af te lezen is. In de tweede plaats is door het agglutineeren met beide bovengenoemde diagnosticae de titergrens der H- en O-agglutininen afzonderlijk te bepalen.

Dit is om verschillende redenen van veel belang. Het bleek n.m.l. dat bij met T.A.B. gevaccineerden alleen grofvlokkige agglutininen ontstaan.

Door middel van een agglutinatie met een alcohol-Ficker en een formaline-Ficker is dus uit te maken of de patiënt ziek is aan „enteric fever” (de O-agglutininen zijn immers grootendeels groepspecifiek). Wordt alleen een grofvlokkige agglutinatie verkregen, dan is deze het gevolg van een vaccinatie. Alleen een fijnvlokkige agglutinatie is beslissend voor de diagnose „enteric fever”. Tengevolge van koorstige niet specifieke ziekten ontstaat een vermeerdering van H-agglutininen, echter nooit van O-agglutininen. Deze nemen alleen toe bij ziekten tengevolge van infecties met typhus-, paratyphus of enteritidis-GÄRTNER bacillen (STUART en KRICKORIAN, PIJPER en GARDNER).

Bovendien stelden FELIX e.a. vast, dat O-agglutininen afwezig kunnen zijn in zeer zware en zeer lichte gevallen. Hieruit zou dus ook prognostisch het belang van de reacties met een alcohol-Ficker kunnen blijken. FELIX zelf zegt hierover: (1924)

1<sup>o</sup>. Large flaking agglutinins, on the one hand, and

bacteriaemie and clinical course, on the other hand, show no regular relations whatever.

2<sup>o</sup>. Small flaking agglutinins, on the other hand, show the following close relationship between themselves and bacteriaemie and clinical course:

a. on the early appearance of small-flaking agglutinins, bacteriaemie is, employing the usual culture methods, either not observed at all, or shown to exist only for a short time and only with a low content of bacilli in the blood.

b. Fatally-ending cases, and cases of the greatest severity of typhoidfever develop none or very small quantities of small-flaking agglutinins at an early date;

c. lightest cases of typhoid produce largest quantities of small-flaking agglutinins at an early date.

3<sup>o</sup>. The seroprognosis in typhoidfever seems thereby to have become possible.

In 1926 vervolgt hij met OLITZKY zijn uitspraken, waarvan ik ook hier de samenvatting geef:

1<sup>o</sup>. Immune sera which contain only small-flaking agglutinins (O immune sera) possess a strong bactericidal power.

2<sup>o</sup>. Immune sera which contain small-flaking and large-flaking agglutinins do not develop a stronger bactericidal action than O immune sera with an equal content of small-flaking agglutinins; it is quite indifferent to the degree of bactericidal action whether largeflaking agglutinins even to the greatest amount, are present or not.

3<sup>o</sup>. Immune sera which contain large-flaking and small-flaking agglutinins loose entirely their bactericidal power by removing the small-flaking agglutinins (by absorption with 100<sup>o</sup> bacilli) in spite of the fact that the content of large-flaking agglutinins remains complete by unchanged.

4<sup>o</sup>. The conclusions with reference to seroprognosis, serumtherapie and preventive vaccination which FELIX drew from his investigation on typhoidpatients, obtain their experimental proof from the present investigations.

Praktische toepassing hebben de vondsten van FELIX en zijn medewerkers nog slechts weinig gevonden. Dit is te meer te betreuren, daar zijn proefnemingen met de meest mogelijke zorg zijn verricht en alle aanspraak op betrouwbaarheid mogen maken. In Nederland is door BIJL en VAN DER HOEDEN voor het eerst de kwalitatieve receptorenanalyse

toegepast. Voor het beoordeelen van de fijnvlokkige agglutinaties werden de door FELIX geïsoleerde stammen T 9 en T 901 gebruikt, welke een zeer gevoelig stabiel receptoren-apparaat zouden bezitten.

In een zestal gevallen werd een positieve uitslag met de agglutinatieproef verkegen met den stam T 901; vier van deze gevallen gaven ook met den stam T 9 een positieve agglutinaties; de agglutinaties met de formaline-Ficker van het Centraal Laboratorium waren in deze 6 gevallen negatief. In een geval werd ook met levende typhusbacillen, uit den cultuurenvorraad van het laboratorium afkomstig, geagglutineerd. Ook deze gaven een agglutinaties. Hieruit bleek nog weer eens, dat de agglutinatieproef met levende bacillen dus gevoeliger is dan met gedooide. Daarom hebben de proeven door BIJL en VAN DER HOEDEN gedaan, maar een zeer betrekkelijke waarde; zij vergeleken immers agglutinaties met levende bacillen (T 9 en T 901) met agglutinaties met gedooide bacillen (formaline-Ficker). De betere resultaten, welke zij met de levende bacillen verkregen, zeggen dus niets ten voordeele van de stammen T 9 en T 901.

#### EIGEN ONDERZOEK.

Zowel deze onderzoekingen als de laatste publicaties van GARDNER, STUART en KRİKORIAN en FELIX, leken mij van zooveel belang, dat ik de agglutinaties met een alcoholische suspensie van typhus- en paratyphusbacillen naast de in gebruik zijnde formaline Ficker op een aantal ter onderzoek ingezonden bloedmonsters ging toepassen. De eerste te overwinnen moeilijkheid bestond in het maken van een bruikbare alcoholische suspensie van typhus- en paratyphusbacillen.

De op de medische afdeling van het Centraal Laboratorium in gebruik zijnde formaline-FICKER wordt op de volgende wijze bereid:

Een tiental typhus- (of paratyphus) stammen, welke 24 uur oud zijn, worden ieder geënt in een kolfje bouillon van 100 cc. inhoud. Na 24 uur in de broedstoom te hebben gestaan, wordt de inhoud van alle kolven tezamen in een flesch gedaan, waaraan 1% formaline wordt toegevoegd. Nu wordt, nadat deze flesch 24 uur bij 37° C. heeft gestaan, een oogje

van den inhoud op een Endo-plaat uitgestreken. Na 24 uur wordt nagegaan, of al dan niet groei op de plaat is ontstaan. Is er groei ontstaan, dan wordt nogmaals een oogje uitgestreken. Meestal is na  $2 \times 24$  uur steriliteit verkregen. De formaline-Ficker is dan voor het gebruik gereed.

De agglutinaties worden verricht in serumverduunningen van 1 : 50, 1 : 100, 1 : 250 en 1 : 500; dit zoowel voor typhus als paratyphus B. Aan  $\frac{1}{2}$  cc. serumverduunning wordt  $\frac{1}{2}$  cc. Ficker toegevoegd. Na 2 uur bij  $37^0$  te hebben gestaan, wordt een voorloopige aflezing gedaan, na 20 uur de definitieve. Indien, zoowel voor typhus als paratyphus, agglutinatie in een serumverduunning van 1 : 500 te zien is, wordt opnieuw een agglutinatieproef verricht, maar nu ook met grootere serumverduunningen b.v. 1 : 50, 1 : 100; 1 : 200, 1 : 400, 1 : 800 enz. tot 1 : 25600; dit dient om na te gaan, of voor typhus dan wel voor paratyphus nog in deze hogere serumverduunningen een agglutinatie optreedt.

Naast de agglutinaties met een formaline-Ficker werden nu door mij agglutinaties met een alcohol-Ficker verricht. Om deze reacties zooveel mogelijk op dezelfde wijze te kunnen uitvoeren, werd getracht de alcohol-Ficker geheel op dezelfde wijze te bereiden als de formaline-Ficker; inplaats van formaline werd echter een hoeveelheid absolute alcohol toegevoegd, gelijk aan  $1/16$  deel van den inhoud van de flesch; hierdoor werd het percentage alcohol ongeveer 6%. Meer dan 6% alcohol mag de vloeistof niet bevatten, daar anders de concentratie der alcohol te hoog is bij de agglutinatieproef, waardoor het patiëntenserum in zijn werking zou kunnen worden geremd (GARDNER) en onjuiste uitkomsten zouden kunnen worden verkregen. Met dit percentage alcohol kon eerst na 4 tot 5 dagen sterilitet van de bouillonculturen worden verkregen. Het bleek nu, dat met de op deze wijze bereide alcohol-Ficker grof- en fijnvlokkige agglutinaties door elkaar ontstonden. De grofvlokkige receptoren waren dus door dit lage alcoholpercentage niet geheel buiten werking te stellen. Daarom werd nu door mij de alcohol-Ficker bereid op de wijze zooals GARDNER die aangeeft: aan 24 uur oude culturen van typhus- of paratyphusbacillen, op buisjes met schuine agar gekweekt, wordt 3—4 cc. physiologische zoutoplossing toegevoegd, nadat het condenswater eerst is weggezogen. In deze zoutoplossing worden de

bacillen gesuspendeerd. In het geheel werden 10 typhus- en 10 paratyphusstammen op deze wijze behandeld. (Met deze zelfde stammen werd ook de formaline-Ficker bereid.) De verkregen suspensies van typhusbacillen werden bij elkaar gevoegd en vervolgens de helft absolute alcohol toegevoegd. (op 35 cc. suspensie dus  $17\frac{1}{2}$  cc. alcohol). Hierdoor werd het percentage alcohol in het mengsel dus 33%. Hetzelfde werd gedaan met de suspensie van paratyphusbacillen. Na 24 uur bij  $37^{\circ}$  te hebben gestaan (in goed afgesloten kolven) waren deze suspensies steriel. Alvorens nu deze Ficker voor de agglutinatieproef te kunnen gebruiken moet telkens een hoeveelheid 5—6 maal verdund worden. Het percentage alcohol bedraagt dan ongeveer 6%. Dit werd steeds eenige oogenblikken voor het bijvullen der serumverduningen gedaan.

Met deze alcohol-Ficker werden alleen fijnvlokkige agglutinaties verkregen. De agglutinaties werden in dezelfde serumverduningen als met de formaline Ficker verricht. Na 2 uur bij  $37^{\circ}$  te hebben gestaan, werden ze bij kamertemperatuur geplaatst om na 20 uur afgelezen te worden. In den regel was na 2 uur geen agglutinatie te zien (de fijnvlokkige agglutinatie ontstaat langzaam). In het totaal werden op deze wijze 105 sera onderzocht. De positieve uitkomsten zijn in de volgende tabel (II) samengebracht. De gevallen, dat uit het bloed, de faeces of urine bacillen gekweekt werden, zijn ook in de tabel aangegeven.

We zien uit deze tabel, dat van de 105 onderzochte sera er 34 een positieve agglutinatie gaven met typhus- of paratyphusbacillen; 26 maal was zoowel de agglutinatie met de formaline-Ficker als die met de alcohol-Ficker voor typhus of paratyphus bij een serumverdunding van tenminste 1 : 100 positief. Hier gaven dus de beide reacties een eensluidende uitkomst.

Eenmaal (N<sup>o</sup>. 3863) was de agglutinatie met de formaline-Ficker 1 : 50 positief voor typhus en negatief voor paratyphus. De agglutinaties met de alcohol-Ficker waren echter negatief. Daar er geen faeces of urine was ingezonden, kon in dit geval het onderzoek van dit materiaal niet tot een betere waardeering van een van beide uitkomsten leiden. Deze persoon was niet ziek, maar kwam uit een milieu, waar typhus heerschte.

Bij geval 3908 was de agglutinatie met de formaline-

Ficker 1 : 100 positief voor typhus en negatief voor paratyphus; de alcohol-Ficker gaf voor typhus en paratyphus een negatieve uitkomst bij 1 : 50. Uit het bloed, de faeces en de urine werden geen bacillen gekweekt. Toch is dit geval met een agglutinatatie bij 1 : 100 als positief beschouwd, daar wij een duidelijke agglutinatatie bij 1 : 50 hiervoor reeds als voldoende aannemen.

TABEL II.

No.	Agglutinatatie met formaline-Ficker		Agglutinatatie met alcohol-Ficker		Bloed in gal	Faeces	Urine
	Typhus	Paratyph.	Typhus	Paratyph.			
3706	I : 500+	I : 500+	I : 50+	I : 500+	PT+		
	I : 3200+	I : 25600+					
3734	I : 50 zwak +	I : 50 zwak +	—	I : 250+	PT+		
3748	—	I : 500+	I : 50+	I : 500+			
3749	I : 500+	—	I : 500+	I : 100+	PT+		
3797	—	I : 250+	I : 250 zwak +	I : 500+			
3798	I : 250+	—	I : 500+	I : 250+	PT+		
3816	I : 50 +	I : 500+	I : 100+	I : 500+			
3847	I : 500+	I : 500+	I : 50	I : 500+	PT+		
	I : 1600+	I : 6400+	zwak +				
3863	I : 50+	—	—	—	PT+		
3866	—	I : 100+	—	I : 100+			
3813	—	—	I : 100+	I : 50+	T+	T+	
3894	I : 500+	I : 500+	I : 500+	—			
	I : 3200 zwak +	I : 12800+			T+		
3902	I : 250+	I : 250+	—	—			
3905	I : 500+	—	I : 500+	—	T+		
3906	I : 500+	—	I : 500+	I : 100+			
3908	I : 100+	—	—	—	T+		
3959	I : 500+	I : 100+	I : 500+	I : 250+			
3967	I : 50+	—	—	—	T+		
3968	—	I : 100+	—	I : 100+			
4036	—	I : 250+	—	I : 500+	T+		
4027	I : 100+	—	I : 100+	—			
4026	I : 500+	I : 50+	I : 500+	I : 100+	T+		
4002	I : 500+	—	I : 500+	I : 50+			
3993	I : 50+	I : 50+	—	—	T+		
3991	I : 50+	—	I : 250+	—			
3989	I : 500+	—	I : 500+	I : 100+	T+		
3985	I : 500+	—	I : 500+	I : 250 zwak +			
3980	I : 500+	I : 50+	I : 500+	—	T+		
3979	—	I : 100+	—	I : 100+			
3975	I : 500+	I : 100+	I : 500+	I : 250+	T+	T+	
1	I : 500+	—	I : 500+	I : 100+			
6	I : 500+	I : 500+	I : 50	I : 500+	T+		
	I : 6400+	I : 25600+	zwak +				
7	—	I : 250+	—	I : 250+	T+		
29	I : 500+	—	I : 500+	I : 100+			

Geval 3967 gaf voor typhus alleen met de formaline-Ficker een positieve uitkomst (1 : 50). Ander materiaal was van dit geval niet ingezonden. N<sup>o</sup>. 3993 gaf voor typhus en paratyphus met de formaline-Ficker een agglutinatie bij 1:50; de alcohol-Ficker gaf negatieve uitkomsten. Uit bloed, faeces en urine werden geen typhus- of paratyphusbacillen gekweekt. In dit geval zou men misschien geneigd zijn den uitslag met de alcohol-Ficker voor het betrouwbaarst aan te zien.

Geval 3813 gaf juist met de alcohol-Ficker positieve uitkomsten voor typhus en paratyphus. Het onderzoek van faeces en urine leverde niets op. Van belang was de uitkomst van de agglutinatieproef bij geval 3902. Deze patiënt was jaren in Indië geweest en meermalen tegen typhus en paratyphus gevaccineerd. De agglutinaties met de formaline-Ficker waren voor typhus en paratyphus 1 : 250 positief. Met de alcohol-Ficker was alles negatief. Ook het onderzoek van het bloed, de faeces en de urine viel negatief uit. Er waren klinisch slechts zeer weinig aanknoopingspunten voor typhus (grote lever, icterus; de huisarts dacht aan levercirrhose). Hier is dus waarschijnlijk de vroegere vaccinatie de oorzaak van de positieve uitkomst met de formaline-Ficker. De alcohol-Ficker gaf in overeenstemming met de beweringen van FELIX, bij den gevaccineerde geen agglutinatie. Bij geval 3991 was de agglutinatie voor typhus met de formaline-Ficker 1 : 50 +; met de alcohol-Ficker 1 : 250 +. Hieruit is dus eenige bevestiging te vinden voor de stelling dat de complementbindende antistoffen (fijnvlokkende agglutinenen) vlugger ontstaan, dan de grofvlokkende agglutinenen.

