

K.T. -
H. 70
1,53

OVER EEN VIRUSRECEPTORVERNIE-
TIGENDE EIGENSCHAP
VAN SPEEKSEL EN HAAR MOGELIJKE
BETEKENIS VOOR DE
INFECTIE MET POLIOMYELITISVIRUS

De afbeelding is een schematische weergave van de interactie tussen een virusreceptor en een virusdeeltje. Het toont de structuur van de receptor op de celmembraan en hoe deze bindt aan het virus. De afbeelding is bedoeld om de mechanismen van de receptorvernietiging te illustreren.

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

KT
H 71
)

Over een virusreceptorvernietigende eigenschap
van speeksel en haar mogelijke betekenis voor
de infectie met poliomyelitisvirus

(with a summary in English)

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN
DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEES-
KUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE
LEIDEN, OP GEZAG VAN DE RECTOR-
MAGNIFICUS DR. J. J. L. DUYVENDAK,
HOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER
LETTEREN EN WIJSBEGEERTE, TEGEN
DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT
DER GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN
OP WOENSDAG 20 MEI 1953 TE 16 UUR

DOOR

BARTHELD HOFMAN

GEBOREN TE GOOR IN 1921

1953

H. E. STENFERT KROESE N. V. — LEIDEN

214/53

Promotor :
Professor Dr J. D. VERLINDE

AAN MIJN OUDERS

Allen, die mij bij mijn onderzoekingen steun en voorlichting
hebben gegeven, betuig ik mijn oprechte dank.

I N H O U D

	Blz.
I Inleiding	1
II Literatuuroverzicht	3
III Materiaal en methoden van eigen onderzoek	16
IV Onderzoekingen naar het voorkomen van de X-factor in het speeksel van gezonde mensen, van lijdens aan polio- myelitis en van lijdens aan andere ziekten	27
V Onderzoekingen over de aard van deze factor	36
VI Bespreking	73
VII Samenvatting	82
Summary	86
Literatuur	94

I INLEIDING

Uit de onderzoekingen van HALLAUER (46), VERLINDE en DE BAAN, BREMER en MUTSAARS e. a. is bekend, dat de verschillende stammen van de Columbia SK-virusgroep in staat zijn schapenerythrocyten te agglutineren.

VERLINDE en DE BAAN hebben ook aangetoond, dat cholera-filtraat zowel in vitro als in vivo de receptoren van de cellen voor het Columbia SK-virus kon vernietigen. De vraag is toen opgekomen, of voor deze werking een enzym of een polysaccharide verantwoordelijk was.

Indien het laatste het geval zou zijn geweest, zou deze stof misschien onwerkzaam gemaakt kunnen worden door suikersplitsende fermenten, zoals er o. a. in speeksel voorkomen.

Toen JUNGBLUT e. s. (59, 60), die bovengenoemde onderzoekingen hebben kunnen bevestigen, in enige van hun experimenten menselijk speeksel wilden gebruiken als bron van zulk een ferment, bleek hun, dat het speeksel van een bepaald persoon in staat was schapenerythrocyten zodanig te beïnvloeden, dat zij niet meer door Columbia SK-virus geagglutineerd werden.

Bij nader onderzoek werd het hun duidelijk, dat deze werking niet berustte op de aanwezigheid van het suikersplitsende ferment amylase, want slechts het speeksel van betrekkelijk weinig mensen was in staat genoemde werking op de schapenerythrocyten uit te oefenen. Ook bleek het hun, dat de werking van het speeksel van éénzelfde proefpersoon op de schapenerythrocyten van dag tot dag verschilde en dat er ook wel dagen voorkwamen, dat het in dit opzicht geen enkele invloed op de erythrocyten bleek uit te oefenen.

Verdere proeven door hen verricht, brachten aan het licht, dat het speeksel van slechts weinig mensen het bovenbeschreven vermogen bezat. Er was een kleine groep met duidelijke werkzaamheid, een iets grotere met af en toe zwak werkzame speeksels en een veel grotere groep van hen, die nooit of zelden enige aanduiding van een dusdanig werkzame stof in hun speeksel hadden.

Toen zij daarna het speeksel van poliomyelitispatienten gingen onderzoeken, meenden zij te kunnen opmerken, dat de speekselmonsters van patienten met paralytische poliomyelitis, verzameld tijdens het acute stadium, vaak en in relatief sterke mate deze invloed op de

schapenerythrocyten toonden en dat er een duidelijk verschil was met de speeksels van normale mensen.

In 1951 begonnen wij met een dergelijk onderzoek van menselijke speeksels. Daar Columbia SK-virus in staat is onder bepaalde voorwaarden ook menselijke erythrocyten te agglutineren, gebruikten we deze om de invloed van verschillende speeksels erop na te gaan.

Er werd begonnen met een aantal speekselsmonsters van normale volwassen mensen te onderzoeken. In het verdere verloop van ons onderzoek boden de in betrekkelijk groot aantal voorkomende gevallen van poliomyelitis in 1951 en in 1952, zowel in Nederland, als in België, als in delen van de Duitse Bondsrepubliek, ons een gelegenheid om ook het onderzoek van speeksels van poliomyelitis-patienten ter hand te nemen.

Met dit gedeelte van onze experimenten, dat het eerste beschreven zal worden, werd geprobeerd de uitkomsten van JUNGBLUT e. s. uit New York te bevestigen. De resultaten zijn vermeld in hoofdstuk IV.

Nadat wij ons op deze wijze een zekere indruk gevormd hadden over het voorkomen van deze factor in het speeksel van verschillende mensen gedurende een bepaald tijdsverloop, werd gepoogd iets meer over de werkzame stof, die wij in het vervolg gemakshalve „X-factor” zullen noemen, te weten te komen. Het resultaat van de met dit doel verrichte experimenten is vermeld in hoofdstuk V.

Tenslotte zijn de verkregen uitkomsten besproken en is getracht er zekere conclusies uit te trekken, vooral wat betreft de vraag, of de X-factor van invloed zou kunnen zijn op de infectie met poliomyelitisvirus.

II LITERATUUROVERZICHT

In dit hoofdstuk volgt een beknopte beschrijving van de publicaties, die verschenen zijn over een aantal van de materialen (Columbia SK-virus, erythrocyten, speeksel, cholerafiltraat), waarmede in dit onderzoek werd gewerkt, en de daarbij waargenomen verschijnselen, die vooral betrekking hebben op de werking tussen virus en cellen, tussen virus en substanties, die met celbestanddelen overeenkomst tonen, en op de op beide werkingen uitgeoefende invloeden door allerlei stoffen, waarvan vele een enzymkarakter bezitten.

Achtereenvolgens zullen worden besproken:

1. Het optreden van abnormale agglutinabiliteit van menselijke erythrocyten („panagglutinatie”).
2. Het verschijnsel van de haemagglutinatie door de virussen der influenzagroep, met enige op deze reactie invloed uitoefenende stoffen.
3. Het Columbia SK-virus.
4. Het menselijke speeksel met een aantal daarin voorkomende bestanddelen, en de rol, die enige daarvan misschien spelen bij allerlei infecties.

1. *Het optreden van abnormale agglutinabiliteit van menselijke erythrocyten („Panagglutinatie”).*

HUEBENER vond in 1926, dat erythrocyten, behorende tot de bloedgroep A, na 12 dagen in de ijskast te zijn bewaard, niet alleen na toevoeging van anti-A serum, maar ook na toevoegen van anti-B serum agglutineerden. Het serum van de persoon, van wie deze erythrocyten verkregen waren, bevatte het iso-agglutinine anti-B. De agglutinatie trad niet op bij 37° C. en was duidelijk te onderscheiden van de zogenaamde pseudoagglutinatie.

Ook SCHIFF en HALBERSTAEDTER vonden eenzelfde niet verwachte agglutinabiliteit bij een enige dagen bewaard bloedmonster.

THOMSEN bestudeerde dit verschijnsel verder en hij sprak het vermoeden uit, dat deze abnormale agglutinatie ook berustte op een antilichaam-antigeen reactie tussen de sera en de veranderde cellen, welke verandering een gevolg zou zijn van bacteriële besmetting. Dit zou blijken o. a. uit het feit, dat de eigenschap van de erythrocyten op vers bloed was over te brengen.

Door een andere Deense onderzoeker, FRIEDENREICH (41), werd dit phenomeen nu zeer grondig onderzocht en in een weldoorwrocht proefschrift legde hij zijn resultaten en conclusies vast. Volgens hem was hier sprake van een enzymatische werking van producten van bacteriën op de erythrocyten. Hierdoor zou aan de oppervlakte van de erythrocyten een stof omgezet worden in een antigeen, dat in staat was met een antilichaam, dat in alle menselijke sera voorkomt, een agglutinatie te bewerkstelligen. Hij noemde het aldus gevormde antigeen: T-antigeen. In de filtraten van cultures van een aantal bacteriën kon hij een stof aantonen, die in staat was het T-antigeen te doen ontstaan. Zulk een stof werd o. a. door cholera-vibrionen gevormd. Hijzelf verrichtte zijn proeven met filtraten van de zogenaamde J-bacil, die hij onderbracht bij de corynebacteriën.

Niet alleen aan de oppervlakte van menselijke erythrocyten kon door de werkzame stof in de bacteriefiltraten het T-antigeen gevormd worden, maar ook aan die van de rode bloedlichaampjes van een aantal onderzochte diersoorten was dit mogelijk. Wel bleken er verschillen te zijn in de hoeveelheid T-antigeen, die ontstond. Ganzen-erythrocyten verschilden nauwelijks van die der mensen; cavia- en schapenerythrocyten vormden ook goed T-antigeen, maar in geringere mate. Konijnenerythrocyten en ossenerythrocyten waren echter nauwelijks tot T-antigeenvorming in staat.

Toen onderzocht werd, of de rode bloedlichaampjes van het konijn in staat waren het transformerende principe uit de bacteriefiltraten te adsorberen, bleken deze dit vermogen slechts in zeer geringe mate te bezitten in tegenstelling tot de menselijke erythrocyten.

Uit deze gegevens trok FRIEDENREICH dan ook de conclusie, dat de konijnenerythrocyten veel minder substraat bezaten, waarop het enzym uit de bacteriefiltraten kon aangrijpen om er T-antigeen uit te vormen. (FRIEDENREICH; FRIEDENREICH en ANDERSEN). In verband met de gedachtengang, die later nog ontwikkeld zal worden over de betrekking tussen het T-antigeen en virusreceptoren aan de cellen is dit verschillend gedrag van de erythrocyten van de diverse diersoorten van belang.

FRIEDENREICH onderzocht ook nog, of het onder bepaalde omstandigheden mogelijk was in mengsels van serum en getransformeerde erythrocyten een specifieke haemolyse te veroorzaken. Met de combinatie: getransformeerde mensenerythrocyten-mensenserum, liepen deze experimenten op niets uit, maar met de combinatie: getransformeerde caviaerythrocyten-cavia-serum, had hij meer succes (FRIEDENREICH; FRIEDENREICH en MUNCK). Na uitgebreide proefnemingen kon vastgesteld worden, dat er niet alleen een T-agglutinatie, maar ook een T-haemolyse kon optreden. Deze laatste bleek in twee stadia te verlopen, namelijk:

1. fixatie van een amboceptorachtige stof, voor welk proces de optimum temperatuur 15°—20° C. was, en
2. opneming van een stof met complementeigenschappen, die ook bij 37° C. kon geschieden. Dit mechanisme van haemolyse geleek op datgene, dat we kennen bij de lijders aan paroxysmale haemoglobinurie.

Men vindt in de literatuur een aantal gevallen beschreven, waarin bij mensen „panagglutinabele” cellen werden gevonden. REEPMAKER gaf hiervan een overzicht. Bij het merendeel van deze patienten werd een bacteriële ziekteoorzaak gevonden en men zou hieraan de verandering van de erythrocyten ook kunnen toeschrijven. Dezelfde auteur kon bij de door hem beschreven patient met pyelocystitis, die „panagglutinabele” erythrocyten had, α -haemolytische streptococci uit de urine kweken; filtraten van cultures van deze cocci waren in staat om O-erythrocyten „panagglutinabel” te maken, welke eigenschap bleek te berusten op het gevormd zijn van T-antigeen (phenomeen van THOMSEN-FRIEDENREICH). Daartegenover bleken er ook mensen te zijn met panagglutinabele erythrocyten, die volkomen gezond waren en bij wie geen bacteriën werden gevonden (42, 49). In verband met onze onderzoekingen over speeksels zijn deze gevallen zeer interessant.

In 1935 werd door R. VON MAGNUS een onderzoek gepubliceerd over actinomyceten, voorkomende in de mondkeelholte. Hij vond, dat ze ook de eigenschap bezaten om O-erythrocyten „panagglutinabel” te maken. Uit de publicatie van HENNINGSEN bleek echter, dat het door deze actinomyceten gevormde antigeen niet identiek was met het T-antigeen, dat ontstond onder invloed van filtraten van cultures van *V. cholerae* of van de bacteriën, waarmede FRIEDENREICH werkte. HENNINGSEN wees daarbij op de mogelijkheid van het bestaan van meer dan één T-antigeen.

Ook het influenzavirus uit allantois- of amnionvocht van kippenembryonen kon de erythrocyten „panagglutinabel” maken (BURNET c. s. 13).