Belangrijk was ook de uitslag van het onderzoek bij geval 3734. De agglutinatieproef met de formaline-Ficker was hier voor typhus en paratyphus 1 : 50 zwak positief. Met de alcohol-Ficker 1 : 250 positief voor paratyphus. Uit het bloed werden paratyphusbacillen gekweekt. Hier was de uitslag met de alcohol-Ficker van meer waarde dan met de formaline-Ficker.

Ook geval 3894 was iemand, die gevaccineerd was (wegens een tweetal gevallen, die in zijn onmiddellijke omgeving waren voorgekomen). De agglutinaties waren voor typhus en paratyphus den eersten dag 1 : 500 positief met de formaline-Ficker. Met de alcohol-Ficker alleen voor



typhus (1 : 500 +). Den volgenden dag was de doorgezette agglutinatie (met de formaline-Ficker) 1 : 3200 zwak + voor typhus en 1 : 12800 + voor paratyphus. Hieruit zou men dus de gevolgtrekking maken, dat dit een paratyphusgeval betrof. Uit de faeces en urine werden echter typhusbacillen gekweekt. De agglutinatie met de alcohol-Ficker was dus het betrouwbaarst.

Nog driemaal (N<sup>o</sup>. 3706, 3847 en 6) gebeurde het, dat den eersten dag de agglutinaties voor typhus en paratyphus met de formaline-Ficker beiden 1 : 500 positief waren. Den volgenden dag bleek de doorgezette agglutinatie in deze drie gevallen steeds het verst te gaan voor de ziekte, welke de alcohol-Ficker den eersten dag reeds met beslistheid had aangewezen.

Dit waren dus niet te miskennen voordeelen, welke alleen met behulp van de alcohol-Ficker werden verkregen.

Ik meen dan ook te mogen zeggen, dat de proefnemingen, welke door mij met een alcohol-Ficker werden verricht, alleszins bevredigende resultaten hebben opgeleverd.

**SAMENVATTING.** Bij 105 sera, afkomstig van van typhus verdachte personen, werd de agglutinatieproef volgens WIDAL met een formaline- en een alcohol-Ficker verricht. In ongeveer 80 % der 34 positieve gevallen werden eensluidende uitkomsten verkregen. Vier maal werd met de alcohol-Ficker een resultaat verkregen, dat meer waarde had dan dat met de formaline-Ficker; eenmaal was het omgekeerde het geval.

Vooraf in gevallen van ziekte na vaccinatie moet aan de agglutinatie met een alcohol-Ficker een groote waarde worden toegekend.

## HOOFDSTUK IV. DE COMPLEMENTBINDING OP TYPHUS EN PARATYPHUS.

De complementbinding op typhus is niet een reactie, die, gelijk de agglutinatieproef van WIDAL, in enkele minuten is ingesteld. Dezelfde moeilijkheden als bij de reactie volgens WASSERMANN doen zich hier voor. We kunnen dus zeer goed begrijpen, dat de complementbinding op typhus, zoolang men meende, dat de reactie van WIDAL, nog in alle opzichten voldeed, slechts zelden werd toegepast.

Het eerst werd zij uitgevoerd door BORDET en GENGOU in 1901. Sera van cavia's, welke met typhusbacillen waren ingespoten, gaven na eenige dagen een positieve complementbinding. Eenzelfde resultaat bereikten zij met serum van eenige typhuspatiënten. Contrôleproeven met sera van gezonde personen vielen steeds negatief uit.

Algemeene navolging vonden deze onderzoekingen echter niet. WIDAL en LE SOURD verrichtten in 1901 de complementbinding op typhus bij 61 sera, afkomstig van patiënten of herstellenden. Zij verkregen 58 maal een positieve uitkomst.

ZLATOGOROFF (1909) onderzocht 41 typhusgevallen met behulp van de complementbindingsreactie. Slechts éénmaal viel de reactie negatief uit. Zoowel WIDAL en LE SOURD als ZLATOGOROFF vonden dus een hoog percentage positieve resultaten bij zekere ziektegevallen. Dit is van belang, omdat dit juist een van de redenen is waarom tegenwoordig de waarde van de complementbindingsreactie op typhus weer naar voren wordt gebracht.

Bovendien zegt ZLATOGOROFF, dat hij eenige malen vaststelde, dat de complementbindingsreactie reeds in de eerste week der ziekte duidelijk positief uitviel, terwijl toen agglutininen nog niet konden worden aangetoond. Ook dit is een mededeeling, die tegenwoordig herhaalde malen is bevestigd en waarvan de waarde hoe langer hoe meer wordt ingezien.

Tijdens de reconvalescentie vond ZLATOGOROFF de complementbindingsreactie weer vrij snel negatief worden. Contrôleproeven, verricht met sera van 20 gezonde personen, vielen alle negatief uit.

Ook ZUPNIK en SPÄT (1908) meenden, dat de complementbinding vroeger positief uitvalt dan de agglutinatieproef. Van 18 typhusgevallen was 11 × de complementbindingsreactie positief. Zij zeggen echter de agglutinatieproef volgens WIDAL, te moeten verkiezen boven de complementbindingsproef, alhoewel de laatste in enkele gevallen (met korteren ziekteduur) voordeelen biedt.

LEUCHS en SCHÖNE (1908) onderzochten het serum van 21 typhuspatiënten meerdere malen. Zij stelden op overtuigende wijze vast, dat de complementbindingsproef positief kan uitvallen op een tijdstip, waarop de agglutinatieproef dat vrijwel nooit doet. Zij komen tot de slotsom, dat de complementbindingsreactie op typhus een voor de diagnostiek zeer bruikbare methode van onderzoek is, welke in hooge mate specifiek is, maar echter door zijn veelvuldige negatieve uitkomsten bij de agglutinatieproef ten achter staat.

HAGE en KORFF PETERSEN (1915) maken uit hun onderzoekingen de gevolgtrekking, dat een scherpe scheiding tusschen typhuslijders en gevaccineerden niet met de complementbindingsreactie mogelijk is. Zij vonden, dat het serum van tegen typhus gevaccineerden tot 4 maanden na de vaccinatie en soms nog langer, een positieve complementbindingsreactie geeft. Deze meening is echter door FÜRST (1916) sterk bestreden. De onderzoekingen, door FÜRST ingesteld met waterige extracten van typhusbacillen, geven juist aan, dat een scherpe scheiding tusschen zieken en gevaccineerden zeer goed mogelijk is.

GARBAT (1915) onderzocht het bloed van gevaccineerden op verschillende tijdstippen na de vaccinatie. Na een jaar werden nog met de agglutinatieproef positieve uitslagen in verdunningen van 1/200 tot 1/4000 verkregen.

De complementbindingsreactie was echter na 3 maanden bij alle gevaccineerden negatief. Hij raadt dan ook bij het typhusonderzoek van gevaccineerden de complementbinding sterk aan.

HADJOPoulos (1922) ging nog eens grondig de waarde van de bloedcultuur, de agglutinatieproef en de complementbindingsreactie in de verschillende weken van de ziekte na. Gedurende de eerste week werden in 94% der ziektegevallen bacillen uit het bloed gekweekt. De complementbinding

was in 68% der gevallen positief, de agglutinatie in 50%.

In de 2de week der ziekte gaven 75% der gevallen een positieve complementbinding tegen 50% een positieve agglutinatie.

In de 3de en 4de week was de complementbinding resp. in 92 en 100% der gevallen positief. De agglutinatie in 60 en 88%. Overzichtelijk weergegeven in de volgende tabel blijkt duidelijk, dat de complementbinding de meerdere is in de 4 eerste weken der ziekte.

Ziekteweek	Complementbinding positief.	Agglutinatie positief.
1	68	50
2	75	50
3	92	60
4	100	88

SINGER (1924) is het met WEIL eens, dat de fijnvlokkige agglutinenen identiek zijn met de complementbindende antistoffen. Het eerder positief worden van de complementbinding trekt hij echter in twijfel. Hij meent, dat serum — of antigeenremming hier de oorzaak van het positief worden is. Mogelijk ook wordt een zwakke agglutinatie over het hoofd gezien. Deze veronderstellingen lijken wel wat erg gezocht, gezien het feit, dat verschillende onderzoekers dit vroeger positief worden der complementbindingsreactie vaststelden. Bovendien mag verwacht worden, dat bij het uitvoeren van dergelijke reacties contrôlebuisjes op antigeen- en serumwerking aanwezig zijn.

Ook zal het misschien eens voorkomen, dat een zwakke agglutinatie over het hoofd wordt gezien, maar dit zal toch wel geen regel zijn.

Praktische resultaten, die op een bevestiging van zijn veronderstelling wijzen, brengt SINGER echter niet.

Bovendien zag hij steeds, dat ook met een suspensie van *Bact. enteritidis* GÄRTNER als antigeen, een positieve complementbinding in typhusgevallen wordt verkregen.

Daarom sluit hij met de woorden: „Da das Bacterium enteritidis GÄRTNER den feinflochenden Agglutinenen Receptor mit dem *Bact. typhi abdominalis* gemeinsam hat, ist die

Komplementbindungsreaktion zur Typhusdiagnose nicht verwendbar”.

Dit is op zichzelf juist. FELIX heeft echter nooit beweerd, dat met behulp van de complementbindingsreactie de diagnose typhus of paratyphus te stellen is. Hij heeft steeds verklaard, dat een positieve complementbinding alleen wijst op „enteric fever”, maar niet op een bepaalde ziekte.

TSOURUMI en KOHDA (1923) trachtten het tijdstip vast te stellen, waarop complementbindende antistoffen in het bloedserum en de organen van konijnen, welke met typhusbacillen waren ingespoten, optraden. Uit de organen werd een waterig extract bereid, waarmede de reactie verricht werd. Reeds na 20 uur waren complementbindende antilichamen in de milt aanwezig en na 24 uur ook in het bloedserum. In het beenmerg en de lymfklieren treden deze antilichamen iets later op. Door bovengenoemde onderzoekers werd dus proefondervindelijk de waarnemingen van ZLATOGOROFF e.a. over het vroegtijdig optreden van complementbindende antistoffen bevestigd.

Een groot verdediger van de complementbindingsreactie op typhus is ook PIJPER.

In 1923 zegt hij: „in my hand specific complementfixation proved to be a diagnostic method so vastly superior to WIDAL's test, that I venture to propose to do away with agglutination and to rely solely on complementfixation as a diagnostic test for typhoid fever”.

In het geheel onderzocht hij 199 sera, allen afkomstig van typhuspatiënten. Hiervan reageerden met de complementbindingsreactie 192 of 96% positief. Slechts één patiënt reageerde steeds negatief. Deze zelfde 199 sera werden volgens de agglutinatieproef van WIDAL onderzocht. In 47 gevallen werd geen agglutinatie verkregen, wat 24% is. (Deze agglutinaties werden met gedooide culturen verricht).

Bovendien stelde PIJPER vast, dat de complementbindingsreactie steeds negatief uitvalt bij personen, die gevaccineerd zijn tegen typhus. (Over den tijdsduur, welke gelegen is tusschen vaccinatie en complementbinding, zegt PIJPER niets.) Dit is een bevestiging van de opvattingen van FELIX en FÜRST. Tevens is hieruit een bevestiging te lezen van de theorie van FELIX, dat de complementbindende antistoffen overeenkomen met de fijnvlokkende agglutininen. Een fijn-

vlokkige agglutinatie komt bij gevaccineerden, die niet ziek zijn, niet voor, daar vaccinatie alleen of vrijwel geheel alleen het ontstaan van grofvlokkige agglutininen in de hand werkt. Door afwezigheid van fijnvlokkige agglutininen wordt dus ook de complementbindingsreactie negatief. Ook in 1928 somde PIJPER in een artikel getiteld: „The history of an outbreak of Typhoid fever in Pretoria”, nog eens alle voordeelen van de complementbindingsreactie op. Hij zegt: „We have been able to make a positive serological diagnosis of typhoid fever in cases where the presence of the disease was established beyond doubt by positive bloodcultures, but where WIDAL's agglutination test was persistently negative. We have found the method particularly valuable in the detection of carriers. Here we also often found a negative WIDAL and a positive complementfixationreaction as illustrated by the cases recorded in this paper”.

Deze publicaties van PIJPER brachten in Nederland HERDERSCHÉE ertoe, in samenwerking met VITRINGA (1929), ook in ons land de waarde van de complementbindingsreactie vast te stellen.

Er werden door hem 60 typhus- en 2 paratyphus B sera onderzocht. Bij alle deze gevallen waren of werden bacillen uit het bloed gekweekt, zoodat twijfel aan de diagnose uitgesloten was. Bovendien werden 98 sera van patiënten, welke aan andere ziekten bleken te lijden, en van welke patiënten vermeld was, dat zij nooit aan typhus hadden geleden of tegen deze ziekte waren ingeënt, onderzocht.

Bij 18 van deze laatste patiënten werd wel eens een positieve reactie van WIDAL gevonden (1 : 100 of hooger), in den regel alleen voor typhus; (De agglutinaties werden steeds met suspensies van levende bacillen verricht.) eens tevens voor paratyphus B. Op één uitzondering na, bleef die positieve vondst tot één keer beperkt. In dit geval (een jongen van 10 jaar met tuberculeuse hilusklieren) kwam tot drie keer toe bericht, dat de reactie van WIDAL positief was, achtereenvolgens: 1 : 100, 1 : 250 en 1 : 100. De complementbindingsreactie werd bij 91 van de 98 patiënten steeds negatief gevonden; vier keer positief voor typhus (in één dier gevallen tevens positief voor paratyphus A en B, eens voor typhus en paratyphus B); twee keer voor A alleen; eens voor B alleen. Een samengaan van een positieve reactie

van WIDAL en een positieve complementbindingsreactie zagen HERDERSCHEE en VITRINGA bij niet aan typhus lijdende patiënten twee keer. In het eene geval was de reactie van WIDAL, een van de drie keer, waarin werd onderzocht, positief (1 : 100) en slechts toen was ook de complementsbindingsreactie positief, zoowel voor typhus, als voor paratyphus B. In het andere geval was eens de WIDAL-reactie voor B positief (1 : 250), terwijl de complementbindingsreactie positief uitviel voor paratyphus A.

Zij maken dus uit deze onderzoeken de gevolgtrekkingen, dat bij niet aan typhus lijdende patiënten de reactie van WIDAL vaker positief is, dan de complementbindingsreactie. Over hun ervaringen bij de met zekerheid aan typhus lijdende personen het volgende:

Er waren twee gevallen van paratyphus B. In het ééne geval bleek in de eerste ziekte-week de reactie van WIDAL positief voor typhus en paratyphus B te zijn, beide in een verdunning 1 : 100; de complementbindingsreactie was voor beiden negatief. In de derde week was de WIDAL-reactie voor typhus 1 : 100, voor paratyphus B 1 : 500 positief, maar de complementbindingsreactie steeds negatief. Het andere geval van paratyphus B gaf in de eerste week voor alles negatieve reacties; in de tweede week eveneens, behalve de complementbindingsreactie voor typhus. In de vierde week was alles negatief, behalve de reactie van WIDAL voor paratyphus B (1 : 100).

De typhusgevallen gaven de volgende uitkomsten:

	compl.bind.reactie		reactie van WIDAL	
1ste week	positief	4	positief	22
	negatief	27	negatief	13
2de week	positief	7	positief	21
	negatief	18	negatief	7
3de week	positief	12	positief	21
	negatief	11	negatief	6
4de week	positief	9	positief	12
	negatief	11	negatief	9
5de week	positief	10	positief	7
	negatief	4	negatief	6
nog later	positief	7	positief	8
	negatief	5	negatief	4

De verschillende weken hebben niet betrekking op den tijd, dat de patiënten ziek waren, maar op de in die week verrichte onderzoeken van nieuw opgenomen patiënten en bovendien op de zieken, die de week tevoren nog een negatieve WIDAL, vertoonden.

Gedurende de eerste veertien dagen was de complementbindingsreactie dus 11 maal positief en 45 maal negatief, tegenover de reactie van WIDAL 43 maal positief en 20 maal negatief. (Niet in alle gevallen werd van iedere patiënt complementbinding en agglutinatie verricht.)

In de latere weken was de complementbindingsreactie 38 maal positief en 31 keer negatief; de reactie van WIDAL 48 keer positief en 25 keer negatief.

Om een indruk te krijgen van de menigvuldigheid, waarmee een positieve (resp. negatieve) complementbindingsreactie samen gaat met een positieve (en negatieve) WIDAL, geven zij nog het volgende overzicht.

	Reactie v. W. positief	Reactie v. W. negatief
Complementbinding positief	32	14
„ „ negatief	45	22

HERDERSCHÉE en VITRINGA komen dan tot de slotsom, dat voor de typhusdiagnostiek de reactie van WIDAL, vooral wanneer zij bij herhaling wordt verricht, grooter waarde heeft dan de complementbindingsreactie. Wanneer men een patiënt met een verdachte typhusanamnese in een laat stadium der ziekte in behandeling krijgt, verdient het aanbeveling om tegelijk met de reactie van WIDAL de complementbindingsreactie te laten verrichten.

PIJPER voelde zich gedrongen op dit resultaat nader in te gaan. Hij trekt uit de cijfers van HERDERSCHÉE de gevolgtrekking, dat in slechts 66% der gevallen in de eerste weken der ziekte de reactie van WIDAL positief is, en meent, dat de medicus practicus het recht heeft van het laboratorium te verwachten, dat dit hem in geval van typhus een positieve diagnose geven kan als resultaat van een enkel bloedonderzoek in meer dan twee uit iedere drie gevallen.

PIJPER zelf vindt in Zuid-Afrika nooit meer dan 50%



positieve uitkomsten (bij cultuur-positieve gevallen). Dit is dus nog slechter dan de resultaten, welke HERDERSCHÉE verkreeg. Ook andere Zuid-Afrikaansche laboratoria kregen overeenkomstige slechte uitkomsten. Met de invoering van de complementbindingsreactie krijgt hij nog steeds 96% positieve uitkomsten. In geheel Zuid-Afrika heeft de complementbindingsreactie dan ook de reactie van WIDAL verdrongen, tot groote tevredenheid der belanghebbenden. Zijn ervaringen met deze reactie gaan nu over 6 jaar en omvatten meer dan 700 gevallen. Hij meent, dat de oorzaak van deze zeer uiteenlopende resultaten misschien gelegen is in het feit, dat in Zuid-Afrika de „O” agglutinatie overweegt, in Engeland en Nederland de „H” agglutinatie. De reactie van WIDAL (met door formaline gedooide bacillen) geeft steeds „H” agglutinatie. Hierdoor zouden dus in Nederland de resultaten met de WIDAL iets beter kunnen zijn dan in Zuid-Afrika.

Deze veronderstelling van PIJPER is echter nog niet proefondervindelijk bewezen.

#### EIGEN ONDERZOEK.

De groote tegenstelling, welke tusschen de gegevens van PIJPER en HERDERSCHÉE bestaat, heeft mij er toe gebracht de complementbindingsreactie naast de reactie van WIDAL in een aantal ter onderzoek ingezonden sera toe te passen. Slechts enkele van de onderzoekers, welke de complementbindingsreactie in de typhusdiagnostiek gebruikten, geven duidelijk aan, op welke wijze zij de reactie verrichtten (o.a. PIJPER). Dit is zeer te betreuren, daar juist de techniek van een complementbindingsreactie een belangrijk deel van het succes uitmaakt. Daarom is het ook jammer, dat VITRINGA niet opgeeft op welke wijze hij zijn complementbinding op typhus verrichtte. (Persoonlijk mocht ik van VITRINGA vernemen, dat hij zijn complementbindingen op typhus en paratyphus verricht met met alcohol en aether behandelde bacteriesuspensies, welke gedroogd worden).

PIJPER heeft de noodzakelijkheid van een nauwkeurige technische uitvoering van de complementbindingsreactie nog eens onder onze aandacht gebracht. Daarom wil ik eerst weergeven op welke wijze PIJPER de complementbinding verrichtte.

## TECHNIEK

### DER COMPLEMENTBINDINGSREACTIE VOLGENS PIJPER.

Konijnen, welke met schapenbloedlichaampjes waren ingespoten, werden, wanneer de titer hoog genoeg was (ten minste 1 : 2000), verbloed. Het serum, dat zoo verkregen werd, werd gebruikt als haemolytische amboceptor.

Aan de voorproef voor de complementbindingsreactie gaat steeds een titerbepaling van dezen amboceptor vooraf met het complement, dat dien dag gebruikt zal worden. De serumverdunding, welke nog geheel haemolyse geeft, wordt door vier gedeeld en in deze verdunding voor de overige proeven gebruikt.

Is de titer 1/2000, dan wordt dus voor de voorproef en de reactie zelf de amboceptor in een verdunding van 1 : 500 gebruikt. Op de titerbepaling van den amboceptor volgt de titratie van het antigeen. Hiervoor wordt in zeven buisjes 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05 en 0.0 antigeen gedaan. Het antigeen bestaat uit een 12—24 uur oude agarcultuur, welke met 3—4 cc. physiologische zoutoplossing wordt afgespoeld; vervolgens wordt deze suspensie gedurende een uur bij 58° gezet, zoodat de steriliteit verzekerd is. Daarna wordt deze suspensie gecentrifugeerd (bij een laag toerenaantal) om het van klontjes te zuiveren. De bovenstaande vloeistof wordt nu als antigeen gebruikt. Bij deze zeven buisjes komt vervolgens 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.45 en 0.5 cc. physiologische zoutoplossing en bovendien 0.5 cc. complement (caviaserum) van een verdunding 1 : 10. Deze buisjes worden nu gedurende een uur in de broedstov van 37° C. geplaatst, waarna aan ieder 1 cc. haemolytisch systeem wordt toegevoegd. (Het haemolytisch systeem bestaat uit gelijke deelen amboceptorverdunding en 5% schapenbloedcellenoplossing). Na 10 minuten bij 37° te hebben gestaan wordt dan afgelezen. Het buisje, welk het meeste antigeen bevat en toch nog volledige haemolyse te zien geeft, geeft de hoeveelheid antigeen aan, welke voor de complementbindingsreactie gebruikt zal worden.

De reactie zelf wordt verricht in twee buisjes voor elken patiënt; in het eene komt 0.2 cc. geïnactiveerd patiëntenserum, 0.8 cc. physiologische zoutoplossing en 0.5 cc. complement van een verdunding 1 : 10; in het tweede 0.5 cc. antigeen en 0.1 cc. geïnactiveerd patiëntenserum, 0.4 cc.

physiologische zoutoplossing en 0.5 cc. complement 1 : 10. Ten slotte wordt voor de geheele reactie een antigeencontrôle ingesteld door bij 0.5 cc. antigeen 0.5 cc. zoutoplossing en 0.5 cc. complement 1 : 10 te voegen. Overzichtelijk weergegeven is de vulling der buisjes in het hiervolgende schema (III).

SCHEMA III.

	Patiënt 1.	Patiënt 2.
1ste rij buisjes:	0.2 cc. geïnactiveerd serum	0.2 cc. geïnactiveerd serum
	0.8 cc. zoutoplossing	0.8 cc. zoutoplossing
	0.5 cc. complement 1 : 10	0.5 cc. complement 1 : 10.
2de rij buisjes:	0.5 cc. antigeen	0.5 cc. antigeen
	0.1 cc. geïnactiveerd serum	0.1 cc. geïnactiveerd serum
	0.4 cc. zoutoplossing	0.4 cc. zoutoplossing
	0.5 cc. complement 1 : 10	0.5 cc. complement 1 : 10
	Contrôle antigeen.	
	0.5 cc. antigeen.	
	0.5 cc. zoutoplossing.	
	0.5 cc. complement 1 : 10.	

Gedurende één uur worden de buisjes nu in de broedstoof gezet; daarna wordt 1 cc. haemolytisch systeem toegevoegd. Nu wordt alles weer in de broedstoof gezet en nauwkeurig opgelet, wanneer de antigeencontrôle volledig gehaemolyseerd is; dit vindt ongeveer na 5—10 minuten plaats. Nu worden de buisjes buiten de stoof gezet en iedere reactie, waarvan het buisje op de eerste rij geheel gehaemolyseerd is, wordt afgelezen. Is het tweede buisje (met antigeen) niet of niet geheel gehaemolyseerd, dan is de reactie positief. Niet alle reacties worden dus terzelfder tijd afgelezen; iedere reactie wordt pas afgelezen, wanneer het eerste buisje geheel is gehaemolyseerd. Te lang staan kan dus ook in het tweede volledige haemolyse doen optreden. PIJPER zelf zegt, dat hij bij zijn eerste onderzoeken met aflezen gewacht had, tot alle buisjes op de eerste rij gehaemolyseerd waren; hierdoor zag hij eenige positieve uitkomsten over het hoofd. Hij zegt dan ook: „it seems quite possible that many of the negative results recorded by other authors who tried specific complement-fixation in typhoid must be ascribed to this phenomenon”.

Vooral de zwak positieve uitkomsten geven snel na het eerste buisje een volledige haemolyse van het 2de buisje, zoodat een voortdurende contrôle der proef absoluut noodzakelijk is.

#### TECHNIEK DER COMPLEMENTBINDINGSREACTIE ZOOALS DIE DOOR MIJ WERD TOEGEPAST.

Deze door PIJPER zoo nauwkeurig aangegeven werkwijze paste ik bij mijn onderzoekingen om verschillende redenen niet toe. In de eerste plaats is het gewenscht, dat, opeen laboratorium, waar zeer veel complementbindingsreacties worden uitgevoerd, (op de bacteriologische afdeeling van het Centraal Laboratorium worden bijna dagelijks complementbindingsreacties op gonorrhoe, echinococcus, tuberculose en maltakoorts verricht) eenheid in werkwijze bestaat en niet iedere complementbinding op een andere wijze wordt uitgevoerd. Indien de complementbindingsreactie dus een aanwinst voor de typhusdiagnostiek blijkt te zijn, is het gewenscht, dat ze, om praktisch in toepassing te kunnen worden gebracht, deze bruikbaarheid kan aantonen met de op een laboratorium in gebruik zijnde routinemethode.

In de tweede plaats wordt hierdoor een vergelijking in sterkte mogelijk met andere complementbindingsreacties, hetgeen de betrouwbaarheid ten goede zal komen.

De reactie werd door mij op de volgende wijze verricht:

Het antigeen wordt gemaakt van een 5-tal typhus- en paratyphusstammen, welke op schuine agarbuizen worden geënt. Het condenswater wordt eerst afgezogen, vervolgens 1.2 cc. zoutoplossing toegevoegd en de buis afgespoeld.

Deze suspensie wordt, goed afgesloten, 24 uur bij 56° C. gezet en daarna 10 maal verdund. Met deze 10 × verdunde suspensie wordt de voorproef nu ingesteld. Deze geschiedt volgens het schema IV.

De voorproef wordt nu 1 uur bij 37° C. gezet en vervolgens 0.6 cc. haemolytisch systeem toegevoegd. (Als amboceptor wordt een serumverdunding gebruikt, welke denzelfden dag voor de Wassermannreactie het meest bruikbaar is gebleken.) Na een half uur wordt nu afgelezen. Het buisje, dat nog volledige haemolyse heeft, geeft de complementverdunding aan, welke gebruikt dient te worden voor de reactie.

SCHEMA IV.

	1ste buisje	2de buisje	3de buisje	4de buisje	5de buisje	6de buisje
physiol. zoutopl.	0.3 cc.	0.3 cc.	0.3 cc.	0.3 cc.	0.3 cc.	0.3 cc.
antigeen	0.3 cc.	0.3 cc.	0.3 cc.	0.3 cc.	0.3 cc.	0.3 cc.
complement	0.3 cc.	0.3 cc.	0.3 cc.	0.3 cc.	0.3 cc.	0.3 cc.
	van	van	van	van	van	van
verduunning	1 : 10	1 : 15	1 : 20	1 : 25	1 : 30	1 : 40

(Behalve deze 6 buisjes worden ook 6 buisjes met een antigeenverduunning 1 : 20 ingesteld. Dit geschiedt voor het typhus- en paratyphusantigeen. In het totaal zijn dus 24 buisjes voor de voorproef noodig. De complement verduunningen worden op de volgende wijze verkregen:

	1ste buisje	2de buisje	3de buisje	4de buisje	5de buisje	6de buisje
compl. verd.:	1 : 10	1 : 15	1 : 20	1 : 25	1 : 30	1 : 40
phys. zoutopl.:	1.35 cc.	2.1 cc.	1.9 cc.	2.4 cc.	1.- cc.	0.7 cc.
caviaserum:	0.15 cc.	0.15 cc.	0.1 cc.	0.1 cc.	1.- cc.	0.7 cc.
					van 1/15	van 1/20)

De proef zelf wordt voor iederen patiënt verricht met 5 buisjes voor de typhus- en vijf buisjes voor de paratyphus-complementbinding. In twee afzonderlijk staande buisjes wordt resp. 2.— cc. en 0.9 cc. physiologische zoutoplossing gedaan. Dit zijn de verdunningsbuisjes voor het patiëntenserum.

Bovendien wordt voor het geheel nog een antigeencontrôle toegevoegd voor de reactie op typhus en voor de reactie op paratyphus. Voor de reactie op paratyphus wordt een zelfde rij van 5 buisjes noodzakelijk. De wijze waarop de reactie wordt verricht is uit schema V op te maken.

Aan het eerste verdunningsbuisje met 2 cc. physiologische zoutoplossing wordt 0.5 cc. patiëntenserum toegevoegd. Het 2de verdunningsbuisje krijgt 0.3 cc. uit het eerste buisje. Uit het eerste verdunningsbuisje worden de drie eerste buisjes van de reactie bijgevuld. Uit het tweede de twee laatste.

Deze buisjes worden nu 1 uur bij 37° C. geplaatst en vervolgens met 0.6 cc. haemolytisch systeem bijgevuld. (Het haemolytisch systeem wordt 1 uur te voren reeds bij 37° C. geplaatst om op temperatuur te zijn, zoodra het aan de reactie moet worden toegevoegd.) De buisjes worden nu weer bij 37° C. geplaatst; na 10 minuten wordt reeds begonnen met de

## SCHEMA V.

	1ste buisje	2de buisje	3de buisje	4de buisje	5de buisje
physiologische zoutoplossing	0.3 cc.	—	0.2 cc.	—	0.2 cc.
typhusantigeen volgens voorproef	—	0.3 cc.	0.3 cc.	0.3 cc.	0.3 cc.
complement volgens voorproef	0.3 cc.	0.3 cc.	0.3 cc.	0.3 cc.	0.3 cc.
patiëntenserum	0.3 cc.	0.3 cc.	0.1 cc.	0.3 cc.	0.1 cc.

uit 1ste verdunningsbuisje.

uit 2de  
verdunningsbuisje.

1ste verdunningsbuisje.

physiologische zoutoplossing	2.- cc.
patiëntenserum	0.5 cc.

2de verdunningsbuisje.

physiologische zoutoplossing	0.9 cc.
patiëntenserum (verdund)	0.3 cc.

contrôle typhusantigeen

typhusantigeen	0.3 cc.
complement volgens voorproef	0.3 cc.
physiologische zoutoplossing	0.3 cc.

contrôle paratyphusantigeen.

paratyphusantigeen	0.3 cc.
complement volgens voorproef	0.3 cc.
physiologische zoutoplossing	0.3 cc.

proef te controleeren; vervolgens geschiedt dit iedere 5 minuten. De reactie, waarvan het eerste buisje geheele haemolyse te zien gaf, werd afgelezen. Gewoonlijk waren na 15—20 minuten alle reacties afgelezen.

De reactie, op deze wijze uitgevoerd, heeft boven de methode van PIJPER voor, dat de eigenlijke proef met vier serumverduunningen wordt verricht, zoodat een beoordeeling van de sterkte beter kan geschieden dan met de methode van PIJPER, waarbij slechts één buisje ter beoordeeling aanwezig is.