Niet alleen door bacteriefiltraten en influenzavirus bleek het mogelijk om bij erythrocyten deze eigenschap te doen optreden. Ook een stof met oxyderende werking, zoals het kaliumperjodaat (KJO_4), was hiertoe in staat, hetgeen aangetoond werd door STEWART en door MOSKOWITZ en TREFFERS. Uit de door deze schrijvers verrichte experimenten bleek evenwel, dat de door de inwerking van kaliumperjodaat (KJO_4) teweeggebrachte eigenschap van panagglutinatie niet berustte op de vorming van hetzelfde antigeen als datgene, dat na de inwerking van cholerafiltraat ontstond.

MORGAN en WATKINS beschreven ook nog andere werkingen van kaliumperjodaat (KJO_4) op menselijke erythrocyten. Het bleek hun,

dat allerlei specifieke bloedgroepantigenen van de erythrocyten, zoals M, N, Rh, A, B, O, H, P en Le^a tot verdwijnen gebracht konden worden, waarbij niet alle tegelijkertijd teloor gingen. Er was, wat dit betreft, een zekere afhankelijkheid van de concentratie van het perjodaation, van de zuurgraad van het milieu, en van de duur van inwerking der kaliumperjodaat (KJO₄) oplossing op de erythrocyten. De werking van deze stof op de rode bloedlichaampjes was dus wel van een andere aard dan die van de verschillende bacteriefiltraten, want van een vernietiging der bekende bloedgroepantigenen aan erythrocyten door zulke filtraten is tot nu toe niets gebleken.

Een geheel andere vorm van „panagglutinatie” beschreven DAVIDSOHN en TOHARSKY, namelijk, dat menselijke sera na beënten met een bepaalde corynebacterie, door hen *Corynebacterium H* genoemd, mensenerythrocyten van alle bloedgroepen en ook erythrocyten van sommige dieren agglutineerden. Zij schreven dit verschijnsel toe aan het ontstaan van een zogenaamd h-agglutinine in de sera, dat het H-antigeen tot agglutinatie bracht. Dit antigeen zou aan alle menselijke rode bloedlichaampjes en aan die van vele diersoorten voorkomen. Het bleek hun, dat deze „H-agglutinatie” geheel onafhankelijk was van de „T-agglutinatie”.

2. *Het verschijnsel van de haemagglutinatie door de virussen der influenzagroep en stoffen, die er invloed op uitoefenen.*

In 1941 namen HIRST (50) en onafhankelijk van hem MC. CLELLAND en HARE waar, dat influenzavirus bevattende amnion- en allantoisvloeistoffen van kippenembryonen in staat waren de erythrocyten van zulk een embryo, nadat ze er mee in contact gekomen waren, te doen samenklonteren. Hiermede was de grondslag gelegd om in vitro met dit soort virussen te werken en een aantal eigenschappen ervan te bestuderen. Behalve de verschillende types van het influenzavirus waren ook het virus van de bof (LEVENS en ENDERS) en dat van de pseudovogelpest (New Castle Disease = NDV) (BURNET 12) in staat zulk een agglutinatie te veroorzaken.

Al spoedig bleek, dat ook de erythrocyten van andere vertebraten geagglutineerd konden worden door influenzavirus. Ook mensen- en caviaerythrocyten bezaten dit vermogen. De rode bloedlichaampjes van konijnen, ratten en muizen deden nauwelijks iets met deze virussen, terwijl schapen- en paardenerythrocyten slechts door enkele soorten uit deze groep van virussen tot agglutinatie gebracht werden (BURNET 20).

Zowel door HIRST als door BURNET en zijn medewerkers werd het verschijnsel der haemagglutinatie door de virussen van deze groep uitgebreid onderzocht. Hierbij werd gevonden, dat het virus, wanneer

het bij een temperatuur van 37° C. in contact werd gelaten met de cellen, eerst geadsorbeerd werd en daarna weer vrij kwam, waarna de cellen inagglutinabel bleken te zijn geworden voor dit virus. Op grond van dit gedrag vatte HRST (51) de inwerking van het virus op als een enzymatische reactie, waarbij het virusenzym veranderingen aan de celoppervlakte teweeg zou brengen. Daardoor zouden de receptoren voor het virus te gronde gaan en dit laatste zou weer vrij komen zonder merkbaar aan werkzaamheid ingeboet te hebben.

Het was niet altijd even gemakkelijk om alle virus, nadat het aan de erythrocyten geadsorbeerd was, geëluëerd te krijgen. Om dit toch te bewerkstelligen werd getracht, de cellen te stabiliseren met verdund immuunserum, waardoor het laatste restje virus eraf gehaald zou kunnen worden. Hierbij viel het nu op, dat deze erythrocyten, die dus met influenzavirus in contact waren geweest, vaak geagglutineerd werden door de immuunsera en dus minder stabiel schenen te zijn geworden. Met normale sera bleek dit verschijnsel ook op te treden en de titer dezer agglutinatie lag meestal bij 1:160 (BURNET e. s. 12, 13). Verder onderzoek van dit verschijnsel leerde, dat men hier te maken had met het fenomeen van THOMSEN-FRIEDENREICH, dat hierboven (blz. 5) reeds beschreven werd (STONE 94, BURNET en ANDERSON 15).

De ontdekking, dat virussen van de influenzagroep, waarvan reeds bekend was, dat zij hun eigen receptor aan de oppervlakte van de cel konden vernietigen, in staat waren, evenals filtraten van de *J. bacil*, *V. cholerae* of andere bacteriën (FRIEDENREICH), erythrocyten een andere agglutinabiliteit tegenover normale sera te bezorgen, bracht Mc. CREA (67) ertoe eens te proberen, of zulke enzymen ook in staat waren de receptoren van de erythrocyten voor het influenzavirus te vernietigen. Hij verrichtte zijn experimenten met Cl. Welchii toxines en hij had daarmee inderdaad enig succes.

Door hem kon aangetoond worden, dat de werking niet berustte op het hierin aanwezige lecithinase, terwijl ook de toxinen niet verantwoordelijk waren voor de receptorvernietiging. Er moest in deze preparaten dus nog een andere stof voorkomen, die de receptoren te loor deed gaan. BURNET e. s. (13) en STONE (94) onderzochten de werking van het filtraat van cultures van *V. cholerae* op de erythrocyten van een aantal diersoorten. Het cholerafiltraat bleek de receptoren voor het influenzavirus eveneens te kunnen vernietigen. Op grond van het verloop van de uitgeoefende werking, de thermolabiliteit (inactiveringstemperatuur 50—60° C.) en enige andere fysische en chemische eigenschappen werd aangenomen, dat de werkzame stof in het filtraat een enzym was, dat toen verder door BURNET en de zijnen werd aangeduid als „Receptor Destroying Enzyme” (afkorting: RDE) (19).

Voor de werking van het RDE bleek de optimum pH = 6,2

te zijn en ook een zekere concentratie van het Ca-ion was daartoe noodzakelijk (ongeveer 0,1 % CaCl₂). De reactie tussen influenzavirus en erythrocyten bleek betrekkelijk ongevoelig te zijn voor Ca-gebrek (POTTERFIELD 80).

Toen de hierboven beschreven invloed van het cholerafiltraat op de rode bloedlichaampjes bekend was geworden, lag het voor de hand ook eens na te gaan, welke invloed het in vivo zou uitoefenen. Zowel STONE (95, 96) als FAZEKAS DE ST. GROTH (34, 35) konden aantonen, dat ook dan door het RDE virusreceptoren vernietigd werden en infectie bemoeilijkt of voorkomen werd. STONE werkte met kippenembryonen en met muizen. FAZEKAS DE ST. GROTH met muizen. Deze laatste werden na intranasale voorbehandeling met RDE langs diezelfde weg besmet met influenzavirus. Zij konden aantonen, dat er na de eerst plaats gehad hebbende vernietiging opnieuw receptoren te voorschijn kwamen, waardoor de beschermende werking slechts een zeer tijdelijke was. Dat het RDE in vivo veranderingen van slechts tijdelijk karakter te voorschijn riep, bleek ook uit de proeven van ADA en FRENCH, die caviae intracardiaal inspoten met een gezuiverd, veel RDE bevattend, preparaat. De „Francis Inhibitor” in het serum en de receptoren van de erythrocyten bleken 24 uren hierna verdwenen te zijn, maar na 20 dagen waren de laatstgenoemde weer aanwezig, zonder dat er iets te bespeuren was geweest van verhoogde aanmaak of afbraak van rode bloedlichaampjes.

Het inzicht in de aard van de receptorsubstantie (dit is het substraat voor de enzymwerking van cholerafiltraat en virussen) werd ook verruimd.

FRANCIS (37) beschreef in 1947, hoe verschillende sera in staat waren de haemagglutinatie door verhit influenza B virus te remmen, en hij probeerde voor deze aspecifieke remming een verklaring te geven. De hiervoor verantwoordelijke stof, die „Francis Inhibitor” (= FI) werd genoemd, bleek door RDE en door virussen der influenzagroep vernietigd te kunnen worden (ANDERSON 2). Zo kwam men tot de veronderstelling, dat FI, die o.a. voorkwam in normale sera van mensen en allerlei dieren, overeenkwam met de receptorsubstantie van de cel, die immers ook door RDE en influenzavirus zelf stuk gemaakt kon worden. Bij verder onderzoek kon deze „inhibitor” geïdentificeerd worden als een component van de thermostabiele mucoproteïne fractie der sera (MC. CREA 68).

DOOR DEN BURGH c. s. was ongeveer terzelfder tijd uit menselijke erythrocyten een stof geïsoleerd, die in staat bleek te zijn de haemagglutinatie door influenzavirus (PR₈-stam) te remmen. Bij 37° C. kon het virus de „inhibitor” vernietigen. Deze stof, waarschijnlijk een lipopolysaccharide, werd door hen aangezien als de receptor-substantie van de cel. Naderhand kon ook nog aangetoond worden,

dat de aldus geïsoleerde „inhibitor” zowel door RDE als door influenzavirus onwerkzaam gemaakt werd (BURNET 18).

Langzamerhand werd van een groot aantal stoffen met mucouïde karakter vastgesteld, dat zij het bovengenoemde inhiberende vermogen bezaten. Uit deze veelheid zullen slechts enkele genoemd worden, n.l. de mucineuze inhoud van ovariaalcysten (BURNET 18), de gezuiverde bloedgroep O-substantie hieruit (MORGAN en VAN HEYNINGEN 74), alle slijmige secreten van mensen (BURNET c.s. 3, 16), ovomucine uit kippeneiwit (GOTTSCALK en LIND), preparaten uit speekselklieren van schapen (MC. CREA), een in urine voorkomend mucoproteïne (TAMM en HORSFALL; BURNET 21). Het voorkomen van een haemagglutinatieremmende substantie in menselijk speeksel werd ook beschreven, namelijk door FRANCIS en MINUSE. Hierbij maakte het weinig of geen verschil, of zij verhit of onverhit influenzavirus (PR₈-stam) gebruikten. De remmende stof in het speeksel was bestand tegen een half uur verhitten op 56° C. De uitgescheiden hoeveelheid wisselde van persoon tot persoon en van dag tot dag.

Dat deze mucouïde stoffen ook in staat waren een infectie met influenzavirus te voorkomen, toonden BURNET c.s. aan. Zij (BURNET en MC. CREA 14) vonden in proeven met muizen en kippenembryonen, dat frettersera met een zeer hoog gehalte aan FI influenzavirus (BEL-stam) konden inactiveren. Ook bleek in experimenten met muizen, dat influenzavirus (WSE-stam) onwerkzaam gemaakt kon worden door mucoid uit een ovariaalcyste (BURNET 17).

Behalve bovengenoemde groep inhibitoren heeft men ook nog een aantal polysacchariden gevonden met een remmende werking. De bekendste hiervan is wel het appelpectine. Dit kon de haemagglutinatie van het influenzavirus remmen, maar — belangrijk verschil met de FI — het werkte vooral direct op de erythrocyten, waardoor deze inagglutinabel werden. In infectieproeven met influenza A virus in kippenembryonen kon het een zekere protectie tegen de besmetting geven (GREEN en WOOLLEY).

Samenvattende kan men dus zeggen, dat de erythrocyten en ook andere cellen van een aantal diersoorten receptoren bezitten voor virussen der influenzagroep, waardoor deze zich kunnen hechten aan die cellen en, wat de erythrocyten betreft, ze daarna tot agglutinatie kunnen brengen. Deze receptoren kunnen door enzymen, of van het virus zelf, of b.v. in het cholerafiltraat voorkomende, vernietigd worden, waardoor de betreffende cel niet meer ontvankelijk is voor het virus. Op deze wijze kan het virus weer vrij komen van de erythrocyten. Receptorachtige stoffen, zogenaamde Francis inhibitoren, zijn in het serum en in vele secreten van mensen en dieren gevonden. Behalve, dat zij in staat zijn zich met het virus te binden, kunnen zij ook door de genoemde enzymen worden vernietigd.

3. *Columbia SK-virus.*

Het Columbia SK-virus is voor het eerst beschreven in 1940 door JUNGBLUT e. s. (56). De oorspronkelijke stam was geïsoleerd uit de faeces van een patient met een abortieve vorm van poliomyelitis (TRASK e. a.). Enige malen gelukte het nu van een vroege apenpassage (11de, 14de—16de en 18de) via katoenratten (*Sigmodon hispidus littoralis*) dit virus te adapteren aan muizen. Dit geschiedde in 1939 en 1940 aan de Columbia University te New York. Vandaar stamt de naam, die aan deze virussen is gegeven: Columbia SK; SK duidt de naam van de patient aan, bij wie het oorspronkelijke virus geïsoleerd werd.