In totaal werden 88 complementbindingsreacties op typhus en paratyphus verricht. De sterkte der positieve reacties is aangegeven door: +, ++, +++, +++++, al naar gelang 1, 2, 3 of alle 4 de buisjes volledige remming te zien gaven. De positieve uitkomsten worden in de volgende tabel (III) weergegeven, benevens de uitkomst der agglutinatieproef (met formaline-Ficker) en het resultaat van een eventueel ingesteld onderzoek der bloedkoek en der faeces- en urine-monsters. De agglutinaties worden gewoonlijk niet in grootere serumverduunningen dan 1/500 ingesteld. Slechts in bijzondere gevallen geschiedt dit wel. Indien de agglutinatie 1/500 + is, wil dit dus niet zeggen, dat deze niet hooger was.

Van de 88 maal, dat de complementbindingsreactie op typhus en paratyphus werd verricht, werd 35 maal een positieve uitkomst verkregen; 3 maal was de agglutinatieproef volgens WIDAL, 1 : 50 zwak positief, terwijl de complementbinding negatief was voor typhus en paratyphus. Eénmaal was de agglutinatieproef negatief en de complementbinding sterk positief voor paratyphus. In alle andere gevallen werden zoowel met de agglutinatieproef als de complementbinding positieve resultaten verkregen. Indien we nu deze gegevens eens nader beschouwen, kan het volgende opgemerkt worden.

De agglutinatieproef was 24 maal in een serumverduunning van 1 : 250 of 1 : 500 positief; in deze 24 gevallen was ook steeds de complementbindingsreactie duidelijk positief. Wel kwam het zeer vaak voor, dat beide reacties bij eenzelfde serum positief uitvielen, maar dan was toch steeds of de reactie op typhus of die op paratyphus duidelijk de sterkste. Slechts éénmaal (geval 339I) was de complementbindingsreactie voor typhus en paratyphus even sterk, terwijl de agglu-

tinatie voor typhus I : 100 + was en voor paratyphus I : 500; er werden paratyphusbacillen in faeces en urine gevonden. Daar de complementbindende antistoffen identiek zijn met

TABEL III.

No.	Uitslag der agglutinatie op :		Uitslag der complementbinding op:		Uitslag van b.i.g.	faeces	urine
	Typhus	Paratyphus	Typhus	Paratyphus			
3269	I : 500+	—	+ + + —	— — — —	T+	—	—
3275	—	I : 50+	— — — —	+ + + +	—	—	—
3278	I : 500+	I : 250+	+ + + +	— — — —	—	—	—
3280	—	I : 500+	— — — —	+ + + +	—	—	—
3287	I : 250+	—	+ + — —	— — — —	T+	T+	—
3309	I : 500+	—	+ + + +	+ — — —	T+	—	—
3311	I : 50 zwak +	—	— — — —	— — — —	T+	—	—
3345	—	I : 100+	+ — — —	+ + + —	—	—	—
3346	I : 100+	—	+ + — —	+ + + +	—	—	—
3361	I : 50+	—	— — — —	— — — —	—	—	—
3347	—	I : 500+	+ — — —	+ + + +	—	—	—
3382	I : 500+	—	+ + + +	— — — —	+T	—	—
3380	—	I : 500+	— — — —	+ + + +	+PT	—	—
3379	—	I : 500+	— — — —	+ + + +	—	—	—
3387	I : 100+	—	+ + — —	— — — —	—	—	—
3391	I : 100+	I : 500+	+ + + —	+ + + —	—	PT+	PT+
3416	—	I : 500+	+ — — —	+ + + +	—	—	—
3422	—	I : 500+	+ + — —	+ + + +	—	—	—
3444	—	I : 500+	— — — —	+ + + +	—	—	—
3448	I : 100+	I : 500+	+ + — —	+ + + +	—	—	—
3449	I : 100+	—	+ + + —	— — — —	—	—	—
3452	I : 500+	—	+ + + —	+ — — —	+T	—	—
3421	I : 50+	I : 250+	+ + + +	+ — — —	+T	—	—
3528	I : 100+	—	+ + + —	— — — —	—	—	—
3586	I : 500+	I : 500+	— — — —	+ + + +	—	PT+	—
	I : 25600+	I : 25600+	— — — —	— — — —	—	—	—
3573	I : 500+	—	+ + + +	+ — — —	—	T+	—
3593	I : 500+	I : 50+	+ + + —	+ + — —	—	—	—
3496	I : 100+	—	+ — — —	— — — —	—	T+	—
3521	—	I : 500+	— — — —	+ + + +	PT+	—	—
3526	I : 100+	—	+ + — —	— — — —	—	—	—
3464	I : 100+	—	+ + — —	— — — —	—	—	—
3595	—	I : 100+	— — — —	+ + — —	—	—	—
3525	—	—	— — — —	+ + + —	PT+	—	—
3655	I : 500+	—	+ + + +	+ — — —	—	—	—
3667	—	I : 50 zwak +	— — — —	— — — —	—	—	—
3668	I : 500+	—	+ + + +	+ — — —	—	—	—
3698	—	I : 500+	+ — — —	+ + + +	—	—	—
3676	I : 500+	—	+ + + +	— — — —	—	—	—

de fijnvlokkende agglutinenen en deze zoowel groep- als typespecifieke componenten bezitten, zouden we dus in een geval als dit kunnen aannemen, dat de typespecifieke componenten zoo goed als afwezig moeten zijn geweest, waardoor de complementbinding hier veroorzaakt werd door de groep-



specifieke componenten, welke voor typhus en paratyphus gelijk zijn. Hierdoor is ook te verklaren, dat vele complementbindingen voor beide ziekten positief, alhoewel dan niet in even sterke mate, uitvielen. Hier waren naast de groep-specifieke ook typespecifieke agglutininen aanwezig, waardoor de eene reactie sterker werd dan de andere.

Een zeer bijzondere plaats nam nog geval 3586 in, waarbij zoowel bij een verdunning van 1 : 500 als 1 : 25600 typhus en paratyphusbacillen in gelijke mate werden geagglutineerd. De complementbindingsreactie was sterk positief voor paratyphus; in de faeces werden paratyphusbacillen gevonden. Hier gaf de complementbinding dus een beter resultaat dan de agglutinatieproef. Hetzelfde was het geval bij n<sup>o</sup>. 3421; hier was de agglutinatie voor typhus 1 : 50, voor paratyphus 1 : 250 positief. De patiënt had vroeger paratyphus gehad. De complementbinding voor typhus was zeer sterk positief, voor paratyphus zeer zwak. Uit het bloed werden typhusbacillen gekweekt. Hier leidde de WIDAL ons dus op een dwaalspoor. De complementbinding gaf echter een uitkomst, welke in overeenstemming was met de bloedcultuur. Ook hier dus overtrof de complementbinding de agglutinatie.

9 maal was de agglutinatieproef 1 : 100 positief voor typhus of paratyphus; 8 maal was tevens de complementbinding positief voor dezelfde ziekte; eenmaal was deze reactie zwak positief voor paratyphus, terwijl de agglutinatie 1 : 100 voor typhus positief was (N<sup>o</sup>. 3346). Er was echter geen faeces, urine of bloed om na te gaan, welke reactie hiervan een juiste uitkomst had gegeven. Eénmaal was de reactie van WIDAL negatief, terwijl de complementbinding sterk positief was voor paratyphus. Uit het bloed werden paratyphusbacillen gekweekt. De patiënt was 3 dagen ziek. Hier hebben we dus een steun voor de theorie, dat de complementbindingsreactie eerder positief wordt dan de agglutinatieproef. 3 maal was de agglutinatie 1 : 50 zwak positief of positief, terwijl de complementbindingsreactie negatief was. Eénmaal werden uit het bloed typhusbacillen gekweekt. (De beide andere malen was geen ander materiaal ingezonden.) Hier faalde dus de complementbinding.

We kunnen echter zeggen, dat de reacties in ongeveer 85% der gevallen een overeenkomstigen uitslag te zien gaven.

Een drietal malen was de complementbinding de meerdere van de agglutinatieproef. Eénmaal was het omgekeerde het geval. In het algemeen kan dus gezegd worden, dat de waarde van de complementbinding zeker niet lager gesteld moet worden dan die van de agglutinatieproef. Een bezwaar is echter de omslachtige voorbereiding van het antigeen. Wanneer iederen dag deze reactie moet worden verricht, moeten steeds  $2 \times 24$  uur tevoren al stammen afgeënt zijn. Het zou dus een zeer groote vereenvoudiging blijken te zijn, wanneer met een extract van typhus- of paratyphusbacillen, dat dus gedurende eenigen tijd bewaard zou kunnen worden, dezelfde resultaten te bereiken waren. Ook PIJPER schijnt dit bezwaar gevoeld te hebben, daar hij in 1928 de reactie met extract is gaan uitvoeren.

Hiervoor spoelde hij agarculturen, welke 12—24 uur oud waren, met 4 cc. physiologische zoutoplossing af. Gedurende 1 uur werd dit bij  $57^{\circ}$  C. en vervolgens 48 uur in de ijskast geplaatst, daarna bij een negatieven druk van ten hoogste 16 m.M. kwik door een BERKEFELD-kaars gefiltreerd, zóó, dat niet meer dan enkele kubieke c.M. per uur doorliepen. Bovendien kon dan 0.25% carbol toegevoegd worden, alvorens gefiltreerd werd. Met dit filtraat, dat tot 30 dagen bewaard kon blijven, werden door PIJPER dezelfde resultaten geboekt als met het vroeger beschreven antigeen. Het leek mij daarom goed ook met een op dergelijke wijze bereid extract de complementbindingsreactie in een aantal gevallen nog eens te doen.

Hiervoor gebruikte ik een 15-tal sera, welke met de agglutinatieproef een duidelijk positieve uitkomst hadden gegeven. In de volgende tabel IV zijn de uitkomsten der agglutinatieproef (met de Formaline-Ficker) met die der complementbinding samengebracht.

De uitkomsten waren niet zeer bemoedigend: 5 maal was de complementbinding negatief, terwijl de agglutinatie positief was (1 : 250 of 1 : 500). Ook waren de positieve uitkomsten vaak niet zoo overtuigend en eenmaal was de complementbinding voor paratyphus sterker positief dan voor typhus, terwijl de agglutinatie voor typhus 1 : 500 + was en voor paratyphus —.

Het aantal met extract verrichte onderzoekingen was te klein om met beslistheid iets te mogen zeggen. Ik kreeg echter

sterk den indruk, dat de uitkomsten, met extract verkregen, belangrijk ten achter stonden bij die met bacillen.

Tenslotte werd nu nog bij 65 sera de complementbindingsreactie met gedooide bacillen naast de agglutinatieproef volgens WIDAL met de formaline- en de alcohol-Ficker uitgevoerd.

Hierdoor zou dus in gevallen, waarin een niet gelijklopende uitslag tusschen complementbinding en formaline-Ficker werd verkregen, de alcohol-Ficker ons op den juisten weg

TABEL IV.

No.	Uitslag der agglutinatie op:		Uitslag der complementbinding op:	
	Typhus	Paratyphus	Typhus	Paratyphus
3655	I : 500+	—	+ + — —	— — — —
3668	I : 500+	—	+ — — —	+ + — —
3676	I : 500+	—	— — — —	— — — —
3698	—	I : 500+	— — — —	— — — —
3701	I : 500+	—	+ + + —	+ — — —
3706	I : 3200+	I : 25600+	+ — — —	+ + + +
3709	I : 250+	—	— — — —	— — — —
3748	—	I : 500+	+ — — —	+ + — —
3749	I : 500+	—	+ + + —	— — — —
3797	—	I : 250+	— — — —	— — — —
3798	I : 250+	—	+ + + —	+ — — —
3816	I : 50+	I : 500+	— — — —	— — — —
3844	I : 1600+	I : 6400+	+ — — —	+ + + +
3894	I : 3200+	I : 12800+	+ — — —	+ + + +
3905	I : 500+	—	+ — — —	— — — —

kunnen brengen. Bovendien werd in een tweetal gevallen nog de verzadigingsproef volgens CASTELLANI toegepast.

Het principe van deze reactie is op de volgende wijze uiteen te zetten. Een typhusimmuuserum bevat twee soorten agglutininen, n.m.l. groep- en genusspecifieke agglutininen. Deze beide soorten agglutininen, ook wel „hoofd-” en „bij”-agglutininen genoemd, zijn opgewekt door de groep- en genus-specifieke receptoren van de typhusbacillen (zie hiervoor schema 2 blz. 32). Daar de groepspecifieke receptor van den typhus-, paratyphus- en enteritidis-GÄRTNER-bacil dezelfde is, zullen alle deze bacillen dus ook door een typhusimmuuserum geagglutineerd worden. Door verzadiging van een typhusimmuuserum met typhusbacillen zullen nu alle agglutininen kunnen worden verwijderd. Door verzadiging met paratyphusbacillen kunnen alleen de groepspecifieke

TABEL V.

No.	FORM. FICK.		ALCOH. FICK.		COMP. BIND. (gedoode bacillen)		Faeces	Urine	Bloed
	typh.	parat.	typh.	parat.	typh.	parat.			
736	I : 500+	—	I : 250+	—	+ + + —	— — — —	+T		+T
734	I : 250+	—	I : 500+	I : 100+	+ + + +	+ — — —			
733	I : 500+	—	I : 500+	I : 50+	+ + + +	— — — —			
674	I : 500+	—	I : 500+	I : 100+	+ + + +	+ — — —			
671	—	I : 500+	—	I : 500+	— — — —	+ + + +			
665	I : 50+	—	I : 500+	I : 50+	+ + + +	+ — — —			
626	I : 500+	I : 500+	I : 500+	I : 50+	+ + + +	+ — — —			
	I : 12800+	I : 800+							
617	I : 500+	—	I : 500+	I : 100+	+ + + +	+ — — —			
616	I : 500+	I : 50+	I : 250+	—	+ + + +	+ — — —			
615	I : 500+	I : 100+	I : 500+	I : 50+	+ + + +	+ + — —			
568	I : 250+	I : 50+	I : 500+	I : 100+	+ + + —	— — — —			
739	I : 500+	—	I : 500+	—	+ + + +	+ — — —			
750	—	I : 50+	—	I : 100+	— — — —	+ + — —			
775	I : 250+	—	I : 250+	—	+ + + —	+ — — —			
782	—	I : 500+	I : 100+	I : 500+	— — — —	+ + + +	+PT		
790	I : 100+	—	I : 250+	—	+ + — —	+ — — —			
806	I : 100+	I : 100+	I : 250+	—	+ + + —	— — — —			
843	—	—	I : 250+	—	+ + + —	+ — — —			
845	I : 500+	I : 50+	I : 500+	I : 100+	+ + + +	+ — — —	+T		
848	I : 100+	I : 100+	—	I : 100+	— — — —	+ + — —			
855	—	I : 500+	—	I : 500+	+ — — —	+ + + —	+PT		
894	I : 500+	—	I : 500+	I : 50+	+ + + +	+ + — —			
902	I : 500+	—	I : 500+	—	+ + + —	— — — —	+T	+T	
948	I : 500+	—	I : 250+	—	+ + + —	— — — —			

(bij-)agglutinenen worden verwijderd, het serum blijft na deze verzaadiging nog typhusbacillen agglutineeren. Met behulp van de reactie van CASTELLANI kan dus uitgemaakt worden, door welke bacteriën de agglutinenen zijn opgewekt. Als routinemethode is deze proef echter wegens zijn omslachtigheid niet te gebruiken.

In tabel V zijn de positieve uitkomsten samengebracht; tevens zijn positieve uitkomsten van het onderzoek van faeces, urine of bloed vermeld.

We zien uit deze tabel, dat de resultaten, welke met de alcohol-Ficker werden verkregen, in alle opzichten overeenstemmen met die van de complementbinding.

De drie reacties gaven 20 maal een eensluitende uitkomst; 4 maal was dit niet het geval.

Belangrijk was geval 843: hier was de agglutinatie met de formaline-Ficker negatief, die met de alcohol-Ficker 1 : 250 positief voor typhus, de complementbinding was sterk positief voor typhus, zeer zwak positief voor paratyphus; in het bloed werden typhusbacillen gevonden. De patiënt was 7 dagen ziek. Hier valt aan de juistheid van den uitslag van de complementbinding en de alcohol-Ficker niet te twifelen.

Geval 806 gaf met de formaline-Ficker voor typhus en paratyphus beiden een agglutinatie van 1/100 +, de alcohol-Ficker en de complementbinding waren voor typhus sterk positief.

Nu werd met het restant van het patiëntenserum de reactie van CASTELLANI gedaan.

Hiertoe werd 0.4 cc. serum verdund tot 1 : 10. Deze hoeveelheid werd in twee buisjes verdeeld, waarna bij het ééne een dikke suspensie van typhus-, bij het andere een dikke suspensie van paratyphusbacillen werd gevoegd. Vervolgens werden beide buisjes twee uur bij 37° gezet en daarna 24 uur bij kamertemperatuur. Vervolgens werden alle bacillen in beide buisjes uitgecentrifugeerd en met de bovenstaande vloeistof op de gewone wijze een agglutinatie ingesteld. Het bleek nu, dat het serum, dat verzaadigd was geworden met typhusbacillen, geen agglutinenen meer bevatte voor typhus en paratyphus; het serum, dat verzaadigd was met paratyphusbacillen, agglutineerde nog duidelijk typhusbacillen. Ook de proef volgens CASTELLANI gaf dus een uitkomst, welke met die der complementbinding overkwam.

Ongeveer drie dagen nadat de proef van CASTELLANI was verricht, kwam een tweede faecesmonster van dezen patiënt ter onderzoek. Hieruit werden toen typhusbacillen gehaald, zoodat hiermede aan eventueele nog bestaande onzekerheid voorgoed een einde werd gemaakt.

Ook geval 848 gaf met de formaline-Ficker voor typhus en paratyphus een agglutinatie 1/100 +; de complementbinding en de alcohol-Ficker waren voor paratyphus positief. Met de proef volgens CASTELLANI werden in het met paratyphusbacillen verzadigde serum geen typhus- en paratyphusagglutinenen meer gevonden; in het met typhusbacillen verzadigde serum waren nog wel paratyphusagglutinenen aanwezig. Ook de proef van CASTELLANI gaf dus paratyphus als ziekte aan. Het onderzoek van faeces, urine en bloed verliep negatief. We mogen, mijns inziens, echter met aan zekerheid grenzende waarschijnlijkheid aannemen, dat ook hier de complementbinding en de agglutinatie met de alcohol-Ficker zich de meerderen hebben getoond van de agglutinatie met de formaline-Ficker.

Ook in de gevallen 626 en 665 waren de complementbinding en de agglutinatie met de alcohol-Ficker van niet te onderschatten waarde.

#### SAMENVATTING:

De complementbindingsreactie op typhus en paratyphus met gedooide bacillen werd 88 maal naast de agglutinatieproef (met de formaline-Ficker) ingesteld. In 85% der gevallen werd met beide reacties een eensluidende uitkomst verkregen. Een drietal malen was de complementbinding de meerdere van de agglutinatieproef. Eenmaal was het omgekeerde het geval.

Ook met extracten van typhus- en paratyphusbacillen werd 15 maal een complementbindingsreactie verricht met sera, welke met de agglutinatieproef duidelijk positief waren voor typhus of paratyphus. Slechts 10 maal was de complementbinding hier positief en nog niet eens altijd overtuigend.

Er werden dus aanwijzingen verkregen, dat, als antigeen voor de complementbindingsreactie, gedooide bacteriën te verkiezen zijn boven hun extracten.

Tenslotte werden nog bij 65 sera de complementbinding

(met gedooide bacillen) verricht naast de agglutinatieproef volgens WIDAL, met een alcohol- en een formaline-Ficker.

Ook nu bleek in een viertal gevallen de formaline-Ficker de mindere te zijn van de beide andere reacties. Het omgekeerde kwam niet voor.

## HOOFDSTUK V.

### ONDERZOEK VAN FAECES.

De voedingsbodems, die bij het onderzoek van faeces van typhuspatiënten in gebruik zijn, kunnen in een drietal groepen worden ondergebracht, n.l.:

1<sup>o</sup>. Voedingsbodems, welke een differentiatie der kolonies door middel van kleurtegenstellingen mogelijk maken.

2<sup>o</sup>. Voedingsbodems met groeibelemmerende bestanddeelen.

3<sup>o</sup>. Aankweekingsmilieu's.

Een voorbeeld van 1<sup>o</sup>. is de ENDO-plaat; van 2<sup>o</sup>. is de LENZ- en TIETZ-plaat; van 3<sup>o</sup>. is de kweekmethode van LEON MULLER; 2<sup>o</sup>. en 3<sup>o</sup>. zijn niet altijd scherp van elkaar te scheiden.

Ik noem juist de ENDO-plaat, de LENZ- en TIETZ-plaat en de kweekmethode van LEON MULLER, omdat deze voedingsbodems in gebruik zijn of zijn geweest op de bacteriologische afdeling van het Centraal Laboratorium. Zooals ik in mijn inleiding reeds mededeelde, heb ik mij ten doel gesteld in het bijzonder na te gaan, in hoeverre de bacteriologische typhusdiagnostiek, zooals die op de bacteriologische afdeling van het Centraal Laboratorium wordt uitgeoefend, nog voor verbetering vatbaar is. Wanneer ik in dit hoofdstuk dus eenigszins uitvoerig op de drie bovengenoemde kweekmethodes inga, is dit slechts omdat deze juist in gebruik zijn op de bovengenoemde afdeling.

De ENDO-plaat is in de bacteriologische typhusdiagnostiek steeds een zeer belangrijk hulpmiddel gebleken. De samenstelling er van is te algemeen bekend, dan dat deze hier nog eens vermeld behoeft te worden. Hetzelfde kan van de LENZ- en TIETZ-plaat gezegd worden.

Op de bacteriologische afdeling van het Centraal Laboratorium voor de Volksgezondheid te Utrecht werd tot voor enkele jaren het onderzoek van faeces als volgt verricht: van de ingekomen faeces werd een kleine hoeveelheid in physiologische keukenzoutoplossing gebracht en tot een gelijkmatige brij gemengd. Na eenige uren werd van de bovenstaande troebele vloeistof één druppel gebracht op een



ENDO-plaat en één op een LENZ- en TIETZ-plaat. Met een glazen spatel werden de druppels uitgestreken. De druppel op de ENDO-plaat werd ook nog over een 2de ENDO-plaat uitgestreken.

Na 24 uur werden de ENDO-platen afgelezen en verdachte kolonies afgeënt. De malachietgroenplaten werden na 24 uur overgoten met eenige cc. physiologische zoutoplossing. Na ongeveer een half uur werd dan van de oppervlakte een druppel afgeënt op een ENDO-plaat, welke weer op de gewone wijze werd behandeld.

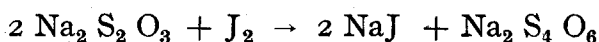
De resultaten met deze werkwijze bij het faecesonderzoek verkregen, zijn in de volgende tabel overzichtelijk weergegeven:

Jaar	Aantal onderzoeken	Positieve uitkomsten		Totaal der positieve uitkomsten
		Typhus bacillen	P. Typhus bacillen	
1923	1272	32	44	76 = 6 %
1924	1463	23	61	84 = 5,7 %
1925	1589	44	120	164 = 10,3 %
1926	2415	95	123	218 = 9,02 %

Wanneer men nu bedenkt, dat in 1924 van de positieve Widals 62,4 % op een typhusinfectie wees, terwijl bij het faecesonderzoek slechts 23 maal typhusbacillen en 61 maal paratyphusbacillen werden gevonden, dan is het te begrijpen dat BIJL en VAN DER HOEDEN zeggen: „Toch blijft het feit bestaan, dat naar verhouding t.o.v. den paratyphus te weinig positieve uitkomsten van typhus zijn te boeken. Men moet dus aannemen, dat het gebrek aan een specifieke aankweekmethode voor typhusbacillen zich nog steeds doet gevoelen”.

VAN DER HOEDEN verrichtte daarom een reeks onderzoeken met de door LÉON MULLER beschreven aankweekmethode voor typhus- en paratyphusbacillen. Dit „milieu d'enrichissement” wordt op de volgende wijze bereid. Een ERLEMEYER-kolf, waarin 4,5 gram krijt is gedaan, wordt gesteriliseerd; op het krijt worden 90 cc. steriele bouillon gegoten en na homogene menging achtereenvolgens toegevoegd 10 cc. eener gesteriliseerde oplossing van natriumthiosulfaat (pur. cryst. 50 gram plus water tot 100 cc.) en 2 cc. oplossing van jodium in joodkali (25 gram jodium plus 20 gram joodkali met water bijvullen tot 100 cc.). Dit mengsel wordt onder

voortdurend opschudden verdeeld in cultuurbuisjes à 15 cc., waarna deze buisjes ter contrôle op steriliteit ongeveer 24 uur in de broedstoof van 37° worden geplaatst. Bij dit procédé wordt de werkende anorganische stof (tetrathionaat), die labiel is voor verhitting, telkens opnieuw bereid, hetgeen verloopt volgens onderstaande formule:



Aangezien een groote overmaat thiosulfaat aanwezig is, wordt zeker alle jodium opgebruikt en zal ook de eventueel uit de JK afgesplitste J worden gebonden. Het  $\text{CaCO}_3$  dient om de bouillon blijvend te neutraliseeren en kleine hoeveelheden  $\text{SO}_2$ , die door ontleding van het tetrathionaat en thiosulfaat kunnen ontstaan, vast te leggen.

MULLER werkte zelf met suspensies van culturen van typhus- en paratyphusbacillen, welke hij in deze buisjes bracht; na 24 uur werd een druppel uit het buisje op een ENDO-plaat uitgestreken; hiervan werden dan na 24 uur verdachte kolonies voor verder onderzoek afgeënt.

In 24 uur oude culturen van mengsels van coli- en typhusbacillen vond MULLER in zijn voedingsbodem uitsluitend typhusbacillen terug, terwijl in een contrôle bouilloncultuur ongeveer 80 maal zooveel coli- als typhusbacillen werden aangetroffen. Mengsels van coli- en paratyphusbacillen gaven een weliswaar minder kras beeld, maar toch groeiden uit de MULLER-buisjes steeds 5 à 6 maal minder coli- dan paratyphusbacillen.

Deze uitkomsten waren dus bijzonder gunstig. Aangaande de waarde van zijn proefnemingen moet echter eenig voorbehoud worden gemaakt, daar door hem nooit met patiëntenmateriaal gewerkt werd, maar steeds met reïnculturen of mengsels van reïnculturen.

ROSEN, WAGNER SACHAROWA en SABOLEWA pasten deze methode voor het eerst in de praktijk toe. In totaal onderzochten zij 362 monsters, waarvan 87 afkomstig waren van zieken en 275 van gezonden. Uit de 87 monsters, welke van patiënten afkomstig waren, werd 40 × een typhus- of paratyphusbacil geïsoleerd. (46%). Uit de andere 19 maal (6.9%); 18 maal werden alleen met de methode van MULLER typhus- of paratyphusbacillen gevonden.

Deze gunstige resultaten waren voor VAN DER HOEDEN

aanleiding om deze proeven te herhalen. Met reïnculturen werkend verkreeg hij ongeveer dezelfde resultaten als MULLER. Het bezwaar, dat door den groei in de MULLER-buis de agglutineerbaarheid der bacillen sterk geschaad zou worden (ROSEN, WAGNER en SABOLEWA) kon hij niet bevestigen. Alle typhus- en paratyphusstammen uit de MULLER-buizen afkomstig, werden minstens zoo sterk geagglutineerd als die van de ENDO. Ook stelde VAN DER HOEDEN vast, dat de groei van dysenteriebacillen ongunstig door de tetrathionaat wordt beïnvloed.

Hierna ging hij over tot het onderzoek van patiëntmateriaal. Voorloopig werden door hem 210 faecesmonsters volgens de gebruikelijke methode van de bacteriologische AFDEELING VAN HET C.L. en volgens de methode MULLER nagegaan. Van de te onderzoeken ontlasting werd een weinig in physiologische zoutoplossing gebracht en fijn gemaakt. Na eenige uren werd van het oppervlak eenige druppels gebracht in een MULLER-buisje. Dit werd daarna goed geschud, zoodat het krijt regelmatig door de geheele bus verdeeld was, en daarna 20 uur bij 37° gezet. Daarna werd van de oppervlakte een druppel op een ENDO-plaat gebracht en uitgestreken. Na 24 uur werden hiervan verdachte kolonies afgeënt, of, indien direct een reïncultuur aanwezig was, eigenschappen ingezet en agglutinatieproeven verricht.

Van de 210 faecesmonsters waren er 30 afkomstig van gezonde personen, die niet verdacht werden van typhoid. De onderdrukking van den groei der colibacillen was in bijna alle gevallen zeer sprekend. Het aantal colikolonies van de in MULLER-buisjes uitgezaaide faeces was veel geringer dan dat op de LENZ- en TIETZ-plaat en bovendien groeiden de colikolonies volgens de eerste methode zelden uit boven een speldeknopgrootte afmeting, waardoor de overige kolonies niet verdrongen werden en minder roodkleuring van de plaat door diffusie optrad.

De hinderlijke groei van proteusbacillen werd echter niet geschaad, zulks in tegenstelling met de opgave van MULLER. Slechts éénmaal werd van de directe ENDO-plaat een typhusbacil gekweekt, die niet ook volgens de methode van MULLER werd opgespoord. Daarentegen werd in 9 gevallen alleen een positieve uitkomst verkregen volgens MULLER. Ook bij het onderzoek van urine maakte VAN DER HOEDEN gebruik van

de MULLER-buisjes. In enkele gevallen werden op de directe ENDO-plaat geen typhus- of paratyphusbacillen gevonden, terwijl zij in groot aantal groeiden uit het MULLER-buisje.

Tijdens mijn assistentschap aan het Laboratorium voor Gezondheidsleer te Amsterdam onderzocht ik op deze wijze een aantal faeces van patiënten, die in het Wilhelminagasthuis met typhus waren opgenomen.

Deze oriënteerende onderzoeken gaven mij ook den indruk, dat deze nieuwe methode een belangrijke aanwinst is.

Naar aanleiding van de resultaten, welke VAN DER HOEDEN met het „milieu d'enrichissement" verkreeg, werd op de bacteriologische afdeling van het C.L. deze wijze van onderzoek als routinemethode ingevoerd, terwijl het uitstrijken op de LENZ- en TIETZ-platen in het vervolg bij het onderzoek achterwege werd gelaten.

Ook in verschillende andere laboratoria in Nederland wordt deze methode regelmatig toegepast. Tevens wordt echter door alle bacteriologen erop gewezen, dat de directe uitstrijk op de ENDO-plaat niet gemist kan worden, daar aanwezige proteusbacillen een enting in de MULLER-buis waardeloos maken. Ook op het C.L. ondervinden we bijna iederen dag de gevolgen van dezen goeden groei der proteusbacillen in den MULLER-bouillon. (Niettegenstaande dit feit steeg in 1927 tengevolge van de invoering van dezen voedingsbodem het aantal positieve resultaten tot 11,37%. In 1899 onderzochte faecesmonsters werden 109 maal typhus- en 107 maal paratyphusbacillen gevonden).

De ervaringen van PESCH en KORTENHAUS met den tetrathionaatvoedingsbodem gaan over een totaal van 3657 onderzoeken in 1928 verricht. Ook zij zijn zeer tevreden met de verkregen resultaten. In totaal werden 601 positieve resultaten genoteerd (16.4%). Hiervan werden er 366 zoowel van de directe ENDO als door de MULLER-buis vastgesteld, terwijl 220 maal alleen deze laatste een positief resultaat gaf. Slechts 15 maal was alleen de directe ENDO positief.

Het gunstigst was het resultaat voor de paratyphus-onderzoeken. Van 535 positieve Paratyphus B uitkomsten waren er 204 alleen verkregen door den tetrathionaatbouillon; slechts 5 alleen door de directe ENDO; 326 maal waren beiden positief. Ook hier werd af en toe hinderlijke groei van proteus ondervonden.

CLAUBERG meent, dat het aantal positieve resultaten in evenredigheid met het aantal gebruikte voedingsbodems toeneemt. Een bijzondere voorkeur voor den tetrathionaatbodem heeft hij niet.