In de verschillende proeven, die verricht werden met het adapteren van de op apen aangehouden oorspronkelijke stam, bleek, dat dit virus een grote labiliteit bezat. Nu eens leverde het via de katoenrat een stam met hoge infectietiters in rodentia (Columbia SK-type), dan weer één met een zeer lage. Deze laatste werd Yale SK genoemd en toonde in vele opzichten verwantschap met het Lansing type van poliomyelitisvirus (TOOMEY en TAKACS; MELNICK (71); LAWSON en MELNICK; MELNICK en WARD). Er is toen grote onenigheid ontstaan tussen de verschillende onderzoekers over de vraag, in hoeverre deze stammen met hoge titer, zoals het Columbia SK-virus, nog verwant waren aan het uit het menselijke materiaal geïsoleerde oorspronkelijke virus, waarbij DICK (27) en vooral MELNICK (73) trachtten aan te tonen, dat het hier slechts ging om een virus, dat in de katoenratpassage opgepikt was en dat bij deze dieren spontaan zou voorkomen.

Tot de groep van het Columbia SK-virus kunnen ook gerekend worden: het MM virus (JUNGBLUT en DALLDORF), het encephalomyocarditisvirus (EMC) (SCHMIDT), en het Mengo-virus (DICK, SMITHEBURN en HADDOW; DICK (26)). Zij hebben allerlei eigenschappen met elkander gemeen en ook hun antigene verwantschap is zeer nauw.

Voorals in de laatste jaren is het aan een aantal onderzoekers in Europa gelukt om uit materiaal van mensen afkomstig, tot deze groep behorende virusstammen te isoleren (KOCH; BIELING; BELLER en KELLER; VIVELL; VERLINDE en VAN TONGEREN). Door deze waarnemingen en ook door die van SMADEL en WARREN over het voorkomen van antilichamen tegen een virus van deze groep in het serum van mensen, is veel steun verleend aan de opvattingen van JUNGBLUT, dat hier sprake is van een ook bij mensen voorkomend virus. Er is evenwel nog niet gebleken, dat deze virusstammen ook dezelfde ziekte kunnen veroorzaken als de zogenaamde klassieke poliomyelitisstammen.

Door verschillende onderzoekers kon vastgesteld worden, dat de virussen van de Columbia SK-groep in staat waren schapenerythro-

cyten te doen agglutineren (HALLAUER (46); BREMER en MUTSAARS; VERLINDE en DE BAAN; DE BAAN; OLITZKY en YAGER).

Stammen, behorende tot het Lansing type van het poliomyelitisvirus, voor zover die ook op muizen voortgekweekt kunnen worden, werden hiertoe niet in staat gevonden (DE BAAN).

Dit verschijnsel der haemagglutinatie werd uitvoerig verder onderzocht. Hierbij bleek, dat ook de rode bloedlichaampjes van een aantal andere diersoorten (rat, cavia, paard) en van mensen door dit virus geagglutineerd konden worden, mits men maar in het ionenmilieu, waarin de agglutinaties plaats vonden, enige veranderingen aanbracht (HALLAUER (47); HORVATH en JUNGEBLUT). HALLAUER vond in zijn experimenten over ionen en temperatuurinvloed op adsorptie, haemagglutinatie en elutie van de virussen der Columbia SK groep, dat bij een bepaalde concentratie van het Na-ion in het milieu de haemagglutinatie titer voor het Columbia SK-virus zijn maximum bereikte. Deze concentratie van het NaCl lag beneden de isotonische, en om isotonie te verkrijgen, maakte hij gebruik van NaCl-glucosemengsels.

HORVATH en JUNGEBLUT kozen een milieu, waarin het Na-ion was vervangen door het K-ion, want het was gebleken, dat de maximum agglutinatie titer bij een concentratie van het K-ion lag, die ongeveer overeenkwam met die van een isotonische oplossing van KCl (VIVELL en MAUER).

Kippen-, muizen- en konijnenerythrocyten konden tot nu toe op geen enkele manier door virussen van deze groep tot agglutinatie gebracht worden.

Van een gemakkelijke elutie van het Columbia SK-virus van de erythrocyten, zoals dat bij het influenzavirus gevonden is, was geen sprake. Door verhoging van de temperatuur tot 37° C. meenden OLITZKY en YAGER elutie te zien optreden; DE BAAN kon dit niet aantonen, terwijl HORVATH en JUNGEBLUT, werkend in veronalbuffer, slechts een zeer geringe elutie vonden. HALLAUER kon in een hyper-tonische NaCl-oplossing wel elutie verkrijgen en daarbij bleek het hem, dat de erythrocyten daarna hun agglutinatievermogen voor het Columbia SK-virus volkomen behouden hadden. Op grond hiervan nam hij aan, dat in tegenstelling tot het influenzavirus, het Columbia SK-virus geen enzymwerking op de cellen uitoefende.

De haemagglutinatie en eveneens de adsorptie en elutie van de virussen dezer groep bleken dus zeer afhankelijk van allerlei milieu-factoren te zijn. (Ionenconcentratie, temperatuur).

Hoewel niet geheel vaststaand, mag toch wel aangenomen worden, dat het haemagglutinine identiek is met het infectieuze agens. Hier-voor pleit o. a., dat er een overeenkomst bestaat tussen infectietiter en haemagglutinatie titer van virushoudend materiaal, verkregen van verschillende diersoorten. Wel valt daarbij op te merken, dat door

het bepalen der haemagglutinatie-titer geringe hoeveelheden virus niet opgemerkt worden, hetgeen wel geschiedt in de dierproef. We zouden dit kunnen vergelijken met twee verschillend gevoelige balansen, waarbij in het onderhavige geval de bepaling der infectietiter in de dierproef de gevoeligste voorstelt.

De invloed van cholerafiltraat werd ook nagegaan zowel op de haemagglutinatieractie, als op de infectie van muizen met Columbia SK-virus. Het resultaat van deze proeven werd beschreven in het proefschrift van DE BAAN. Hij kon aantonen, dat schapenerythrocyten door voorbehandeling met ruw cholerafiltraat hun vermogen om met Columbia SK-virussuspensies te agglutineren verloren hadden. Tevens werd door hem vastgesteld, dat cholerafiltraat, in de peritoneaalholte van muizen gebracht, in staat was een daaropvolgende besmetting met Columbia SK-virus langs dezelfde weg te voorkomen of uit te stellen. Ook hier was in vivo slechts sprake van een tijdelijk verdwenen zijn der virusreceptoren, evenals dit in overeenkomstige proeven met het influenzavirus het geval bleek te zijn geweest.

DE BAAN wees vervolgens, vooral op grond van de ervaringen opgedaan met cholerafiltraat, op de grote mate van overeenkomst tussen receptoren voor deze beide groepen van virussen (influenzagroep en Columbia SK-groep).

4. *Het menselijke speeksel met een aantal daarin voorkomende bestanddelen en de rol, die enige daarvan misschien spelen bij allerlei infecties.*

Het menselijke speeksel is een kleurloze meer of minder visceuze stof. Bij staan aan de lucht vormt er zich dikwijls een vliesje van CaCO_3 aan de oppervlakte. De pH van speeksel ligt meestal tussen 6,4 en 6,9.

Vele anorganische en organische stoffen zijn er in het speeksel aanwezig. Van de eerste moeten vooral genoemd worden K^+ , PO_4^{--} , Cl^- , Na^+ , Ca^{++} en SO_4^{--} .

Soms kunnen deze verbindingen met elkaar aangaan, waarbij o.a. CaCO_3 en $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ kunnen ontstaan.

Tot de organische bestanddelen in het speeksel behoren albumines, globulines, ureum, mucinen en vele enzymen; van de laatste groep zijn de bij de spijsvertering een rol spelende, zoals bijvoorbeeld het ptyaline, het meest bekend (61).

Ook kunnen er in speeksel velerlei microörganismen voorkomen, zoals micrococci, staphylococci, streptococci, diverse grampositieve en gramnegatieve staafjes en spirochaeten (100).

Door verschillende onderzoekers (YAMAKAMI; GREENFIELD; LEHRS; SASAKI) werden bloedgroepantigenen in het speeksel aangetoond.

Bij het onderzoek van een groter aantal personen bleek het, dat niet allen deze stoffen met hun speeksels uitscheidten (LEHRS; SCHIFF (84); SCHIFF en AKUNE; SCHIFF en SASAKI). Zo kwam men tot de verdeling in „secretors” en „non-secretors”; de eersten scheiden regelmatig de bloedgroeps substantie uit met hun speeksels, en bij de laatsten wordt deze hierin niet of nauwelijks aangetroffen.

Behalve de bloedgroepantigenen werden er in de speeksels van vele mensen ook zogenaamde bloedgroepenfermenten, die de bloedgroeps substantie konden afbreken, aangetroffen (SCHIFF en AKUNE, SCHIFF en WEILER, SIEVERS, STIMPFL, SCHIFF en BURON). Door deze onderzoekers werden ook uitgebreide experimenten verricht omtrent de aard van deze fermenten en de wijze van uitscheiding ervan. Behalve in het speeksel heeft men ze ook in de faeces gevonden. Tussen de mensen onderling waren er grote verschillen in het gehalte aan deze fermenten in het speeksel opgevallen en bij éénzelfde persoon werden niet alleen van dag tot dag verschillen in de uitscheiding geconstateerd, maar ook bleken de speekselporties, op verschillende tijdstippen van de dag verkregen, sterk wisselende hoeveelheden van dit „bloedgroepenferment” te bevatten. De in nuchtere staat gewonnen porties waren het rijkst aan de stof, na het ontbijt was het gehalte belangrijk gedaald om daarna weer langzaam te stijgen. De volgende maaltijd gaf opnieuw een daling te zien, die weer gevolgd werd door een langzame stijging (SIEVERS). Deze onderzoeker vond geen verband met het diastasegehalte van het speeksel.

SCHIFF en BURON konden o. a. aantonen, dat door prikkeling van de sympathicus een duidelijke stijging van het fermentgehalte in het geproduceerde speeksel te voorschijn geroepen kon worden. Dit pleit tegen een bacteriële origine van het ferment.

Een grote moeilijkheid bleef nog om de herkomst van deze bloedgroeps substantie afbrekende stof vast te stellen. WITEBSKY en SATOH meenden te kunnen opmerken, dat het werkzame principe overentbaar was. Uit de faeces kon SCHIFF *Clostridium Welchii* kweken en deze bleek bloedgroeps substantie te kunnen vernietigen. Ook CHASE beschreef een bacterie, die bloedgroep A-substantie kon afbreken en hij maakte bovendien melding van enige, door anderen beschreven, microorganismen, die eveneens dit vermogen bezaten.

Een grondig onderzoek over bloedgroeps substanties in de verschillende organen van het menselijk lichaam en in secreta werd verricht door GRETHE HARTMANN. In haar proefschrift vindt men eveneens een uitgebreid literatuuroverzicht. Ook besprak zij de argumenten voor en tegen de opvatting, dat er van een bacteriële origine der bewuste fermenten sprake zou zijn. Uit haar eigen onderzoekingen concludeerde ze, dat inderdaad in de submaxillaire speekselklieren een ferment aanwezig was, dat bloedgroeps substantie in speeksel langzaam kon afbreken, en ook in de m. quadriceps kon zij het aantonen.

In speeksels zelf meende zij echter de afbrekende werking voor het merendeel aan bacteriën te moeten toeschrijven, want in monsters, die enige tijd hadden gestaan bij 37° C., en waar duidelijke bacteriëngroei had plaats gevonden, werd de bloedgroeps substantie snel afgebroken, terwijl in sommige speeksels, die helder bleven, een langzame afbraak optrad. Men moet uit haar proeven dus de gevolgtrekking maken, dat inderdaad dergelijke enzymen door het menselijk lichaam gemaakt kunnen worden en ook in het speeksel uitgescheiden worden, maar dat misschien vaak bacteriën in het speeksel voor deze werking verantwoordelijk zijn. Men denke echter bij het beoordelen van haar bevindingen bij de speeksels, die enige uren bij 37° C. hadden vertoefd, ook aan wat SCHIFF en BURON mededeelden over het vrijkomen van dit ferment door autolyse in sedimentrijke speeksels.

Helaas maakte zij geen melding van bacteriologische onderzoekingen van deze speeksels, waaruit zou kunnen blijken, of de daar gegroeide microörganismen inderdaad zulk een ferment konden produceren.

Onlangs werd in speeksels van verschillende mensen door JUNGEBLUT en zijn medewerkers een stof gevonden, die in staat was de agglutinabiliteit van schapenerythrocyten voor Columbia SK-virus te niet te doen. Volgens hem was deze substantie verschillend van het lysozyme (FLEMING en ALLISON), en van de speekselymase. De uitscheiding ervan zou onafhankelijk zijn van:

1. sexe;
2. ogenblik van afname;
3. dieet- of rookgewoonten;
4. zwangerschap;
5. menstruele cyclus;
6. bloedgroepen in het ABO-systeem.

Het meest opvallende, dat zij meenden waar te nemen, was, dat deze stof zo frequent en in zo sterke mate in de speeksels van poliomyelitispatienten gevonden werd. Van 17 lijders aan deze ziekte vonden zij er 12 sterk positief in dit opzicht. Het waren deze laatste vondsten, die ons er toe brachten een nader onderzoek in te stellen naar het voorkomen van deze stof bij een groep mensen, waaronder vele poliomyelitispatienten, en naar een aantal van zijn eigenschappen.