RUYS onderzocht in  $1\frac{1}{2}$  jaar in het Laboratorium van den Geneeskundigen- en Gezondheidsdienst te Amsterdam 1100 faecesmonsters. 81 maal werd een positieve uitkomst verkregen, waarvan 17 maal uitsluitend na aankweeking in den MULLER-voedingsbodem. Bij 14 onderzoekingen echter was de directe ENDO-plaat positief, terwijl de entingen van de MULLER-buis negatief bleven. Bij een deel van bovengenoemde 14 onderzoekingen, waarbij alleen de directe ENDO-plaat een positief resultaat gaf, was de oorzaak van het falen der MULLER-methode gelegen in het aanwezig zijn van proteusbacillen.

Tot slot wil ik nog een kort geleden gepubliceerd artikel vermelden van GEORG IVANOVICS. IVANOVICS verrichtte uitgebreide onderzoekingen over de werking van verschillende chemicaliën op den groei van darmbacteriën. Hij gebruikte malachietgroen, brillantgroen, galkristalviolet, natriumseleniet en natriumtetrathionaat. Hij stelde vast, dat de vermeerdering der typhus- en paratyphusbacillen in een omgeving waar tetrathionaat aanwezig is, belangrijk sterker is dan bij aanwezigheid van een van de andere chemicaliën. Bovendien stelde hij vast, dat colibacillen het gevoeligst zijn voor de tetrathionaat; zij vermeederen zich bij aanwezigheid van deze stof niet. Ten opzichte van malachietgroen was het gedrag van de colibacillen wisselend, soms werd de groei er door belet, soms geremd, maar soms ook was deze zeer intensief. Samenvattend zegt IVANOVICS: „Wenn wir unter den zur Anreicherung des Typhusbazillus gebrauchten Methoden nur auf den Colibazillus Rücksicht nehmen, so ist die MULLERSche Natrium-Tetrathionatbouillon in idealer Weise geeignet. Ein gutes Ergebnis erzielen wir auch mit Natrium-Selen-Bouillon während Brillantgrün und Malachitgrün sich besonders für Paratyphus geeignet erweisen”. In een volgende mededeeling geeft IVANOVICS een overzicht van zijn proeven met patiëntenfaeces en met kunstmatig geïnfecteerde faeces. Vooral bij deze laatste bleek de geschiktheid van den MULLER-voedingsbodem boven de anderen.

In het algemeen kan dus gezegd worden, dat, indien in

menschelijke faeces geen proteusbacillen voorkwamen, de MULLER-buis een bijna ideaal hulpmiddel zou zijn bij het vinden van typhus- en paratyphusbacillen.

Het is dus te begrijpen, dat nu onderzoeken volgen met als doel de belemmering van den groei van den proteus in de MULLER-buis.

SPETH vond, dat het ESBACH-reagens (1% pikrinezuur plus 2% citroenzuur) aan een voedingsbodem in een concentratie van 2% toegevoegd, den groei van alle proteus volkomen onderdrukt.

RUVS probeerde nu, om door middel van dit reagens den groei van den proteus in den MULLER-bouillon te onderdrukken. Aanvankelijk voegde zij ESBACH-reagens aan den tetrathionaatbouillon toe; hierdoor werd de groei van den proteus echter niet geremd. Meer succes bereikte zij met een brillantgroen voedingsbodem, waaraan zij nog 2% ESBACH's reagens toevoegde. De voedingsbodem was als volgt bereid: „bij gewonen vleeschbouillon van PH 7,5 voegt men brillantgroen B (GRÜBLER) 1 : 100.000 en ESBACH's reagens 2%; hiervan wordt ongeveer 15 cc. in buizen afgetapt, deze worden evenals MULLER-buizen geënt, dan wordt na 5 en na 24 uur bij 37° C., van het oppervlak een druppel gebracht op een ENDO-plaat en uitgestreken. Ent men nu deze voedingsbodems met mengsels van culturen van typhus-, coli- en proteusbacillen, dan blijkt, dat in den regel proteus sterk onderdrukt wordt; steeds waren van deze platen de typhusbacillen in reïncultuur te kweken. De colibacillen worden soms meer, soms minder onderdrukt; zij verdwijnen echter nooit geheel. Mengt men paratyphus B bacillen met coli- en proteusbacillen, dan worden nu behalve de proteus- ook de colibacillen sterk onderdrukt, zoodat men een belangrijk overwogen der paratyphuskolonies krijgt. Ent men een brillantgroen-ESBACH-voedingsbodem op dezelfde wijze als de MULLER-buizen, dan krijgt men, indien proteusbacillen aanwezig zijn, deze na afenting op ENDO-platen niet meer te zien. De vermeerdering der typhusbacillen is in den regel minder sterk dan in den tetrathionaatvoedingsbodem. Neemt men echter faeces met paratyphus B bacillen, dan is het resultaat voor beide voedingsbodems even goed; in den brillantgroen-ESBACH-voedingsbodem wordt bovendien de proteus geremd. Indien na 5 uur ook afgeënt wordt, bestaat de mogelijkheid

zelfs, dat de uitslag 24 uur eerder positief wordt dan die van de MULLER-buis.

RUYS besluit hieruit tot het volgende: „terwijl deze methode dus voor het paratyphus B onderzoek voldoet, is dit niet geheel het geval voor het isoleeren der typhusbacillen. Het is mij echter wel mogelijk gebleken van een ENDO-plaat, waar de typhuskolonies geheel overgroeid zijn door proteusbacillen, steeds typhusbacillen in 24 uur zuiver te kweken. Hiertoe wordt van den top van een bleeke kolonie met de punt van een naald geënt in de brillantgroen ESBACH-buis. Na een verblijf van 5 uur bij 37° C. kan dan hiervan op ENDO-platen uitgezaaid worden. Steeds zijn dan den volgenden dag de typhuskolonies af te enten, hetzij dat deze in reïncultuur op de platen voorkomen, hetzij tusschen een enkele niet uitgezwermde proteuskolonie. Op vele tientallen proeven is dit nooit mislukt.

Het onderzoek van RUYS laat dus duidelijk zien, dat de MULLER-buis vooral voor het typhusonderzoek nog steeds vooraan staat en zeker niet vervangen kan worden door den brillantgroenvoedingsbodem.

Deze laatste is meer als aanvulling bedoeld in gevallen waarin de MULLER-buis ons in den steek laat.

#### EIGEN ONDERZOEK.

Daar door vele onderzoekers de voedingsbodem van MULLER als een waardevolle aanwinst in de typhusdiagnostiek wordt genoemd, werd door mij aanvankelijk getracht verbeteringen aan te brengen met behoud van dezen voedingsbodem.

De eigen proefnemingen waren er dus ook op gericht den groei en het uitzwermen van de proteusbacillen te belemmeren of te beletten.

#### TOEVOEGING VAN KOPERSULFAAT.

Door ALLISON en AYLING werd kopersulfaat gebruikt in een voedingsbodem voor het kweken van diphteriebacillen. Zij zeggen hierover het volgende: „Swabs from the ear, in a large proportion of cases, give a growth of a spreading organism of the B. proteus type ..... It was this latter consideration which led us to carry out some experiments

to see if the spread of *B. proteus* could be inhibited. The method used was to examine the effect on the growth of *C. diphtheriae* and *B. proteus* of different antiseptics, added in varying dilutions to T.S.T. agar; brilliantgreen and several antiseptics belonging to the flavinegroup were tried without success. One of us suggested the use of a solution of copper-sulphate, and it was found that this salt added to T.S.T.-agar in a dilution of 1 : 2000 was effective in inhibiting the spread of *B. proteus* and yet had no effect on the growth of *C. diphtheriae*".

Deze mededeeling bracht mij er toe te trachten door toevoeging van kopersulfaat aan de ENDO-plaat het zwermen van proteus ook hier te beletten. Aan 100 cc. gesmolten 3% agar voegde ik achtereenvolgens toe 1 gram melksuiker, 0,5 cc. verzadigde alcoholische fuchsineoplossing, 2,5 cc. 10% natriumsulfiet, 1 cc. 10% sodaoplossing en  $\frac{1}{2}$  cc. van een 10% kopersulfaatoplossing. Hierna werden platen gegoten. Op deze platen, welke een roode kleur hadden, werden nu coli-, typhus-, paratyphus-, proteus vulg.- en proteus X 19 bacillen geënt. Na 24 uur bij 37° te hebben gestaan was de roode kleur der platen sterk toegenomen; wel waren ze nog doorschijnend.

Het bleek mij, dat de typhusbacillen niet gegroeid waren; op de plaat, geënt met paratyphusbacillen, waren enkele zeer kleine kolonies opgekomen. Ook colibacillen gaven kleine kolonies; pas na 2 × 24 uur vertoonden enkele van deze kolonies metaalglans. De proteusbacillen waren vrij goed gegroeid, maar niet uitgezwermd. De proteus X 19 bacillen hadden zeer kleine niet-zwermende kolonies gegeven. De contrôleëntingen op gewone ENDO-platen waren alle goed gegroeid; de proteusbacillen waren uitgezwermd.

Nu werd na toevoeging van 0.5 cc. 10% kopersulfaat aan de ENDO de PH weer gebracht op 7.8. Ook deze platen hadden een roode kleur en waren doorschijnend. Proteusbacillen groeiden hier niet zwermend op, terwijl paratyphusbacillen zeer kleine kolonies vormden. De verandering van de PH door toevoeging van het kopersulfaat was dus niet van groot belang voor het zwermen, daar terugbrenging van de PH tot ongeveer 7.8 niet in staat was het zwermen weer te doen optreden. Daar typhusbacillen dus bij een concentratie van 1/2000 kopersulfaat niet groeiden, werd door mij de hoeveelheid



kopersulfaat, welke aan de 100 cc. ENDO-vloeistof werd toegevoegd, verminderd. Aan verschillende hoeveelheden van 100 cc. ENDO-vloeistof werden nu respectievelijk 0.4, 0.3, 0.2 en 0.1 cc. van een 10 % kopersulfaatoplossing toegevoegd. Hiervan werden vervolgens platen gegoten. Op deze platen werd van suspensies van 8 verschillende proteusstammen, een typhus- en een colistam een oogje uitgestreken. Na 24 uur waren typhusbacillen op de platen met 0.1 cc. kopersulfaat goed gegroeid. Bij 0.2 waren de kolonies kleiner. Op de platen met 0.3 cc. kopersulfaat waren nog zeer kleine typhuskolonies te zien. Op die met 0.4 cc. was na 24 uur geen groei waar te nemen. De colibacillen waren bij 0.1 cc. kopersulfaat goed gegroeid. Bij 0.2 waren de kolonies kleiner, bij 0.3 waren nog enkele speldeknopgrootte kolonies te zien. De proteus X 19 bacillen groeiden bij 0.1 kopersulfaat goed zonder te zwermen. Bij stijgende hoeveelheid kopersulfaat werden de kolonies steeds kleiner. Groei kwam echter op alle platen voor. De zeven andere proteusstammen zwermde alle bij 0.1 en 0.2. Bij 0.3 deed dit slechts èèn stam. Bij 0.4 zwermde geen stam meer. Zelfs bij het laagste gehalte aan kopersulfaat waren de platen na 24 uur bij 37° C. echter donkerrood geworden; er was dan ook geen verschil te zien tusschen typhus- en colikolonies. Uit deze proefnemingen bleek, dat de typhusbacillen bijna niet meer groeiden bij een concentratie van het kopersulfaat, waarbij het zwermen van de proteusbacillen werd belet. Door toevoeging van kopersulfaat werd dus geen bruikbaar resultaat verkregen.

#### TOEVOEGING VAN CARBOL OF ZUUR.

VAN DER HOEDEN voegde aan de ENDO-platen 0.1 % carbol toe, maar kon hiermede geen afleesbare platen krijgen, daar ook hier de ENDO-plaat donkerrood werd. Door mij werden op ENDO-platen, welke 0.1 % carbol bevatten, 8 proteusstammen van verschillende herkomst, een typhus- en een colistam geënt. Na 24 uur bleek, dat de typhuskolonies als kleine puntjes gegroeid waren. De colikolonies waren iets grooter. Proteus X 19 bacillen groeiden goed zonder te zwermen. Van de zeven overige proteusstammen zwermde er vier. We zien dus, dat er bij een carbolconcentratie, waarbij de typhusbacillen na 24 uur maar speldepuntgrootte kolonies

geheel helder gebleven. Bij 0.33% was de groei der typhusbacillen ongeveer gelijk aan dien in gewonen glucose-bouillon.

Indien uit het buisje met 0.33% theobromine een oogje werd uitgestreken op een ENDO-plaat, welke eveneens 0.33% theobromine bevatte, bleek na 24 uur, dat de proteusbacillen hadden gezwermd. Ook hier dus geen belemmering in het zwermvermogen.

Theophilline was het derde preparaat, waarmede eenzelfde proef werd genomen. Het resultaat was echter niet beter; de typhusbacillen groeiden niet bij 0.66% theophilline, wel bij 0.33%. Op ENDO-platen met 0.33% theophilline zwermde de proteusbacillen echter weer, zoodat ook hiermede geen resultaat werd verkregen; ik beëindigde daarom de proefnemingen met deze stoffen.

#### TOEVOEGING

##### VAN PROTEUSBACTERIOPHAAG AAN DE MULLER-BUIS.

Een volgende poging om den proteus te schaden werd door mij gedaan met behulp van den proteusbacteriophage. Het lag n.m.l. in mijn bedoeling, door toevoeging van proteusbacteriophage aan den MULLERSCHEN tetrathionaatbouillon, de ontwikkeling van de proteusbacteriën in de eerste 24 uur onmogelijk te maken. (VEDDER trachtte vroeger reeds deze proeven te doen, maar het gelukte hem niet een proteusbacteriophage te verkrijgen. Het oorspronkelijke denkbeeld proteusbacteriophage aan te wenden om den groei van den proteus te beletten is echter van hem afkomstig.) Alvorens hiertoe te kunnen overgaan was het noodzakelijk de beschikking over een goed werkenden proteusbacteriophage te hebben. Door de welwillendheid van collega VEDDER te Amsterdam kwam ik in het bezit van een sterk werkenden Proteus X 19 bacteriophage.

Buisjes glucosebouillon, welke geënt waren met 12 tot 14 uur oude proteus X 19 culturen, zoo dat een lichte troebeling ontstaan was, waren, na 24 uur bij 37° te hebben gestaan, volkomen helder geworden.

Nu werden 23 proteusstammen van ENDO-platen, welke uit den MULLER-bouillon geënt waren, afgezonderd. Van 12 uur oude culturen van deze stammen werd vervolgens in glucosebouillon geënt, zoodat een lichte troebeling zichtbaar

was, waarna aan iedere buis twee druppels proteus X 19 bacteriophag werden toegevoegd. Vervolgens werden deze buisjes bij 37° C. geplaatst en na 6 en 24 uur de groei der proteusbacillen afgelezen. Reeds na 6 uur was de troebeling in alle buisjes belangrijk toegenomen. Na 24 uur waren alle buisjes sterk troebel. Ook na 2 × 24 uur bleef dit het geval. Uit ieder buisje werd na 24 uur een druppel uitgestreken op een ENDO-plaat. Deze werd na 24 uur afgelezen. Op alle platen was de proteus uitgezwermd. Er waren geen plages te zien. Deze proef werd nogmaals herhaald, maar nu werden slechts een zeer geringe hoeveelheid proteusbacillen in ieder bouillonbuisje gebracht; een troebeling was in de buisjes dan ook niet te zien. Na 12 en 24 uur kon in alle buisjes echter duidelijk groei van de proteusbacillen worden vastgesteld. Ook op de ENDO-platen, welke vanuit deze buisjes geënt werden, was geen spoor van een bacteriophag te bespeuren. Het was dus duidelijk, dat de proteus X 19 bacteriophag niet op gewone proteusstammen werkt, maar alleen op proteus X 19 stammen.