In dezelfde publicatie maakten JUNGEBLUT e.s. bovendien nog melding van een coetostabiele factor in speeksel, die in staat was Columbia SK-virus te neutraliseren in de muizenproef. De laatstgenoemde stof bleek niet identiek te zijn met het bovengenoemde principe, dat de haemagglutinatie verhinderde. JUNGEBLUT opperde wel de mogelijkheid van een identiteit met een „poliocidal factor”, waarover reeds vroeger een publicatie van zijn hand verscheen (55).

Vermeldenswaard in dit verband is ook een artikel van ARMSTRONG, dat handelt over de mogelijke seizoensinvloed op het voor-

komen van poliomyelitis. Het bleek hem, dat slijmige secreten uit de maag in staat waren het Lansing type van poliomyelitisvirus zodanig te beïnvloeden, dat na een infectie met het aldus behandelde virus, minder muizen stierven dan na besmetting met onbehandeld virus. Het mucine scheen een zekere bescherming te kunnen geven tegen de infectie met deze poliomyelitisstam. Door hem werd erop gewezen, dat mucine hier dus een andere werking had dan op bacteriën, waar juist van een bevordering der groei sprake zou zijn (NUNGESTER c.s.). Hij sprak het vermoeden uit, dat de temperatuur en de vochtigheidsgraad gedurende de nazomer in de gematigde zones een zodanige invloed hebben op de secretie van de bovenste luchtwegen, dat daardoor het gehalte aan slijmige stoffen, die misschien poliomyelitisvirus enigszins zouden kunnen tegenhouden, gering is. Deze voor dit virus vrij gunstige omstandigheden in genoemd jaargetijde, zouden een verklaring kunnen vormen voor het frequente voorkomen van de ziekte gedurende die periode.

Tenslotte zouden wij nog de aandacht willen vestigen op het voorkomen in speeksel van stoffen, die de groei van de eigen speekselbacteriën, maar ook van talrijke andere (o. a. diphtheriebacillen, pneumococci) kunnen remmen of verhinderen. Het was DOLD, die voor het eerst op het bestaan van deze substanties wees, en hij gaf er de naam „inhibines” aan. Van hem en zijn medewerkers verscheen er een reeks publicaties over deze inhibines; het bleek hun, dat hier sprake was van een thermolabele stof, die bij 56° C. reeds na ongeveer 5 minuten vernietigd werd, terwijl 52° C. nauwelijks een half uur verdragen werd. Ook bewaren bij kamertemperatuur en zelfs bij 3° C. gedurende een aantal dagen was reeds schadelijk (29, 106).

Het gehalte aan inhibines in het speeksel wisselde zeer sterk en ook bij éénzelfde proefpersoon traden van dag tot dag nog verschillen in de uitscheiding op. Eveneens bleken er in de loop van de dag wisselingen te zijn (9, 107).

BORTELS (10) meende ook te kunnen vaststellen, dat het verloop van de luchtdruk een invloed op de uitscheiding van de inhibines uitoefende. Een daling van de barometerstanden zou na enige dagen gevolgd worden door vermindering der inhibine uitscheiding, terwijl een daarna komende stijging weer een toename van het inhibinegehalte zou veroorzaken.

Niet alleen in het speeksel, maar ook in neussecret (54), trachea-secret, op de pleura en in de huid (33) werd deze stof gevonden, en in steriel verkregen afscheiding van de gl. submaxillaris van honden (31) en in steriele melk van mens of rund (30) konden deze inhibines eveneens aangetoond worden. Voor DOLD (32) stond het dan ook wel vast, dat de inhibinewerking niet berustte op een antagonistische werking van bepaalde bacteriën in de mondholte.

III MATERIAAL EN METHODEN VAN EIGEN ONDERZOEK

GEBRUIKTE MATERIALEN

1. *Speeksels*

Als regel lieten we de proefpersonen de speekselmonsters liefst vóór de maaltijden produceren en niet daarna, wanneer nog veel voedselresten in de mond aanwezig zijn. Bij de kleinere kinderen was het vaak niet gemakkelijk om voldoende speeksel te verkrijgen.

Meestal werd een hoeveelheid van ongeveer 3 cc. opgevangen in een schoon flesje. Zeer geschikt hiervoor waren goed gereinigde penicillineflesjes.

Van iedere proefpersoon werden ongeveer 8 op verschillende, meestal achtereenvolgende dagen verkregen porties onderzocht. Na afname werden de speeksels in de koelkast bij een temperatuur van ongeveer 4° C. geplaatst en na één of meer dagen werden ze ons toegezonden, waarna ze soms, voordat ze gebruikt werden, ook nog enige dagen in de koelcel werden bewaard.

Daar de door ons onderzochte factor, zoals later zal blijken, minstens één week kamertemperatuur kon verdragen en bewaren bij 4° C. zeker een maand doorstond, mag aangenomen worden, dat deze werkwijze geen schadelijke gevolgen voor de X-factor heeft gehad. Een correlatie tussen de duur van het bewaren en de gevonden hoeveelheid X-factor werd ook niet opgemerkt.

2. *Bufferoplossing*

Alle verdunningen en suspensies werden, tenzij anders vermeld zal worden, gemaakt met kaliumveronalbuffer, aangeduid als KVB, die op de volgende wijze werd bereid (70): 910 mgr. veronal (diaethylbarbituurzuur) werden gesuspendeerd in ongeveer 100 cc. aqua destillata. Toegevoegd werden 1,82 cc. normaal KOH; de veronal werd onder verwarming opgelost, en daarna werden 10,8 gr. KCl toegevoegd en vervolgens werd het volume aangevuld tot 1000 cc. De pH bedroeg dan 7,6.

3. *Erythrocyten*

In de meeste van onze proeven gebruikten we erythrocyten van mensen, die behoorden tot de bloedgroep O. Waar in het vervolg over O-erythrocyten wordt gesproken, zijn deze cellen bedoeld. Ze

werden verkregen door van een donor enige cc. bloed op te vangen in een glucose-citraat oplossing, zoals door de Nederlandse bloed-transfusiediensten wordt gebruikt. (70 cc. Na-citraat 3,3 % en 20 cc. glucose 15 % voor 400 cc. bloed).

Het bloed van 3 of meer donores werd bijeengevoegd en daarna werden de erythrocyten afgecentrifugeerd. Dan volgde nog twee maal wassen met KVB of met physiologische NaCl-oplossing. De cellen werden „samengepakt” in de ijskast (4° C.) bewaard gedurende ten hoogste 6 dagen. Voor iedere proef werd hiervan opnieuw een suspensie van de verlangde sterkte gemaakt.

De erythrocyten van de verschillende dieren, die we in het onderzoek naar de eigenschappen van de X-factor gebruikten, verkregen we door een hoeveelheid bloed op te vangen in een 3,8 % oplossing van Na-citraat (1 vol. bloed op 4 vol. citraatoplossing). Na centrifugatie en vervolgens nog tweemaal wassen met overmaat KVB of physiologische NaCl-oplossing werden deze erythrocyten, ook in samengepakte staat, in de ijskast geplaatst.

De schapenerythrocyten werden altijd verkregen door bloed uit de vena jugularis op te vangen in een fles met glazen kralen, die goed geschud werd om stolling te voorkomen. Na afcentrifugeren van de cellen en wassen op de bovenbeschreven wijze, werden ze op dezelfde manier bij 4° C. bewaard.

Voor ieder experiment werd steeds een verse suspensie bereid. Nooit werden hiervoor cellen gebruikt, die meer dan één week gestaan hadden.

4. *Virus*

Voor de haemagglutinatiereacties werd gebruik gemaakt van suspensies van hersenen van muizen, die met Columbia SK-virus waren besmet.

Uitgegaan werd van een stam van dit virus uit muizenhersenen, die we van prof. JUNGBLUT uit New-York kregen. Het was een 534ste muispassage van het virus.

De hersenen werden in een mortier fijngegreven en daarna werd met steriele physiologische NaCl-oplossing een 10 % suspensie gemaakt. Vervolgens werd de verkregen 10 % suspensie gecentrifugeerd (5 minuten op 3000 toeren per minuut (= 3000 r. p. m.)). De bovenstaande vloeistof werd afgegoten en was dan voor verder gebruik gereed. Met steriele physiologische NaCl-oplossing werden 10-voudige verdunningen gemaakt. Met de suspensies van de diluties 10^{-5} en 10^{-6} werden 6—8 weken oude witte muizen („Swiss mice”) ingespoten (0,03 cc. intracerebraal per muis). Na 40—60 uren kregen deze muizen verlammingen, bijna steeds van de achterpoten, of encephalitische verschijnselen of beide. De dieren werden dan afgemaakt en hun hersenen werden bewaard bij —20° C. voor het maken van nieuwe muispassages of voor gebruik in onze haemagglutinatieproeven.

5. *AB-serum*

Voor het onderzoek van de „panagglutinatie” maakten we gebruik van serum van mensen behorende tot de bloedgroep AB, dat we ontvingen van het „Centraal Laboratorium van de Bloedtransfusiedienst van het Nederlandse Rode Kruis” te Amsterdam.

6. *Cholerafiltraat*

Het cholerafiltraat voor onze experimenten werd bereid volgens een methode door KRET e.s. in ons laboratorium ontwikkeld.

Een cholera-stam, die verkregen was uit een bepaalde kloon (K 6) van het type Inaba, wordt onderhouden op bouillonagar.

De vloeibare voedingsbodem voor het bereiden van cholerafiltraat werd samengesteld uit:

1. bouillon;
2. 3 % pepton;
3. 0,1 % glucose;
4. 0,5 % NaCl en
5. $\frac{2}{15}$ mol fosphaatbuffer (pH 7,5).

De gemaakte hoeveelheid werd verdeeld over Roux flessen, zodat iedere fles 150 cc. bevatte. De bovengenoemde agarcultures van *V. cholerae* (stam Inaba) werden geschud met physiologische NaCl-oplossing en deze vloeistof werd geënt in de Roux flessen (1 druppel per 10 cc. vloeibare voedingsbodem). Vervolgens werd 24 uren gecubeerd bij 37° C.

De vloeibare voedingsbodems werden hierna afgecentrifugeerd in een centrifuge van het type „Sharpless” (25000 r. p. m.).

De aldus verkregen ruwe filtraten werden bewaard bij — 20° C., waardoor eventueel sporadisch nog aanwezige cholera-vibrionen tevens werden gedood. Na ontdooien was de stof gereed voor gebruik.

7. *Glaswerk*

De haemagglutinatiereacties werden alle verricht in buisjes met een doorsnede van 8 mm. en een lengte van 7 cm.

De behandeling van de erythrocyten met speeksel of andere stoffen geschiedde in grotere buizen, wier doorsnede 1,3 cm. bedroeg, terwijl ze een lengte van 12 cm. hadden.

Alle glaswerk werd na gebruik enige minuten in aqua destillata gekookt. Daarna werden de buizen goed gewassen en geborsteld met een oplossing van „Twinko”, een detergens-bevattend wasmiddel, in leidingwater. Na enige malen goed spoelen met leidingwater werd drie maal zorgvuldig nagespoeld met aqua destillata. Dan werden de buizen gedroogd in een gasstoof, en hiermede waren ze weer voor gebruik gereed.

BESCHRIJVING VAN ENIGE METHODEN VAN ONDERZOEK

1. *Bepaling van de invloed op de haemagglutinatie door het Columbia SK-virus.*

Een proef om te bepalen, of en hoeveel van de door ons onderzochte factor (X-factor) in speeksel voorkwam, werd op de volgende wijze opgezet:

Van het te onderzoeken speeksel werden in buizen met een doorsnede van 1,3 cm. verdunningen gemaakt van 1:2,5, 1:5, 1:10 en 1:20. In iedere buis kwam 1 cc. verdunning. Aan iedere speekselverdunding werd nu 1 cc. $\frac{1}{2}$ % suspensie van O-erythrocyten toegevoegd. De buizen werden goed geschud, waarna ze een uur bij kamertemperatuur bleven staan. Vervolgens werden ze gezamenlijk gecentrifugeerd (5 minuten op 2700 r. p. m.). De bovenstaande vloeistof in iedere buis werd zo goed mogelijk afgegoten en dan werden de erythrocyten geresuspendeerd tot het oorspronkelijke volume, zodat er nu een $\frac{1}{4}$ % suspensie van behandelde erythrocyten verkregen was. Hiermee werden 7 op een rij staande haemagglutinatiebuisjes gevuld, zodat ieder buisje 0,2 cc. suspensie bevatte.

Inmiddels waren ook de verdunningen van het Columbia SK-virus gereed gemaakt. Op de boven reeds beschreven wijze werd, nu met KVB, de 10 % virussuspensie bereid. Hiervan werden verder tweevoudige verdunningen gemaakt. Bij het eerste buisje met erythrocytensuspensie kwam 0,2 cc. 1:20 Columbia SK-virussuspensie, bij het tweede 0,2 cc. 1:40 enz. t/m 1:640 in het zesde. Aan het zevende buisje, dat als contrôle diende, werd in plaats van het Columbia SK-virus 0,2 cc. KVB toegevoegd. Ook werd een rij buisjes ingezet, waarin tweevoudige Columbia SK-virus verdunningen en een $\frac{1}{4}$ % suspensie van onbehandelde O-erythrocyten in gelijke hoeveelheden (0,2 cc.) waren samengebracht. Deze diende om de haemagglutinatie-titer van het gebruikte Columbia SK-virus te bepalen.

Voor iedere proef werd opnieuw een 10 % Columbia SK-virus-suspensie gemaakt en daarvan de opeenvolgende verdunningen.