Nu werd getracht met behulp van dezen proteus X 19 bacteriophag een gewonen proteusbacteriophagteverkrijgen. Hiertoe werd in een kolfje met 100 cc. glucosebouillon van een jongen proteusstem geënt en hieraan 2 cc. proteus X 19 bacteriophag toegevoegd. Na 24 uur werd van deze cultuur een druppel op een agarplaat uitgestreken en de rest daarna gefiltreerd door een SEITZ-filter onder een negatieven druk van 10 m.M. kwik. Nu werd van denzelfden proteusstem van een 16 uur oude cultuur wederom geënt in 100 cc. glucosebouillon en hieraan toegevoegd 2 cc. van het filtraat van den eersten 100 cc. glucosebouillon. Na 24 uur werd weer een druppel geënt op een agarplaat. De plaat, welke 24 uur tevoren was uitgestreken, werd nu nagegaan op de aanwezigheid van plages. Deze waren niet aanwezig. Iederen dag werd op deze wijze een filtraat bereid, waarvan dan weder een kleine hoeveelheid aan een nieuwe kolf glucosebouillon, welke geënt was met ongeveer 16 uur oude proteuscultuur, werd toegevoegd. Na 24 uur werd dan weer geënt op een agarplaat en na nog eens 24 uur werd deze plaat afgelezen om e.v.t. aanwezige plages te kunnen vaststellen.

Na 18 dagen was het echter nog niet gelukt een bacteriophag voor den gebruikten proteusstem te verkrijgen. Hierna werden deze filtraatproeven gestaakt.

Vervolgens werd getracht in een mengsel van bacteriophagen, afkomstig van „le laboratoire du bacteriophage” te Parijs, een proteusbacteriophage aan te toonen. Hiertoe werden in buisjes glucosebouillon de bovenvermelde proteusstammen geënt en bovendien een proteus X 19 cultuur. Bij ieder van de buisjes werd vervolgens een druppel van het mengsel van bacteriophagen gedaan. Na 24 uur bij 37° te hebben gestaan, werd de groei in de buisjes nagegaan. Alle buisjes waren sterk troebel geworden; alleen het buisje, waarin de proteus X 19 cultuur geënt was, was volkomen helder. Vervolgens werd van ieder buisje een druppel uitgestreken op een agarplaat. Na 24 uur waren alle platen sterk overgroeid met proteus; geen plagues waren aanwezig. Alleen op de plaat, welke betrekking had op het buisje met proteus X 19 cultuur, was geen groei ontstaan. Het filtraat van dit buisje werd gebracht bij een ander buisje glucosebouillon, waarin dezelfde proteus X 19 stam geënt was. Dit buisje was na 24 uur bij 37° C. te hebben gestaan, nog geheel helder, terwijl een contrôlebuisje dat eenzelfde hoeveelheid proteus X 19 cultuur bevatte, na 24 uur sterk troebel was geworden. De proef met de 23 proteusstammen werd nogmaals herhaald. Ook nu kon echter geen proteusvulgarisbacteriophage worden aangetoond. De in het mengsel aanwezige proteusbacteriophage was ook nu weer een proteus X 19 bacteriophage en werkte op geen der 23 gewone proteusstammen. Nu werd getracht uit grachtwater een proteusbacteriophage te isoleren. Hiertoe werden watermonsters, uit den Catharijnesingel, de Oude Gracht en het Merwedekanaal te Utrecht genomen, door een SEITZ-filter bij een negatieven druk van ongeveer 10 m.M. kwik gefiltreerd. Van 12 uur oude culturen van de boven beschreven 23 proteusstammen werd nu geënt in glucosebouillon, zoodat een lichte troebeling ontstond. Van ieder filtraat werden nu twee druppels toegevoegd aan ieder geënt buisje. Eenzelfde rij buisjes, met dezelfde proteusstammen geënt, werden als contrôle gebruikt en niet met filtraat gemengd. Na 6 en 24 uur werd de troebeling, door den groei ontstaan, afgelezen. Deze was voor de buisjes met filtraat dezelfde als voor de buisjes zonder filtraat. Uit ieder buisje werd na 24 uur een druppel uitgestreken op een agarplaat. Deze platen werden na 24 uur afgelezen; er werden geen plagues waargenomen. Dezelfde proef, verricht met nieuwe

watermonsters uit dezelfde kanalen genomen, gaf eenzelfde uitkomst. Ook van collega VEDDER te Amsterdam vernam ik, dat het hem niet gelukt was uit het grachtwater der stad een proteusbacteriophagaag te isoleeren.

Dank zij de welwillendheid van het vroeger genoemde laboratorium te Parijs kwam ik tenslotte in het bezit van een bacteriophagaag, welke op een gewonen proteus vulgarisstam werkte. Op de gebruikelijke wijze werd deze bacteriophagaag nu op de vroeger geïsoleerde 23 proteus-vulgarisstammen op zijn werking onderzocht. Het resultaat was, dat deze bacteriophagaag op 15 van de 23 stammen bleek te werken. Een cultuur van proteus X 19 werd door dezen bacteriophagaag niet aangestast. Deze uitkomst gaf aanleiding nu na te gaan of ook in den MULLERSCHEN tetrathionaatvoedingsbodem deze bacteriophagaag zijn werking zou ontplooien. In MULLER-buisjes werden nu de 23 proteusstammen geënt en bij ieder buisje 5 druppels bacteriophagaag gevoegd. Contrôle MULLER-buisjes zonder bacteriophagaag werden hiernaast geplaatst. Na 20 uur waren dezelfde 15 stammen als bij de eerste proefneming niet gegroeid; de contrôlebuisjes waren allen sterk troebel geworden. Op platen uitgezaaid werd dit resultaat bevestigd; wel waren op verschillende platen proteuskolonies opgekomen, maar deze zwermden niet. Regelmatig werd steeds gecontroleerd of de groei in de verschillende andere buisjes wel door proteus werd veroorzaakt. Verontreinigingen kwamen niet voor. Nu werden in twee MULLER-buizen proteus- en typhusbacillen geënt (er werd een proteusstam gebruikt, waarop de bacteriophagaag bleek te werken); vervolgens werd aan een van de beide buizen 5 druppels bacteriophagaag toegevoegd. Na 24 uur werd op ENDO-platen van iedere buis een oogje uitgestreken. De plaat, welke betrekking had op de buis, waarin geen bacteriophagaag aanwezig was, bleek geheel door den proteus overgroeid te zijn. Op de andere plaat waren twee soorten kolonies aanwezig in ongeveer gelijk aantal, n.m.l. kleine heldere, doorschijnende en grotere licht roode, troebele. De kleine kolonies bleken cultureel en serologisch typhusbacillen te zijn. De groote kolonies waren niet-zwermende proteusbacillen. Zelfs na 6 maal overgeënt te zijn op schuine agarbuizen kregen deze proteusbacillen hun vermogen om te zwermen niet terug. Alvorens nu dezen bacteriophagaag toe te voegen aan de MULLER-buisjes, welke met faecessuspensies

waren geënt, werd eerst nog nagegaan of de verkregen bacteriophag niet op typhusbacillen werkte. Hiertoe werden 10 typhusstammen geënt in glucosebouillonbuisjes en hierbij 5 druppels bacteriophag gedaan. Na 24 uur werd op een ENDO-plaat een druppel uit ieder buisje uitgestreken; 24 uur later werd afgelezen. Er was geen spoor van bacteriophagwerking vast te stellen. Ook op 8 paratyphusstammen bleek deze bacteriophag niet te werken. Nu werd overgegaan tot het onderzoek van patiëntenmateriaal. Naast de MULLER-buisjes, welke geënt waren met faecessuspensie, werd nu een rij MULLER-buisjes met 5 druppels bacteriophag, geënt met dezelfde faecessuspensies, gedurende 20 uur in de broedstoof bij 37° C. geplaatst. Na 20 uur werd uitgestreken op ENDO-platen, welke na 24 uur werden afgelezen. In de eerste plaats werd nu nagegaan of van beide platen, van éénzelfde faecesmonster afkomstig, typhus- of paratyphusbacillen konden worden gekweekt. In de tweede plaats kon worden nagegaan of proteusbacillen, welke de eene plaat hadden overgroeid, dit ook op de andere plaat hadden gedaan.

Daar het soms door buitengewone drukte niet mogelijk was, alle faecesmonsters tweemaal te behandelen, daar hiertoe zowel tijd als materiaal ontbrak, werden dan de faecesmonsters, waarin proteusbacillen aanwezig bleken te zijn, waardoor dus de ENDO-plaat van de MULLER-buis afkomstig, vrijwel steeds niet af te lezen was, nogmaals in een MULLER-buis geënt, echter nu met bacteriophag. Hierdoor werd dus geen volkomen zuivere vergelijking mogelijk, daar deze faecesmonsters dus weer twee dagen langer hadden gestaan, alvorens nogmaals behandeld te worden, maar wel kon worden vastgesteld of de proteusbacillen in hun uitzwermvermogen en groei konden worden belemmerd.

In het totaal werden in de MULLER-buisjes met bacteriophag 512 monsters onderzocht. Hiervan waren er 419 gelijktijdig onderzocht in MULLER-buisjes zonder bacteriophag. Van de overige 93 werd eerst in deze buisjes geënt, toen gebleken was, dat de ENDO-plaat, welke op de gewone MULLER-buis betrekking had, door proteusbacillen was overgroeid. Op de ENDO-platen, afkomstig van de 419 MULLER-buisjes zonder bacteriophag, kwam zwermende proteus 29 keer voor. Hierdoor werd deze plaat voor het verdere onderzoek

waardeloos. We kunnen dus aannemen, dat gemiddeld ongeveer 1 van iedere 15 platen door proteus wordt overgroeid. Van deze 29 faecesmonsters was in 20 gevallen ook de ENDO-plaat, waarop uitgestreken was vanuit de MULLER-buis met proteusbacteriophag, overzwermd door proteus. In 9 gevallen was deze plaat nu goed af te lezen. Deze uitkomsten waren dus veel ongunstiger dan die met de reinculturen van proteus en bacteriophag verkregen. In een van deze 9 gevallen konden verdachte kolonies worden afgeënt, welke cultureel en serologisch typhusbacillen bleken te zijn. Ook in de urine van dezen patiënt waren typhusbacillen gevonden, terwijl de agglutinatieproef volgens WIDAL 1 : 500 positief voor typhus was. Van de 390 platen, welke geen proteusbacillen bevatten, werden 19 maal typhus- of paratyphusbacillen gekweekt en wel steeds van beide platen, zoodat hieruit nog eens duidelijk bleek, dat deze proteusbacteriophag geen nadeeligen invloed op den groei van typhus- en paratyphusbacillen heeft. Het aantal positieve uitkomsten was hier beneden het gemiddelde, daar in deze onderzoekingen een groot aantal contrôles van gezonde personen eener vleeschfabriek waren opgenomen, waardoor het percentage positieve resultaten laag werd.

Van de 93 faecesmonsters, welke niet gelijktijdig waren onderzocht, werden, nadat opnieuw geënt was in MULLER-buisjes (welke nu dus bacteriophag bevatten), 30 ENDO-platen verkregen, welke goed afleesbaar waren. De overige platen waren ook nu niet af te lezen. Van deze 30 platen werden 1 maal paratyphusbacillen en 2 maal typhusbacillen in reincultuur gekweekt. Van een van deze twee gevallen zijn microphoto's vervaardigd. (Zie fig. 1 en 2.) Een geval betrof een kind van  $\frac{1}{2}$  jaar, dat stervende, met een ernstige darmaandoening in een ziekenhuis was opgenomen. Kort na het overlijden werden nog faeces ter onderzoek ingezonden, welke eerst op de gewone wijze werden nagegaan. Door de aanwezigheid van proteusbacillen leidde dit onderzoek niet tot eenig resultaat. Wel echter met behulp van den proteusbacteriophag. Nu konden paratyphusbacillen worden geïsoleerd. Daar men ook na den dood van het kind in het onzekere verkeerde over den aard van de aandoening, was het verkregen resultaat dus zeer waardevol. In de beide andere gevallen was de agglutinatie voor typhus 1 : 500 positief; er

werden uit faeces en urine geen typhusbacillen geïsoleerd, daar beiden waren besmet met proteus. Met behulp van den bacteriophagaag gelukte het uit de faeces typhusbacillen te isoleren. In het geheel werd dus in een viertal gevallen een resultaat verkregen, dat niet bereikt kon worden met de tot nu toe gebruikte methoden van onderzoek.

Uit de onderzoeken bleek dus, dat van de 122 maal, dat proteusbacillen aanwezig waren, deze 39 maal door den proteusbacteriophagaag zóó in hun groei konden worden belemmerd, dat geen uitzwerming meer optrad. Door toevoeging van den proteusbacteriophagaag kan dus  $\pm 1/3$  deel van de niet af te lezen ENDO-platen afleesbaar gemaakt worden.

#### DE VOEDINGSBODEM VAN RUYS.

Tenslotte werd nog een aantal faecesmonsters onderzocht met behulp van den voedingsbodem volgens RUYS. Alvorens hiertoe over te gaan werden eerst eenige proeven genomen met reïnculturen van typhus- en paratyphusbacillen.

Van suspensies van deze bacillen werd een druppel in een MULLER-buisje en in een brillantgroenbuisje gebracht. Zoowel het eerste als het laatste busje bevatte precies 15 cc. vloeistof. Na 24 uur in den broedstoom te hebben gestaan werd uit ieder busje een gelijk groote druppel gebracht in 5 cc. physiologische zoutoplossing en hierin goed gemengd. Vervolgens werd van deze suspensie een druppel in een petri-schaal gebracht en goed gemengd met gekoelde vloeibare agar. Na 24 uur werd nu het aantal kolonies geteld. Van de paratyphusbacillen bleek nu in de MULLER-buis en in het busje volgens RUYS de vermeerdering ongeveer even sterk te zijn. (670 en 615 getelde kolonies). Voor de typhusbacillen was dit echter niet het geval. Hier was de groei in het busje volgens RUYS belangrijk minder. (960 en 205 getelde kolonies). RUYS zelf stelde dit ook reeds vast. Een herhaling van deze proef met andere stammen leverde eenzelfde resultaat op.

Vervolgens werden een 10-tal proteusstemmen in de busjes volgens RUYS geënt. Het bleek nu, dat, indien deze bacillen in groote hoeveelheid in de busjes werden gebracht, er wel sterke groei ontstaat en de proteusbacillen dan ook zwermen op de ENDO-plaat. Bij kleine hoeveelheden was dit niet het geval. Dan groeiden op de ENDO-plaat slechts enkele niet



zwerpende kolonies. In het algemeen mag verwacht worden, dat bij het enten van een weinig faecessuspensie in de bovengenoemde buisjes er niet een zoo groote massa proteusbacillen zullen aanwezig zijn als bij de eerste enting het geval was.

Nu werd overgegaan tot het enten van faecessuspensies in de buisjes volgens RUYS en MULLER. Hiervoor werden de dagelijks binnenkomende faecesmonsters gebruikt. In het totaal werden 393 monsters onderzocht. Uit de MULLER-buisjes kwam 28 maal zwerpende proteus op de ENDO-platen. Uit de buisjes volgens RUYS was dit slechts  $2 \times$  het geval.

Uit de MULLER-buisjes werden 8 maal typhusbacillen en 4 maal paratyphusbacillen gekweekt. Uit de buisjes volgens RUYS was dit 4 en 3 maal het geval. Al deze laatste gevallen waren ook met de MULLER-buisjes gevonden. Niet éénmaal werden uit de buisjes van RUYS verdachte bacillen afgezonderd, terwijl de MULLER-buisjes door proteus verontreinigd waren.

Daar deze onderzoeken geheel in de wintermaanden werden verricht, dus in den tijd, dat weinig typhus voorkomt, kan dit een oorzaak van het geringe succes zijn. Wel werd éénmaal een typhuscultuur geïsoleerd uit een buisje van RUYS, terwijl het MULLER-buisje geen proteus- en ook geen typhusbacillen bevatte. Dit is dus als bewijs aan te voeren voor den stelregel: „hoe meer voedingsbodems, hoe meer positieve resultaten”.

Alhoewel dus geen vermeerdering der positieve uitkomsten werd verkregen, bleek wel, dat in ongeveer 90% der gevallen proteusbacillen onderdrukt worden in den brillantgroen-voedingsbodem volgens RUYS.

Vooraf in de zomermaanden zal deze voedingsbodem dus zijn diensten kunnen bewijzen.