Nadat het virus aan de cellen was toegevoegd, werden de buisjes flink geschud en in de ijskast bij 4° C. geplaatst. Na 3—5 uur werd meestal afgelezen. Daarna veranderden de titers der haemagglutinatie nauwelijks meer.

Er werd afgelezen met het blote oog, na voorzichtig opschudden van de uitgezakte cellen.

De waardering geschiedde op de volgende wijze: ++++ (= 4) = één opdarrelende klomp, +++ (= 3) = enige grote brokken, ++ (= 2) = kleinere brokjes, + (= 1) = nog duidelijk waarneembare fijne korreltjes, ±/+ = nog juist waarneembare korreltjes, ± = twijfelachtige korreling, waarbij nauwelijks verschil was met de negatieve contrôle.

Bij een X-factor bevattend speekselmonster (in den vervolge vaak aan te duiden als positief speeksel) kregen we nu bijvoorbeeld het resultaat, zoals in tabel 1 is aangegeven.

TABEL 1

Voorbeeld van de bepaling van X-factor in een speekselmonster

	Verdunningen van het Columbia SK-virus						
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	contrôle
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (onbehandeld)	3**	2	1/2	1	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (sp. 1:2,5) *	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (sp. 1:5)	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (sp. 1:10)	1	±	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (sp. 1:20)	1/2	1	±/+	—	—	—	—

* $\frac{1}{4}$ % 0-er. (sp. 1:2,5) = $\frac{1}{4}$ % suspensie van O-erythrocyten, behandeld met speeksel in de verdunning 1:2,5.

** 3 = +++, 1/2 = +/- enz.

Het blijkt dus, dat er een duidelijke correlatie is tussen de verdunning van het speeksel, die op de erythrocyten heeft ingewerkt en de sterkte van de vermindering van het vermogen door Columbia SK-virus geagglutineerd te kunnen worden.

De verschillende speekselporties werkten niet even sterk. Om deze sterkte nu enigszins te kunnen vergelijken, werd de volgende berekening toegepast, waarbij de uitkomst in tabel 1 als voorbeeld gekozen werd.

De viruscontrôle gaf een goede agglutinatie te zien in 4 buisjes. Daarom noemden we de sterkte hiervan: 4. De erythrocyten, behandeld met speeksel 1:20 gaven in de eerste twee buisjes een goede agglutinatie en in het derde ±/+. De sterkte van de haemagglutinatie werd nu $2\frac{3}{4}$ genoemd en het verschil met de contrôle was dus $1\frac{1}{4}$. De agglutinatie van de erythrocyten, die behandeld waren met speeksel 1:10, noemden we $1\frac{1}{2}$ en het verschil met de contrôle was hier = $2\frac{1}{2}$. De cellen, behandeld met speeksel 1:5 agglutineerden niet meer; deze was dus 0 en het verschil met de viruscontrôle werd nu = 4. Erythrocyten, die behandeld waren met speeksel 1:2,5 gaven

ook geen agglutinatie na contact met de virusverduunningen. Hier extrapoleerden we en de agglutinatie werd — 1 genoemd, waarbij het verschil = 5 werd. Er kon n.l. verwacht worden, dat deze erythrocyten ook door een virusverduunning 1:10 niet geagglutineerd zouden zijn. De vier verschillen werden bij elkaar geteld en de sterkte van het speeksel werd in dit geval dan $12\frac{3}{4}$ genoemd.

Op deze wijze bleek het mogelijk zich een zekere indruk te vormen over het gehalte aan X-factor van de verschillende speekselporties. Deze vergelijking heeft natuurlijk alleen maar zin, zolang men speeksels neemt, die in dezelfde verduunningen (1:2,5, 1:5, 1:10, 1:20) en gedurende een zelfde tijd (1 uur) op de erythrocyten hebben ingewerkt. Ook kan men alleen maar zeggen, dat een speeksel met sterkte 12 meer X-factor werking heeft dan één met sterkte 6, maar niet, dat het eerste twee maal zo sterk werkt.

Wanneer we nu weer ons oog richten op de hierboven genoemde uitkomst, dan zien we, dat ook in ander opzicht het getal $12\frac{3}{4}$ slechts betrekkelijke waarde heeft. Men zou zich n.l. zeer goed kunnen voorstellen, dat bij een herhaling van de proeven in enige rijen een \pm meer of minder afgelezen zou worden. De methode van aflezen blijft altijd vrij grof. De sterkte van dit speeksel zou dus bij herhalingen wel kunnen schommelen om de waarde van $12\frac{3}{4}$.

Wij zijn er ons van bewust, dat er nog vele andere methoden geweest zouden zijn om de sterkte van de speeksels in een getal uit te drukken. Wanneer men zich echter rekenschap geeft van de betrekkelijkheid der getallen, geloven we, dat de bovenbeschreven wijze van berekenen uitkomsten heeft gegeven, waardoor we in staat zijn geweest een voldoende indruk te krijgen van de onderlinge sterkte der porties. Bij de indeling der speeksels in meer en minder sterk positieve gingen we op de volgende manier te werk: —: 0, \pm : 0—4, + (= 1): 4 t/m $7\frac{3}{4}$, ++ (= 2): 8 t/m 12, +++ (= 3): $12\frac{1}{4}$ t/m 16, ++++ (= 4): $16\frac{1}{4}$ t/m 20, +++++ (= 5): meer dan 20.

2. Bepaling van de invloed op de „panagglutinabiliteit” der 0-erythrocyten.

De proeven, waarin bepaald werd, of er aan de erythrocyten T-antigeen was gevormd (het zogenaamde phenomeen van THOMSEN-FRIEDENREICH) werden aldus opgezet. De erythrocyten werden eerst, op dezelfde wijze als boven beschreven, met speeksel (of cholerafiltraat) behandeld, eventueel in verschillende verduunningen. Ook werden er daarna agglutinatiebuisjes van dezelfde soort mee gevuld, maar in plaats van de Columbia SK-virusverduunningen voegden we nu toe 0,2 cc. van een verduunning van serum van mensen, behorende tot de bloedgroep AB. In de eerste proeven zetten we niet altijd een contrôle in van normale erythrocyten met AB-serum verduunningen. Later werd dit

wel gedaan, waarbij bleek, dat er vaak in de gebruikte AB-sera een a-specifieke koude agglutinatie was tot een titer 1:2 of 1:4.

Evenals in de Columbia SK-agglutinatieproef werd ook hier de opgetreden klontering bepaald, nadat de buisjes gedurende enige tijd (meestal 3 uren) in de koude hadden gestaan.

Er werd dan voorzichtig opgeschud en de agglutinatie werd vervolgens met het blote oog afgelezen. De klonteringen waren altijd veel geringer dan in de proeven met het Columbia SK-virus en het bepalen van het eindpunt der agglutinatie kostte dan ook wat meer moeite.

Wat betreft deze reacties valt nog het volgende op te merken. Bij het bloedgroepenonderzoek en de bepaling van de hoeveelheid bloedgroepenagglutinines in sera wordt steeds gebruik gemaakt van erythrocytensuspensies van ongeveer 1—2 %, terwijl hier ook altijd gewerkt wordt in NaCl-milieu. Wij moesten dus nagaan, of de uitkomsten, volgens de door ons toegepaste techniek verkregen, in belangrijke mate verschilden van de vorengenoemde.

Met het oog hierop werd de invloed onderzocht van de concentratie van de erythrocyten op de T-agglutinatie, van de duur der inwerking bij enige temperaturen, en ook, of er verschil bestond in agglutinatie-titer bij gebruik van NaCl of KVB als verdunningsvloeistof.

De resultaten zijn in de tabellen 2, 3 en 4 vermeld.

Tabel 2 toont aan, dat in het Na-milieu bij 4° C. de T-agglutinatie gemiddeld een buisje verder kwam dan in KVB, hetgeen een onbelangrijk verschil was. Verder bleek het, dat hoe meer tijd er verstreek voor de aflezing, hoe hoger de titer werd, waarbij dan ook de erythrocyten, behandeld met hogere verdunningen cholera-filtraat, de maximale titer bereikten. Zowel in Na- als in K-milieu werd dit gevonden.

Uit tabel 3 blijkt, dat bij een temperatuur van 4° C. de hoogste agglutinatie-titers werden bereikt. Bij kamertemperatuur trad er ook nog enige agglutinatie op, maar bij 37° C. was daar geen sprake meer van.

De concentratie van de erythrocytensuspensie had geen enkele invloed op de titer, zoals tabel 4 toont. Hierbij viel alleen nog op te merken, dat de agglutinatie in de ¼ % erythrocytensuspensie macroscopisch het duidelijkst was af te lezen.

Samenvattend kan men dus zeggen, dat het uit deze experimenten gebleken is, dat de door ons toegepaste werkwijze bij de T-agglutinatie geen noemenswaardig verschil gaf met die, die door de meeste immunohaematologen wordt gevolgd.

In onze proeven lazen we meestal af na 3 uur. We hebben hier nooit, zoals we in de speekselproeven met Columbia SK-virus deden, getracht de agglutinatiesterkte quantitatief uit te drukken

TABEL 2

Onderzoek naar de sterkte der T-agglutinatie van $\frac{1}{4}$ % 0-erythrocyten, die in een $\frac{1}{2}$ % suspensie met vier verschillende cholerafiltraatverduunningen waren behandeld, waarbij zowel in Na-milieu (NaCl) als in K-milieu (KVB) geagglutineerd werd. Aflezing na verschillende tijden.

Verduunningen van het AB-serum	NaCl							KVB						
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	co	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	co
Aflezing na 1 uur bij 4° C.														
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (onbehandeld)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. * (chol. filtr. 1: 200)	2	1	±	—	—	—	—	1	±	±	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (chol. filtr. 1: 400)	1	±/+	±	—	—	—	—	1	±	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (chol. filtr. 1: 800)	1	±	—	—	—	—	—	±/+	±	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (chol. filtr. 1: 1600)	1	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	—	—
Aflezing na 2½ uur bij 4° C.														
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (onbehandeld)	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (chol. filtr. 1: 200)	2	2	1/2	1	±	—	—	2	1	1/2	±/+	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (chol. filtr. 1: 400)	2/3	2	1	±	—	—	—	2	1	1	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (chol. filtr. 1: 800)	2/3	1/2	1	—	—	—	—	1/2	1	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (chol. filtr. 1: 1600)	1/2	2	±	—	—	—	—	±/+	—	—	—	—	—	—
Aflezing na 5 uur bij 4° C.														
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (onbehandeld)	±	—	—	—	—	—	—	±/+	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (chol. filtr. 1: 200)	3	1/2	1/2	1	±	—	—	2	2	1	1	±	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (chol. filtr. 1: 400)	1/2	1	1	1	±	—	—	1	1	1	1	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (chol. filtr. 1: 800)	2	1/2	1	1	—	—	—	1	1	1	±	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (chol. filtr. 1: 1600)	2	1	1	±	—	—	—	1	1	±	—	—	—	—

* $\frac{1}{4}$ % 0-er. (chol. filtr. 1: 200) = $\frac{1}{4}$ % suspensie van 0-erythrocyten, behandeld met cholerafiltraat in de verduunning 1: 200.

TABEL 3

Invloed van de temperatuur op de agglutinatie van 0-erythrocyten, die in 1/2 % suspensie met cholerafiltraat in 4 verdunningen behandeld waren. De verdunningsvloeistof was KVB, de aflezing geschiedde na 1 uur en na 5 uur.

Verdunningen van het AB-serum		na 1 uur							na 5 uur						
		1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	co	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	co
4° C.	1/4 % 0-er. (onbehandeld)	—	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	—	—
	1/4 % 0-er. (chol. filtr. 1: 200)	1	±/+	±	—	—	—	—	2	2	2	1	±	—	—
	1/4 % 0-er. (chol. filtr. 1: 400)	1	±	±	—	—	—	—	2	1/2	1/2	±	—	—	—
	1/4 % 0-er. (chol. filtr. 1: 800)	1	—	—	—	—	—	—	2	2	1	—	—	—	—
	1/4 % 0-er. (chol. filtr. 1: 1600)	—	—	—	—	—	—	—	2	1	±	—	—	—	—
	1/4 % 0-er. (onbehandeld)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
kamertemperatuur	1/4 % 0-er. (chol. filtr. 1: 200)	±	—	—	—	—	—	—	1	1	±	—	—	—	—
	1/4 % 0-er. (chol. filtr. 1: 400)	—	—	—	—	—	—	—	1/2	±	—	—	—	—	—
	1/4 % 0-er. (chol. filtr. 1: 800)	—	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	—	—
	1/4 % 0-er. (chol. filtr. 1: 1600)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1/4 % 0-er. (onbehandeld)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1/4 % 0-er. (chol. filtr. 1: 200)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
37° C.	1/4 % 0-er. (chol. filtr. 1: 400)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1/4 % 0-er. (chol. filtr. 1: 800)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1/4 % 0-er. (chol. filtr. 1: 1600)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1/4 % 0-er. (chol. filtr. 1: 1600)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

TABEL 4

Invloed van de concentratie der met 4 cholerafiltraatverduunningen behandelde 0-erythrocyten suspensies op de T-agglutinatie.

Verduunningen van het AB-serum	4 % suspensie							2 % suspensie							½ % suspensie						
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	co	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	co	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	co
¼ % 0-er. (onbehandeld)	±	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
¼ % 0-er. (chol. filtr. 1: 200)	2	2	1/2	1	—	—	—	1/2	1/2	1/2	1	—	—	—	2	2	1/2	1	±	—	—
¼ % 0-er. (chol. filtr. 1: 400)	2	1/2	1	—	—	—	—	1/2	1/2	±/+	—	—	—	—	2	2	1	—	—	—	—
¼ % 0-er. (chol. filtr. 1: 800)	1/2	1	±	—	—	—	—	1/2	1/2	±	—	—	—	—	1/2	2	1	—	—	—	—
¼ % 0-er. (chol. filtr. 1: 1600)	1	1	—	—	—	—	—	1/2	±/+	—	—	—	—	—	1/2	1	—	—	—	—	—

voor een onderlinge vergelijking van de speekselmonsters, want dan zou het beslist noodzakelijk zijn geweest om altijd na een constant tijdsverloop af te lezen.

3. *Absorptie van AB-sera*

In sommige proeven was het noodzakelijk AB-serum te gebruiken, waaruit het t-agglutinine (anti-T) verwijderd was, terwijl het in de experimenten met andere dan menselijke erythrocyten noodzakelijk was uit de hiervoor bestemde AB-sera de desbetreffende hetero-agglutinines te verwijderen.

Om het eerste te bereiken werden gelijke delen cholerafiltraat en afgecentrifugeerde twee maal gewassen O-erythrocyten gemengd en gedurende 2 uren bij 22° C. geïncubeerd. Deze erythrocyten werden drie maal gewassen met physiologische NaCl-oplossing en daarna werden ze een half uur met AB-serum bij 4° C. geplaatst (1 deel AB-serum en twee delen behandelde erythrocyten). Na dit tijdsverloop werd gecentrifugeerd en de bovenstaande vloeistof werd gebruikt als AB-serum, waaruit het anti-t verwijderd was, hetgeen steeds werd gecontroleerd met O-erythrocyten, die voorbehandeld waren met cholerafiltraat en waarmee dit serum dan geen agglutinatie meer mocht geven.

Voor het verkrijgen van AB-sera, die vrij waren van hetero-agglutinines voor de erythrocyten van bepaalde diersoorten, werd als volgt te werk gegaan:

Om eventueel optredende haemolyse te voorkomen werden de sera geïnactiveerd door ze gedurende een half uur in een waterbad bij 56° C. te plaatsen. Daarna werden ze gemengd met erythrocyten van de desbetreffende diersoort (1 volume AB-serum en 1 volume 50 % erythrocytensuspensie in physiologische NaCl-oplossing) en dit mengsel werd gedurende 1 uur bij 4° C. geplaatst. Nadat deze tijd verstreken was, werden de mengsels gecentrifugeerd en het bovenstaande serum werd afgepipetteerd. Dit behoorde dan geen heteroagglutinines meer te bevatten, hetgeen steeds werd gecontroleerd. Deze aldus van zulke agglutinines ontdane sera zullen, in navolging van FRIEDENREICH, aangeduid worden als „het-vrije” sera.

IV ONDERZOEKINGEN NAAR HET VOORKOMEN
VAN DE X-FACTOR IN HET SPEEKSEL VAN GEZONDE
PERSONEN, LIJDERS AAN POLIOMYELITIS EN LIJDERS
AAN ENIGE ANDERE ZIEKTEN

1. OVERZICHT VAN HET ONDERZOCHE MATERIAAL

In totaal werden van 111 personen speekselmonsters onderzocht. 64 hiervan waren poliomyelitispatienten, bij welke de diagnose gesteld was op grond van het klinische beeld. Er kon nog weer een onderverdeling gemaakt worden in 2 groepen, namelijk diegenen met een aandoening van het centrale zenuwstelsel en zij, die slechts meningitische verschijnselen toonden; vooral op grond van het frequente voorkomen van poliomyelitisgevallen in de naaste omgeving werd deze diagnose dan vaak gesteld.

In tabel 5 zijn deze 111 mensen naar de leeftijd en de klinische diagnose gerangschikt.

TABEL 5

*Overzicht van de personen, van wie speeksel onderzocht werd,
gerangschikt naar leeftijd en diagnose*

	Poliomyelitis			Gezond of andere ziekten		
	C.Z.S. aan- gedaan	alleen menin- gitis	totaal	gezond	andere ziekten	totaal
0—6 jr.	15 (141)*	4 (41)	19 (182)	0	2 (18)	2 (18)
6—12 jr.	12 (111)	9 (84)	21 (195)	11 (96)	9 (68)	20 (164)
12—18 jr.	9 (88)	3 (30)	12 (118)	1 (9)	1 (7)	2 (16)
>18 jr.	11 (108)	1 (8)	12 (116)	23 (318)	0	23 (318)
TOTAAL	47 (448)	17 (163)	64 (611)	35 (423)	12 (93)	47 (516)

* De getallen tussen haakjes geven aan, hoeveel speekselporties in totaal, van de hier vermelde personen, in een bepaalde groep onderzocht werden.

Bij de 12 personen, die zijn ondergebracht in de groep: „andere ziekten”, waren de volgende diagnoses gesteld:

Scarlatina	2	Recidief acuut rheuma.....	1
Bronchiectasieën	2	Encephalitis	1
Tuberculose	2	Haemolytische anaemie	1
Colitis ulcerosa	1	Febris e causa ignota	1
Coeliakie	1		

Deze groep zal geheel samen met die der gezonden worden beschouwd, daar, zoals uit de resultaten der proeven bleek, er geen enkel verschil was met de gezonde personen, wat betreft het gehalte aan X-factor in de speeksels.

Het totale aantal speekselporties, dat onderzocht werd, bedroeg 1127, namelijk 611 in de poliomyelitisgroep en 516 in de andere. In tabel 5 zijn deze aantallen voor de verschillende groepen aangegeven door de tussen haakjes geplaatste getallen. Niet van iedere persoon werden evenveel speekselsonsters onderzocht. Wanneer het er minder dan 6 waren, werd de desbetreffende persoon buiten beschouwing gelaten; deze mensen zijn dus ook niet opgenomen in tabel 5.

Een overzicht van de aantallen speekselporties, die per proefpersoon onderzocht werden, geeft tabel 6.

TABEL 6

Aantal onderzochte porties per persoon	Poliomyelitis-patienten	Anderen
6	1	6
7	2	5
8	7	11
9	18	11
10	28	4
11	6	1
12	0	2
13	1	2
14	1	0
meer dan 14	0	5

Hieruit blijkt, dat van het merendeel der mensen 8—10 porties genomen werden. Zoveel mogelijk werd getracht deze op achtereenvolgende dagen te verkrijgen. Dit was evenwel niet altijd mogelijk.

Bij een 5-tal gezonde personen werden meer dan 14 porties onderzocht. 4 hiervan produceerden, meer of minder frequent, speeksels, die X-factor bevatten en één was voortdurend negatief in dit opzicht. Bij deze mensen werd zo een indruk verkregen van de uitscheiding van deze stof over een langer tijdsverloop.

2. RESULTATEN VAN HET ONDERZOEK

a. Verloop van het X-factor gehalte in speeksel gedurende een bepaalde periode.

In een grafische voorstelling (fig. 1, blz. 90—91) zijn de sterkten der onderzochte speekselmonsters van een 3-tal personen, waar het onderzoek zich over wat langere tijd uitstreckte, vermeld. Hieruit valt op te maken, dat de uitscheiding van de X-factor van dag tot dag sterk wisselde, zonder dat er van een bepaalde regelmaat in de veranderingen van de sterkte sprake was. Ook blijkt hieruit, dat, wanneer men de eerste 10 porties beschouwt, de totale indruk nauwelijks meer veranderingen ondergaat.

b. Mogelijke overeenkomst in het verloop der sterkte van de X-factor gedurende een zeker tijdsverloop bij enige personen.

Indien we fig. 2 (blz. 92—93) beschouwen, waarin van de speekselmonsters van een 12-tal normale kinderen de gehalten aan X-factor weergegeven zijn, dringt zich bij onderlinge vergelijking van de opeenvolgende porties de indruk op, dat er bij sommige kinderen een zekere overeenkomst bestaat in het verloop van de sterkte in de onderscheiden porties; er trad namelijk een neiging tot daling op in de eerste helft der periode en daarna, naar het einde toe, was er weer een stijging.

De vraag kan nu gesteld worden, of hier sprake was van enige invloed van buiten af, waardoor dit verloop te voorschijn geroepen zou kunnen zijn.

Voor de door DOLD beschreven, o. a. in het speeksel aangetroffen inhibines, kon BORTELS vaststellen, dat er een overeenkomst was tussen het verloop van de luchtdruk en de mate, waarin ze in het speeksel voorkwamen. Daarom werd ook bij deze kinderen nagegaan, of misschien in veranderingen van de barometerstand een verklaring gevonden zou kunnen worden voor het verloop van de sterkten van de X-factor, zoals dit bij enige van hen opgevallen was. De barometerstanden (2 maal per dag) zijn in fig. 2 aangegeven. Daaruit blijkt, dat de periode van daling van het X-factorgehalte met die van de daarop volgende stijging, zoals die bij een aantal van de 12 normale kinderen (A. S., M. d. B., R. V.) aan de dag trad, met enige vertraging volgde op een daling der luchtdruk en weer een stijging daarna. Ware het niet, dat de op 25 October geproduceerde speekselportie van I. B. zulk een hoog gehalte aan X-factor toonde, dan zou ook hier dit verschijnsel opgevallen zijn. Het speeksel J. V. paste, wat de stijging van het X-factorgehalte betreft, ook in dit schema. Het sterkteverloop der factor bij R. R. was zodanig, dat van een verband met de barometerstand niets bleek. De speeksels van de andere 6 kinderen bevatten te weinig werkzame stof om ze in deze beschouwing te kunnen betrekken. Van de 6 speeksels, die vaak vrij

veel X-factor bevatten, waren er dus 3, bij welke het verloop der sterkten in grote trekken de neiging had om met enige dagen vertraging de luchtdrukdaling of -stijging te volgen. Bij 2 andere gold dit ook, wat de stijging betreft; één speeksel viel geheel uit de toon in dit opzicht.

Bij beschouwing van de barometerstanden en de X-factorgehalten der speekselmonsters van J., V. en F. (fig. 1), gedurende een bepaalde periode, kon geen verband gevonden worden met de luchtdrukveranderingen.

c. Vergelijking van een aantal groepen van personen, wat betreft de hoeveelheid X-factor in het speeksel.

In Hoofdstuk III werd reeds beschreven, hoe de verschillende speekselporties al naar hun sterkte onderscheiden werden in 8 groepen. Voor iedere persoon werd hier nu berekend het percentage der porties, dat negatief enz. was, en eveneens werd uitgerekend, hoeveel de gemiddelde sterkte per portie bedroeg. Dit laatste getal kan gezien worden als een maat voor het vermogen van iemand deze factor uit te scheiden. Voor de speekselmonsters van J. (fig. 1) bijvoorbeeld werd zo het in tabel 7 vermelde resultaat verkregen:

TABEL 7

Voorbeeld van de indeling der speekselporties van een proefpersoon in 8 klassen van sterkte en van de berekening van de gemiddelde sterkte per portie.

Speekselporties	—	±?	±	1	2	3	4	5	Gemiddelde sterkte per portie	
Aantal	34	2	0	4	7	15	6	0	0	8,7 $\left(= \frac{295,25}{34} \right)$
Percentage	100	5,9	0	11,8	20,5	44,1	17,6	0	0	

Binnen de verschillende groepen werden daarna alle percentages van respectievelijk de 8 klassen van „sterkte” bij elkaar opgeteld en vervolgens gedeeld door het aantal personen in die groep. Op deze wijze werd voor een bepaalde groep het gemiddelde percentage negatieve porties gevonden, enz. Zo werd de invloed, die uitgeoefend zou kunnen worden, doordat niet van alle personen evenveel porties werden onderzocht, uitgeschakeld.

Ook werden binnen iedere groep de getallen, die de gemiddelde sterkte per portie bij een bepaalde persoon aangaven, opgeteld en

gedeeld door het aantal mensen in die groep. Zo werd verkregen een getal, aangevende het gemiddelde vermogen per persoon binnen een bepaalde groep om X-factor uit te scheiden. Het waren vooral deze laatste getallen, die met statistische methoden nader beschouwd werden.

In tabel 8 zijn de aldus berekende uitkomsten samengevat.

TABEL 8

Overzicht naar leeftijd en diagnose van de verdeling der speekselporties, uitgedrukt in procenten, over de 8 „sterkteklassen”, en gemiddelde sterkten per persoon per groep.