#### SAMENVATTING:

Door toevoeging van kopersulfaat, carbol of zuur aan de ENDO-platen is het zwermen van de proteusbacillen te beletten. Dit geschiedt echter pas bij een concentratie van bovengenoemde stoffen, waarbij typhusbacillen zeer slecht groeien.

Bovendien worden deze platen donkerrood gekleurd,

zoodat het onderscheiden van typhus- en colikolonies praktisch onmogelijk wordt. Coffeïne, theobromine en theophilline zijn bij een concentratie, waarbij typhus en paratyphusbacillen niet in hun groei geremd worden, niet in staat het zwermen der proteusbacillen te remmen.

Proteusbacteriophage, toegevoegd aan den MULLERSchen tetrathionaatvoedingsbodem, bleek in ongeveer 1/3 der gevallen in staat te zijn den proteus in zijn vermogen tot zwermen aan te tasten. Driemaal werd hierdoor de isolatie van een typhus- en éénmaal van een paratyphusbacil mogelijk.

Uit de buisjes volgens RUYS kwam slechts 2 maal op 393 onderzoeken een zwermdende proteusbacil te voorschijn. Meerdere positieve resultaten werden echter niet verkregen.

## HOOFDSTUK VI.

### ONDERZOEK VAN URINE.

Naast het onderzoek van faeces van typhuspatiënten of -verdachten wordt ook regelmatig het onderzoek van de urine van deze personen verricht. Nadat reeds door verschillende onderzoekers typhusbacillen in de urine waren gevonden, heeft PETRUSCHKY (1898) voor het eerst op het groote belang van deze vondsten gewezen. Het kweeken van de bacillen uit de urine brengt meestal niet zooveel moeilijkheden met zich mede als dat uit de faeces. In de urine komen de typhus- of paratyphusbacillen meestal in zeer grooten getale voor. PETRUSCHKY vond eens in 1 cc. urine  $\pm$  100 millioen typhusbacillen. Door deze buitengewone hoeveelheid bacillen kan dan de urine sterk troebel zijn, zonder dat verschijnselen van cystitis aanwezig zijn.

Deze groote hoeveelheden bacillen vergemakkelijken het onderzoek natuurlijk zeer, waarbij nog komt, dat zij vaak in reincultuur in de urine aanwezig zijn. In het algemeen kan gezegd worden, dat het onderzoek van urine vrijwel overal op dezelfde wijze geschiedt als dat van faecesmonsters.

Indien bij het zoeken naar bacillendragers nauwkeurig nagegaan moet worden of ook in de urine bacillen worden uitgescheiden, dan zijn enkele speciaal voor het urineonderzoek beschreven methoden toe te passen (neerslaan met ijzeroxydechloride, het maken van MULLER-bouillon van de urine). Dit is echter slechts zelden noodig, daar de bacillen, zooals gezegd, vrij gemakkelijk met de gewone kweekmethoden kunnen worden aangetoond.

Op de bacteriologische afdeling van het Centraal Laboratorium werden in 1929 1305 urinemonsters onderzocht. Hieruit werden 22  $\times$  typhusbacillen en 25  $\times$  paratyphusbacillen gekweekt. Het onderzoek werd op de volgende wijze verricht: het buisje met urine wordt gedurende eenigen tijd geopend (onder een glazen stolp) neergezet. Dan wordt van de oppervlakte een druppel op een ENDO-plaat uitgestreken en eenige druppels in den MULLERSchen tetrathionaatvoedingsbodem gebracht. De ENDO-plaat wordt na 24 uur afgelezen, verdachte kolonies worden afgeënt op een andere

ENDO-plaat en na 24 uur worden eigenschappen en agglutinaties ingesteld. Van de MULLER-buis wordt na 24 uur een öse uitgestreken op een ENDO-plaat, welke op dezelfde wijze als de eerste plaat wordt nagegaan.

Ook hier blijkt de MULLER-buis bij het onderzoek goede diensten te bewijzen. Af en toe komt het voor, dat uit de MULLER-buis typhus- of paratyphusbacillen worden gekweekt, terwijl dit van de directe ENDO-plaat niet het geval was.

Ook hier ondervinden we echter veel hinder van den buitengewonen groei van de proteusbacillen in dezen voedingsbodem. Daar door faeces, welke proteusbacillen bevatten, ook de urine kan besmet zijn, zou het in gevallen, waarin proteusbacillen in urine gevonden worden, gewenscht zijn, nogmaals urine, maar dan catheterurine, ter onderzoek in te zenden.

In het algemeen kan gezegd worden, dat de urine minder vaak proteusbacillen herbergt dan de faeces. Toch zou een onderdrukking van de proteusbacillen ons ook hier een nog beter resultaat kunnen doen verkrijgen. Ik heb daarom een klein aantal urinemonsters, welke met proteus besmet waren, in de buisjes volgens MULLER met bacteriophag geënt. Eveneens werd een aantal in den brillantgroenvoedingsbodem volgens RUYS gebracht. Het aantal urinemonsters, dat met bacteriophag behandeld werd, bedroeg 32.

Het onderzoek werd op dezelfde wijze als bij het faecesonderzoek verricht: in den MULLER-bouillon werd urine gebracht, waarbij eenige druppels bacteriophag. Na 24 uur werd op ENDO-platen uitgestreken. Bij de 32 in onderzoek genomen monsters was met de methode volgens MULLER reeds proteus gevonden. Pas daarna werden de monsters met bacteriophag behandeld. Van deze 32 urines werden nu 11 ENDO-platen verkregen, welke geen zwermende proteus bevatten. Typhusbacillen konden éénmaal geïsoleerd worden; paratyphusbacillen werden echter niet gevonden.

Ook de voedingsbodem van RUYS werd met een 16-tal urines, welke proteus bevatten, geënt. Slechts éénmaal werd op de ENDO-plaat, welke op één van deze voedingsbodems betrekking had, een zwermende proteus gevonden. Culturen van typhus- of paratyphusbacillen werden echter niet verkregen.

Ook bij het onderzoek van urine van typhus- of paratyphus-

patiënten bleek, dat het gebruik van den voedingsbodem van RUYS of het toevoegen van bacteriophag aan den voedingsbodem volgens MULLER aan te bevelen is. Het zwermen der proteusbacillen wordt door den eersten in bijna alle, door den tweeden in ongeveer  $\frac{1}{3}$  der gevallen onderdrukt.

#### SAMENVATTING.

Twee en dertig urinemonsters, welke zwermende proteusbacillen bevatten, werden met behulp van den tetrathionaatbouillon volgens MULLER, waaraan toegevoegd was proteusbacteriophag, nogmaals onderzocht. In 11 gevallen werden na de enting in de MULLER-buisjes geen zwermende proteusbacillen meer gevonden. Eenmaal gelukte het zoo een typhus-stam te isoleeren. Van zestien andere, proteusbevattende, urines werd in den voedingsbodem van RUYS geënt. In 15 gevallen werden nu geen zwermende proteusbacillen meer gevonden. Er werden echter geen typhus- of paratyphusbacillen gevonden.

## CONCLUSIES.

Zoals ik in de inleiding van dit proefschrift heb gezegd, heb ik mij ten doel gesteld na te gaan, in hoeverre de tegenwoordig in gebruik zijnde methoden van onderzoek bij de bacteriologische typhusdiagnostiek in het algemeen, en in het bijzonder in hoeverre de methode van onderzoek, zooals die op de bacteriologische afdeling van het Centraal Laboratorium voor de Volksgezondheid in gebruik is, voor verbetering vatbaar zijn.

In dit slotwoord wil ik nu in een aantal punten de resultaten van mijn onderzoekingen samenvatten:

- 1<sup>e</sup>. Een verlenging van den kweekduur van de bloed-in-galmengsels kan het aantal positieve uitkomsten doen toenemen.
- 2<sup>e</sup>. De hoeveelheid bloed, welke voor het bloed-in-galmengsel wordt gebruikt, kan van invloed zijn op het tijdstip, waarop een cultuur wordt verkregen.
- 3<sup>e</sup>. Het gebruik van een alcohol-Ficker naast een formaline-Ficker is sterk aan te bevelen.
- 4<sup>e</sup>. In ziektegevallen, waar een vaccinatie met T.A.B. heeft plaats gehad, is de uitslag van de agglutinatieproef met een formaline-Ficker van weinig waarde, in tegenstelling met dien met een alcohol-Ficker.
- 5<sup>e</sup>. De complementbindingsreactie op typhus en paratyphus is, met gedooide bacillen verricht, zeer betrouwbaar en te verkiezen boven die met extracten van typhus- en paratyphusbacillen.
- 6<sup>e</sup>. Kopersulfaat, carbol en zuur zijn bij een concentratie, waarbij typhus- en paratyphusbacillen niet in hun groei geremd worden, niet in staat het zwermen der proteusbacillen te beletten. Hetzelfde is het geval met coffeïne, theobromine en theophilline. Verbeteringen van de bacteriologische typhusdiagnostiek met behulp van deze stoffen zijn dus niet te verkrijgen.

- 7<sup>e</sup>. Bij het onderzoek van faeces en urine is door toevoeging van proteusbacteriophage aan de buisjes volgens MULLER de proteusbacil in een aantal gevallen in groei- en zwermvermogen te remmen.
- 8<sup>e</sup>. De voedingsbodem volgens RUYS is voor het onderzoek van met proteus besmette faeces en urine aan te bevelen.

## LITTERATUUROPGAVE.

- ALLISON en AYLING. Journ. of Path. and Bact. 1929.  
BIEN. Zentralbl. für Bakt. Or. 1924  
BIEN en SONNTAG. Münch. Med. W. 1917.  
BORDET en GENGOU. Ann. de l'Inst. Pasteur. 1901.  
BIJL en VAN DER HOEDEN. Verslagen en Mededeelingen betreffende de Volksgezondheid. 1927.  
CLAUBERG. Zentralbl. f. Bakt. Or. Band 114.  
FELIX. The Journ. of Hygiene. 1929.  
FELIX. Lancet. 1930.  
FELIX. Journ. of imm. 1924.  
FELIX. Zeitschr. f. Im. fors. 1924.  
FELIX en OLITZKY. Journ. of Hygiene. 1928.  
FELIX en MITZENMACHER. Wien. kl. W. 31.  
FELIX en OLITZKY. Journ. immunol. 9.  
FELIX en OLITZKY. The Br. Journ. of exp. Path. 1929.  
FÜRST. Münch. Med. W. 1917.  
FÜRST. Münch. Med. W. 1916.  
GARBAT. J. of Am. Med. Ass. 1915.  
GARBAT. Journ. of imm. 1916.  
GARDNER. Journ. Hygiene. 1929.  
HADJOPOULOS. Journ. of inf. dis. 1922.  
HAGE. Zentralbl. f. Bakt. Or. 1924.  
HAGE en KORFF PETERSEN. D. MED. W. 1915.  
HERDERSCHEE. Nederl. Tijdschr. v. Gen. 1929.  
HIRSCHBRUCK. D. Med. W. 1915.  
HOEDEN, VAN DER. Verslagen en Mededeelingen betreffende de Volksgezondheid. 1927.  
HORST HABS. Zentralbl. f. Bakt. Or. 1930.  
IVANOVICS. Zentralbl. f. Bakt. Or. Band 118.  
KAYSER. Münch. Med. W. 1907.  
KAYSER. Münch. Med. W. 1918.  
KOLLE en WASSERMANN. Handbuch der path. Mikroörg.  
LEDINGHAM. Lancet. 1921.  
LEUCHS en SCHÖNE. Zeitschr. f. Hyg. und Inf. Kr. 1908.  
MULLER, L. C. R. Soc. Biol. 1923.  
MULLER, L. C. R. Soc. Biol. 1923.



OSTER. D. Med. W. 1925.  
 PESCH en KORTENHAUS. Zentralbl. f. Bakt. Or. Band 112.  
 PIJPER, A. S. A. Medical Record. 1923.  
 PIJPER, A. Nederl. Tijdschr. v. Gen. 1929.  
 PIJPER, A. en B. D. PULLINGER. Br. Med. J. 1928.  
 RUYS. Nederl. Tijdschr. v. Gen. 1930.  
 SACHS. D. Med. W. 44.  
 SCHIFF. D. Med. W. 1917.  
 SCHIFF. Zeitschr. f. Imm. forschung. 1922.  
 SCHIFF. Kl. W. 1925.  
 SEELIGER. Münch. Med. W. 18.  
 SINGER. Zeitschr. f. Imm. I. forschung. 1924.  
 SPETH, Zentralbl. f. Bakt. Band 113.  
 STUART en KRIKORIAN. Journ. Hygiene 1928.  
 TIMMERMANN, W. A. The Brit. Journ. of exp. path. 1930.  
 TOPLEY and WILSON. Text book.  
 TSURUMI, M. en K. KOHDA. Zeitschr. f. Imm. forschung. 1913.  
 VERZAR. Kl. W. 1924.  
 VERZAR. Centralbl. f. Bakt. Or. 1918.  
 WIDAL et LE SOURD. C. R. Soc. Biol. 1901.  
 WEIL. Zeitschr. f. Imm. forschung. 1921.  
 WEIL. Zeitschr. f. Imm. forschung. 1921.  
 WEIL en FELIX. Zeitschr. f. Imm. forschung. 1920.  
 WEIL en FELIX. Wien. kl. W. 29.  
 WEIL en FELIX. Wien. kl. W. 30.  
 WEIL, FELIX en MITZENMACHER. Wien. kl. W. 31.  
 ZLATOGOROFF. Zentralbl. f. Bakt. Or. 1909.  
 ZUPNIK en SPÄT. Berl. Kl. W. 1908.



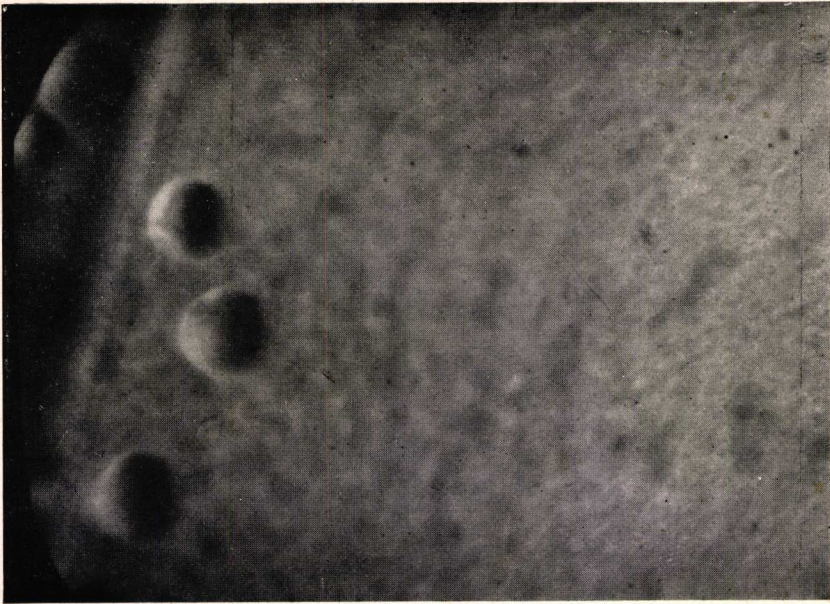
## INHOUD.

	Blz.
Inleiding . . . . .	9
Hoofdstuk I: De ontwikkeling van de bacteriologische typhusdiagnostiek . . . . .	II
„ II: De bloed-in-galcultuur . . . . .	18
„ III: De agglutinatieproef volgens WIDAL . . . . .	26
„ IV: De complementbinding op typhus en paratyphus . . . . .	42
„ V: Het onderzoek van faeces . . . . .	64
„ VI: Het onderzoek van urine . . . . .	85
Conclusies . . . . .	88
Litteratuuropgave . . . . .	90

## VERKLARING DER FIGUREN.

Figuur 1. Zwermende proteus op een ENDO-plaat, waarop faecessuspensie van een typhuspatiënt was uitgestreken.

Figuur 2. Uitstrijk op ENDO-plaat van bovengenoemde faeces, nadat deze met bacteriophag in een MULLER-buisje gedurende 20 uur bij 37° had gestaan. De kleine scherp omschreven kolonies zijn typhuskolonies. De groote onregelmatig gerande kolonie is een proteuskolonie.



FIGUUR I.

FIGUUR II.