Leeftijd		Aantal	—	± ?	±	1	2	3	4	5	Gemiddelde sterkte per persoon per groep
poliomyelitispatienten	0— 6 jaar	19	31,3	10,4	7,2	21,6	16,4	6,9	4	2,2	5,5
	6—12 jaar	21	21,7	9,9	9,1	18	15,9	12,1	8,6	4,9	7,3
	12—18 jaar	12	20,9	11	16,2	21,7	16,8	6,6	3,5	3,3	5,8
	ouder dan 18 jaar	12	41,7	10,7	10,3	8,8	13,7	8,1	3,4	3,3	4,8
	TOTAAL	64	28,2	10,3	10,1	18	15,8	8,8	5,3	3,5	6,0
	poliomyelitispatienten met paralyse 6—12 jaar	12	30,6	11,6	8,4	16,9	13,8	7,5	6,5	4,7	5,9
	poliomyelitispatienten met meningitis 6—12 jaar	9	9,8	6,9	10	19,6	18,7	18,4	11,5	5,1	9,1
anderen dan poliomyelitispatienten (controlegroep)	0— 6 jaar	2	12,5	22,5	35	45	42,5	10	20	0	6,9
	6—12 jaar	20	35	13,6	16,6	11,1	11,9	6,7	3,4	1,7	4,8
	12—18 jaar	2	55,5	11,1	22,3	0	11,1	0	0	0	1,9
	ouder dan 18 jaar	23	67	6,8	8	9,9	6,4	1,2	0,3	0,4	1,8
	TOTAAL	47	50,6	10,1	12,7	10,5	9,6	3,7	2	0,8	3,3
	normaal 6—12 jaar	11	35,4	14,6	12,6	10,3	11,4	9,5	3,2	3	4,9
	andere ziekten 6—12 jaar	9	34,6	12,4	21,5	12	12,5	3,3	3,7	0	4,8

Zonder nadere statistische analyse werd reeds terstond de indruk verkregen, dat er tussen normalen en lijders aan andere ziekten dan poliomyelitis geen verschil bestond. Bij de 6—12 jarigen immers, waar door de bijna gelijke aantallen van beide ondergroepen, respectievelijk 11 en 9, een vergelijking goed mogelijk was, werd, noch tussen de gemiddelde sterkten per persoon per groep, noch tussen de verschillende percentages een noemenswaardig verschil gevonden. Deze beide ondergroepen werden dan ook verder als één geheel beschouwd.

Het tweede, dat al dadelijk opviel, was het verschil tussen de leeftijdsgroepen 6—12 jaar en ouder dan 18 jaar. Deze laatsten toonden een veel geringere mate van X-factorproductie dan de 6—12 jarigen.

Binnen de groep der poliomyelitispatienten scheen bij oppervlakkige beschouwing deze invloed van de leeftijd ook wel aanwezig te zijn, maar toch in veel mindere mate de aandacht trekkend. Bij deze groep werd ook nagegaan, of er een verschil was in het X-factorgehalte der speeksels tussen de patienten met verschijnselen van de kant van het centrale zenuwstelsel en hen, die slechts de symptomen ener meningitis toonden. Op grond van de uitkomsten bij zijn materiaal verkregen, vermoedde JUNGBLUT namelijk, dat zij, die een duidelijke aandoening van het centrale zenuwstelsel hadden, de X-factor in sterkere mate in hun speeksel zouden tonen. De door ons verkregen bovengenoemde getallen wezen echter eerder in de omgekeerde richting.

Tenslotte kwam de belangrijkste vraag naar voren, namelijk: „Is er verschil in de mate van uitscheiding tussen de poliomyelitispatienten en de anderen?” Bij beschouwing van de hierop betrekking hebbende getallen, vestigde zich de indruk, dat er inderdaad van een verschil sprake was. Bij de poliomyelitispatienten scheen het gehalte aan deze factor in het speeksel gemiddeld groter te zijn.

3. *Statistische analyse van enige verkregen uitkomsten*

Met de t-toets van Student werd nagegaan, of de verschillen in de mate van uitscheiding van de X-factor tussen de poliomyelitispatienten en de contrôlepersonen significant waren, zowel voor de leeftijdsgroepen als voor de totale groepen.

De betekenis van de term „significant” moge nog in het kort worden toegelicht. Deze is namelijk de volgende: Neemt men aan, dat uitsluitend toevallige factoren verantwoordelijk zijn voor het ontstaan van verschillen tussen twee groepen, dan kan men vaststellen, hoe groot de kans is, dat bij een herhaling van het experiment een even groot of nog groter verschil zou worden gevonden. Is deze zogenaamde overschrijdingskans klein, bijvoorbeeld kleiner dan 5 % of kleiner dan 1 % (deze drempelwaarde kan men zelf kiezen), dan

verwerpt men de hypothese, dat alleen het toeval in het spel is en concludeert, dat er mede van een systematische factor sprake is; het gevonden verschil noemt men in dat geval significant (respectievelijk bij een 5 % of een 1 % drempel).

Bij de volgende beschouwingen is significantie bij de 5 % drempel met * en bij de 1 % drempel met ** aangegeven.

TABEL 9

Gemiddelde uitscheidingssterkten van de X-factor per leeftijdsgroep van poliomyelitispatienten en contrôlepersonen

Leeftijden	Poliomyelitis-patienten		Contrôlegroep		$v = \bar{x}_1 - \bar{x}_2$	$w = \frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}$	$v w$	σ_v	T
	n_1	\bar{x}_1	n_2	\bar{x}_2					
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
0—6 jaar	19	5,5	2	6,9	— 1,4	1,81	— 2,53	2,98	0,47
6—12 jaar	21	7,3	20	4,8	2,5	10,24	25,60	1,25	2,00*
12—18 jaar	12	5,8	2	1,9	3,9	1,71	6,67	3,06	1,27
ouder dan 18 jaar	12	4,8	23	1,8	3,0	7,89	23,67	1,43	2,10*
Totaal	64	6,0	47	3,3	$\bar{v} = 2,5$	21,65	53,44	0,86	2,90**

* significant bij de 5 % drempel ($T = 1,98$).

** significant bij de 1 % drempel ($T = 2,63$).

In tabel 9 zijn nu de 4 leeftijdsgroepen in kolom 1 vermeld en daarachter zijn van de poliomyelitispatienten en van de contrôlepersonen de aantallen en de gemiddelde uitscheidingssterkten opgenomen (respectievelijk in de kolommen 2, 3 en 4, 5). De verschillen ($v = x_1 - x_2$) tussen deze gemiddelden zijn vervolgens in kolom 6 bepaald.

Stelde men nu de ware varianties van de 8 subgroepen gelijk ($= \sigma^2$) dan stonden voor σ^2 als schattingen ter beschikking de varianties, berekend uit elk der 8 subgroepen. De beste combinatie hiervan was het gewogen gemiddelde van deze varianties, waarbij de aantallen vrijheidsgraden als gewichten fungeerden, dus:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2 + \dots + (n_8 - 1)s_8^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_8 - 8}$$

Berekening¹ leverde op:

$$s^2 = 16,10.$$

¹ Deze berekening werd niet opgenomen. Zij kan aanzienlijk vereenvoudigd worden door gebruik te maken van:

$$(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2 + \dots + (n_8 - 1) s_8^2 = \Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x_1)^2}{n_1} - \frac{(\Sigma x_2)^2}{n_2} - \dots - \frac{(\Sigma x_8)^2}{n_8}.$$

Per leeftijdsgroep gold nu:

$$T = \frac{v}{\sigma_v}$$

waarin dus:

$$v = \bar{x}_1 - \bar{x}_2.$$

Daar de ware varianties van de subgroepen gelijk werden gesteld, gold:

$$\sigma_{x_1}^2 = \frac{\sigma^2}{n_1} \quad \text{en} \quad \sigma_{x_2}^2 = \frac{\sigma^2}{n_2},$$

zodat:

$$\sigma_v^2 = \sigma_{x_1}^2 + \sigma_{x_2}^2 = \sigma^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right) = \sigma^2 \left(\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2} \right).$$

Noem:

$$\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2} = w,$$

dan is:

$$\sigma_v^2 = \frac{\sigma^2}{w}.$$

De gemiddelden van de 4 leeftijdsgroepen binnen de poliomyelitis-groep bleken niet significant te verschillen, doch binnen de contrôle-groep werd een significant verschil gevonden tussen de gemiddelden van de 6—12 jarigen en de personen van 18 jaar en ouder, zodat bij het vergelijken van de gemiddelden van de totale groepen een gewogen verschil diende te worden gebruikt.

Voor dit gewogen verschil tussen de totaal gemiddelden van de poliomyelitisgroep en de contrôlegroep gold:

$$\bar{v} = \frac{\sum v w}{\sum w} = \frac{\sum w v}{\bar{w}},$$

terwijl

$$\sigma_{\bar{v}}^2 = \frac{\sigma^2}{\bar{w}}; \quad \text{in dit geval was: } T = \frac{\bar{v}}{\sigma_{\bar{v}}}.$$

Met behulp van de bovenstaande formules werd voor elk der verschillen v en van het verschil \bar{v} de waarde van T bepaald (zie de kolommen 7, 8, 9 en 10 van tabel 9).

Een significant verschil bleek dus aanwezig te zijn tussen de gemiddelde uitscheidingssterkten van de poliomyelitispatienten en de contrôlepersonen:

1. bij de totale groepen,
2. bij de leeftijdsgroepen van 6—12 jaar,
3. bij de leeftijdsgroepen van ouder dan 18 jaar.

Bij de 0—6 jarigen en de 12—18 jarigen werd geen significant verschil aangetoond. In het algemeen geldt, dat hoe groter het aantal waarnemingen en hoe kleiner de meetfouten enz. zijn, hoe kleiner de systematische invloeden behoeven te zijn om nog met practische zekerheid te kunnen worden aangetoond. Daar bij dit onderzoek de aantallen in het algemeen klein en de meetfouten enz. vrij groot waren (dat wil zeggen de metingen vrij grof dienden te geschieden), kon veilig worden aangenomen, dat iedere aangetoonde invloed quantitatief belangrijk moest zijn. In de beide bovengenoemde groepen bestond echter de contrôlegroep slechts uit 2 personen, zodat uit het ontbreken van significantie niet noodzakelijkerwijs volgde, dat inderdaad geen verschil aanwezig was.

Op overeenkomstige wijze werd nog vastgesteld, dat er geen significant verschil bestond tussen de poliomyelitispatienten met slechts meningitische verschijnselen en diegenen met aandoeningen van het centrale zenuwstelsel.

Eveneens werden aan een statistische beschouwing van dezelfde aard onderworpen de getallen, die aangaven het gemiddelde percentage negatieve porties per groep (tabel 8 kolom 3). Het resultaat daarvan stemde geheel overeen met de uitkomsten van de hierboven gegeven analyse van de gemiddelde uitscheidingssterkten.

4. *Samenvatting*

Er kon dus vastgesteld worden, dat

1. door normale kinderen gemiddeld meer X-factor werd uitgescheiden dan door volwassenen.
2. door poliomyelitispatienten gemiddeld meer X-factor werd uitgescheiden dan door niet aan deze ziekte lijdende mensen en dat bij deze laatste gemiddeld meer negatieve porties verkregen werden.
3. significante verschillen in uitscheiding van de X-factor tussen kinderen en volwassenen bij de poliomyelitispatienten niet konden worden aangetoond.
4. er geen significant verschil was tussen poliomyelitispatienten met en zonder aandoening van het centrale zenuwstelsel.
5. er geen verschil was aan te tonen tussen normalen en lijdens aan andere ziekten dan poliomyelitis.

V ONDERZOEKINGEN OVER DE AARD VAN DE WERKZAME STOF (X-FACTOR)

Nadat gebleken was, dat vele speeksels in staat waren 0-erythrocyten zodanig te veranderen, dat ze niet meer geagglutineerd konden worden door Columbia SK-virus, werd getracht enigszins een indruk te krijgen omtrent de aard van de hiervoor verantwoordelijke stof (X-factor).

1. Invloed van de X-factor op het vermogen van 0-erythrocyten, Columbia SK-virus te adsorberen.

Een 5 %-suspensie van 0-erythrocyten werd met een positief speekselmonster, 1:2 verdund, behandeld (contact 1 uur bij kamertemperatuur). Na centrifugeren, afgieten en resuspendieren van de behandelde erythrocyten, werden deze samengebracht met een suspensie van Columbia SK-virus, 1:10 verdund. Tegelijkertijd werden contrôlemengsels van dezelfde virusverdunding met respectievelijk 5 % onbehandelde 0-erythrocyten en met KVB klaargemaakt. Alle drie werden gedurende 1 uur bij 4° C. geplaatst. Daarna werden ze gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistoffen werden verzameld en hierin werd de hoeveelheid Columbia SK-virus door haemagglutinatie bepaald.

TABEL 10

Invloed van de X-factor op het vermogen der 0-erythrocyten Columbia SK-virus te adsorberen

	Verduunningen van het Columbia SK-virus					
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	controle
$\frac{1}{4}$ % 0-er. + Columbia SK-virus 1 *	1/2	1/2	1/2	1	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. + Columbia SK-virus 2	1	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. + Columbia SK-virus 3	2/3	1/2	1/2	1	—	—

* Columbia SK-virus 1 = suspensie van Columbia SK-virus, die in contact geweest is met 0-erythrocyten, die van te voren behandeld waren met een X-factor bevattend speeksel.

Columbia SK-virus 2 = suspensie van Columbia SK-virus, die in contact geweest is met onbehandelde 0-erythrocyten.

Columbia SK-virus 3 = contrôlesuspensie van Columbia SK-virus gemengd met KVB.

Uit tabel 10 blijkt, dat met positief speeksel behandelde 0-erythrocyten ook hun vermogen Columbia SK-virus te adsorberen, verloren hadden.

Op dezelfde wijze als boven werd een 1 % suspensie van 0-erythrocyten met een negatief speeksel behandeld. Deze erythrocyten bleken daarna nog even goed tot adsorptie van Columbia SK-virus in staat te zijn als normale.

2. *Is de X-factor ook in staat 0-erythrocyten „panagglutinabel” te maken?*

Daar bekend was, dat cholerafiltraat o. a. in staat is schapenerythrocyten, die agglutinabel zijn voor Columbia SK-virus, inagglutinabel te maken voor dit virus, en dat dit filtraat anderzijds in staat is om menselijke erythrocyten panagglutinabel te maken (het zogenaamde THOMSEN-FRIEDENREICH phenomeen), werd ook nagegaan, of positieve speeksels, dat wil zeggen speeksels, die de X-factor bezitten, in staat waren dit panagglutinerende vermogen te doen ontstaan bij menselijke erythrocyten.

Volgens FRIEDENREICH berustte de werking van het cholerafiltraat en van de filtraten van enige andere bacteriën, die door hem onderzocht werden, op een enzymatische omzetting van een substantie aan de erythrocyt, waardoor T-antigeen ontstond. Daar alle menselijke sera, behalve die van pasgeborenen, anti-T (t-agglutinine) bevatten, konden dus zulke veranderde erythrocyten met alle menselijke sera agglutineren, die van pasgeborenen uitgezonderd.

Een 24-tal speekselmonsters, die in vorige proeven reeds waren onderzocht op hun vermogen de agglutinabiliteit van 0-erythrocyten voor Columbia SK-virus te niet te doen, werden in een verdunning van 1:2 samengebracht met een $\frac{1}{2}$ % suspensie van 0-erythrocyten. Op de in Hoofdstuk III beschreven wijze werd bepaald, of en hoe sterk ze agglutineerden met AB-serum. De 24 speekselmonsters waren afkomstig van 23 verschillende personen. Van 1 persoon werden 2 porties onderzocht, namelijk één, die positief was gebleken voor de X-factor, en één, die negatief was.

Het resultaat van deze proef toont tabel 11 (blz. 38).

Hieruit blijkt duidelijk, dat slechts speekselporties, die de agglutinabiliteit der erythrocyten voor Columbia SK-virus konden doen verdwijnen, in staat waren aan deze cellen panagglutinerende eigenschappen te geven. Speeksels, die eerstgenoemde werking niet uitoefenden, toonden ook niet de laatstgenoemde, terwijl de in het ene opzicht zwak werkzame, dit in het andere ook bleken te zijn.

Deze uitkomst maakte het wel zeer waarschijnlijk, dat de X-factor beide werkingen uitoefende. Ook andere, later nog te beschrijven proeven leidden tot dezelfde conclusie.

TABEL 11

Vermogen van enige speeksels T-antigeen te vormen en de agglutinabiliteit der 0-erythrocyten voor Columbia SK-virus te doen verdwijnen

Te voorschijn brengen van „panagglutinabiliteit”	Schadelijke invloed op het vermogen van de 0-erythrocyten door Columbia SK-virus geagglutineerd te worden		
	Duidelijk	Zwak	Geen
Duidelijk	12	—	—
Zwak	—	5	—
Geen	—	—	7

Nadat zo gevonden was, dat de 0-erythrocyten onder invloed van de X-factor „panagglutinabel” waren geworden, moest nog vastgesteld worden, of de zo verkregen eigenschap dezelfde was als die, welke ontstaat na inwerking van cholerafiltraat op de erythrocyten, waarbij aan de cellen het zogenaamde T-antigeen wordt gevormd.

Hiervoor werd gebruik gemaakt van twee AB-sera, die geabsorbeerd waren met tweeërlei erythrocyten, het eerste met erythrocyten, die behandeld waren met cholerafiltraat, en het tweede met rode bloedlichaampjes, die behandeld waren met een X-factorbevattend speeksel. De techniek van deze absorptie werd in Hoofdstuk III beschreven.

De 0-erythrocyten werden weer in $\frac{1}{2}$ % suspensie behandeld met speeksel 1:2 of cholerafiltraat 1:100. Na 1 uur staan bij kamertemperatuur werden ze afgecentrifugeerd en na afgieten van de bovenstaande vloeistof werden de cellen geresuspendeerd tot $\frac{1}{4}$ % suspensie. Deze werden met de opéévolgende verdunningen van de verschillende AB-sera samengebracht en na 3 uur staan bij 4° C. werd de agglutinatie afgelezen.

In tabel 12 zijn de uitkomsten van deze proeven vermeld.

Uit de in tabel 12 weergegeven resultaten blijkt, dat de 0-erythrocyten, die met positief speeksel behandeld waren, niet meer agglutineerden met AB-serum, waaruit het t-agglutinine verwijderd was door met cholerafiltraat voorbehandelde 0-erythrocyten. Omgekeerd werd het duidelijk, dat met cholerafiltraat behandelde rode bloedlichaampjes niet meer agglutineerden in AB-serum, dat geabsorbeerd was met 0-erythrocyten, die voorbehandeld waren met X-factor bevattend speeksel.

Ook werd nog getracht het antilichaam, dat door de erythrocyten uit de AB-sera was geabsorbeerd, te elueren.

TABEL 12

De aard van het „panagglutinerend” vermogen van 0-erythrocyten, verkregen onder invloed van verschillende speekselmonsters

	Verdunningen van het onbehandelde AB-serum					Verdunningen van het AB-serum geabsorbeerd met 0-erythrocyten, die behandeld waren met cholerafiltraat						contrôle
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (onbehandeld)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. * (sp. G. D. 1:2)**	±/+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (sp. T. Ch. 1:2)	2	2	1/2	±	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (sp. R. S. 1:2)	2	2	1/2	1	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (sp. C. Mo. 1:2)	2	2	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. ** (sp. M. d. B. 1:2)	1/2	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (sp. H. J. 1:2)	2	1/2	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (sp. H. D. 1:2)	2	1/2	1	±	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. ** (sp. K. K. 1:2)	1	±/+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. ** (sp. A. R. 1:2)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (sp. R. R. 1:2)	1/2	1/2	1	±	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (sp. Di 1:2)	3	3	2	±/+	±	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. ** (sp. C. H. 1:2)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. ** (sp. J. N. 1:2)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. ** (sp. A. D. 1:2)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (sp. L. D. 1:2)	3	2	1/2	±	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (chol.filtr. 1:100)	2	2	2	1	±	—	—	—	—	—	—	—

* $\frac{1}{4}$ % 0-er. (sp. G. D. 1:2) = $\frac{1}{4}$ % suspensie van 0-erythrocyten, die behandeld waren met speeksel van G. D. in de verdunning 1:2.

** Van de hier onderzochte speekselmonsters van A. R., C. H., J. N. en A. D. was reeds vroeger aangetoond, dat ze niet in staat waren, het vermogen van 0-erythrocyten door Columbia SK-virus te worden geagglutineerd, te verminderen en van de speekselmonsters van G. D., M. d. B. en K. K. was gevonden, dat ze slechts zwak werkzaam waren in dit opzicht.

VERVOLG TABEL 12

	Verdunningen van het onbehandelde AB-serum					Verdunningen van het AB-serum geabsorbeerd met 0-erythrocyten, die met positief speeksel behandeld waren						controle
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (onbehandeld)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (sp. Die 1:2)	2	2	1	±	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (sp. A. R. 1:2) **	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{1}{4}$ % 0-er. (chol.filtr. 1:100)	2	3	1	±	—	—	—	—	—	—	—	—

** Van de hier onderzochte speekselmonsters van A. R., C. H., J. N. en A. D. was reeds vroeger aangetoond, dat ze niet in staat waren, het vermogen van 0-erythrocyten door Columbia SK-virus te worden geagglutineerd, te verminderen en van de speekselmonsters van G. D., M. d. B. en K. K. was gevonden, dat ze slechts zwak werkzaam waren in dit opzicht.

De cellen werden hiertoe geresuspendeerd in physiologische keukenzoutoplossing. De eraan toegevoegde hoeveelheid hiervan was even groot als die van het AB-serum, waarmee ze eerst waren samen geweest. De beide porties geresuspendeerde erythrocyten werden ongeveer 2 uur bij 37° C. geïncubeerd en daarna werden ze afgecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistoffen werden verzameld en vervolgens $\frac{1}{2}$ uur in een waterbad op 56° C. verwarmd om eventueel aanwezige werkzame stof uit cholerafiltraat of speeksel, die in kleine hoeveelheid medegeëluëerd zou kunnen zijn, te vernietigen.

Na die bewerking werden de beide elutievloeistoffen in verschillende verdunningen samengebracht met $\frac{1}{4}$ % suspensies van 0-erythrocyten, die op de reeds bekende wijze waren behandeld met hetzij positieve speeksels, hetzij cholerafiltraat.

Tabel 13 laat het resultaat zien.

Met cholerafiltraat behandelde erythrocyten werden dus geagglutineerd door de elutievloeistof, verkregen van met positief speeksel voorbehandelde erythrocyten, en omgekeerd werden met positief speeksel behandelde rode bloedlichaampjes geagglutineerd door de elutievloeistof, verkregen van met cholerafiltraat voorbehandelde cellen.

Op grond van deze uitkomsten menen wij te mogen concluderen, dat de X-factor aan de erythrocyten hetzelfde antigeen: T deed ontstaan als het cholerafiltraat.

3. *Werkt de X-factor als een enzym?*

FRIEDENREICH toonde aan, dat de filtraten van de J-bacil, waarmee hij zijn proeven verrichtte, een enzymwerking hadden, waardoor het T-antigeen gevormd werd aan de rode bloedlichaampjes. Cholerafiltraat en influenzavirus waren op dezelfde wijze werkzaam (BURNET) (13).

TABEL 13

Onderzoek naar de overeenkomst tussen het vermogen tot „panagglutinatie”, verkregen na behandeling met cholerafiltraat en positief speeksel

	Verdunningen van de elutievlloeistof 1 *						Verdunningen van de elutievlloeistof 2 *						
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	co	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	co
¼ % 0-er. (onbehandeld)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
¼ % 0-er. (sp. E. D. 1:2) **	1	1	±	—	—	—							
¼ % 0-er. (sp. v. d. M. 1:2)	1	1	—	—	—	—							
¼ % 0-er. (chol.filtr. 1:100)	1/2	1	±	—	—	—	1	1	1	±	—	—	—

* De elutievlloeistof 1 werd verkregen van 0-erythrocyten, die, na voorbehandeling met cholerafiltraat, eerst antilichamen uit AB-serum hadden geabsorbeerd en vlloeistof 2 was afkomstig van cellen, die voorbehandeld waren met positief speeksel en vervolgens uit AB-serum antilichamen hadden geabsorbeerd.

** ¼ % 0-er. (sp. E. D. 1:2) = ¼ % suspensie van 0-erythrocyten behandeld met speeksel van E. D. in de verdunning 1:2.

Door ons werden de volgende experimenten verricht:

Een 5 % suspensie van 0-erythrocyten werd samengebracht met een gelijke hoeveelheid positief speeksel, 1:2 verdund met physiologische NaCl-oplossing. Op deze wijze werden 6 buizen gevuld. Buis no. 1 werd terstond gecentrifugeerd, de bovenstaande vlloeistof werd afgepipetteerd en tot op het ogenblik van verder gebruik bewaard bij 4° C.

Het erythrocytensediment werd 3 maal gewassen met overmaat physiologische keukenzoutoplossing en de samengepakte erythrocyten werden daarna bewaard bij 4° C., totdat ze verder konden worden gebruikt. De overige 5 buizen werden respectievelijk na 5 minuten, 15 minuten, 1 uur, 5½ uur en 24 uur bij kamertemperatuur te hebben gestaan, gecentrifugeerd. De bovenstaande vlloeistoffen en de na driemaal wassen verkregen erythrocytensedimenten werden bewaard. Vervolgens werd van de diverse bovenstaande vlloeistoffen op de reeds bekende wijze nagegaan, hoe groot hun vermogen was de agglutinabiliteit van 0-erythrocyten voor Columbia SK-virus te verminderen. Van de erythrocytensedimenten werden in KVB ¼ % suspensies gemaakt en er werd bepaald, hoe hun agglutinabiliteit tegenover Columbia SK-virus en AB-serum was. De sterkte der bovenstaande vlloeistoffen (X-factor gehalte) werd uitgedrukt in een getal, dat berekend werd op de manier, zoals beschreven is in hoofdstuk III; zo werd een onderlinge vergelijking van deze porties mogelijk. Ten overvloede zij er op gewezen, dat deze getallen niet vergeleken kunnen worden met die, welke verkregen werden bij speeksels, die in andere verdunningen onderzocht werden.

In tabel 14 is het resultaat van dit experiment weergegeven.

TABEL 14

*Invloed van de tijd op adsorptie en elutie van de X-factor
en op de erdoor teweeggebrachte veranderingen*

Duur van de inwerking der speekselverduning op de erythrocyten	Sterkte der bovenstaande vloeistoffen	Omgekeerde waarde van de agglutinatie-titer der behandelde erythrocyten		
			Columbia SK-virus	AB-serum
contrôle-speeksel	15½	onbehandelde erythrocyten	280	0
0 minuten	3¾		280	0
5 minuten	2¼		240	1½
15 minuten	1		120	1½
1 uur	1¾		35	6
5½ uur	3¾		0	48
24 uur	8		0	96

Deze uitkomst kwam in grote trekken overeen met de bevindingen van FRIEDENREICH bij de filtraten van de J-bacil. Terstond na de menging werd er X-factor geadsorbeerd. De maximum hoeveelheid was in onze proef na 15 minuten opgenomen. Daarna kwam er geleidelijk weer steeds meer vrij in de bovenstaande vloeistof. Na 24 uur was hierin weer een belangrijke hoeveelheid aanwezig.

Dat er aan de erythrocyten een omzetting plaats vond, was na 15 minuten nog nauwelijks waar te nemen, maar na 1 uur was de verandering er al duidelijk en na 5½ uur en 24 uur manifesteerde ze zich in nog sterkere mate.

We mogen dus wel aannemen, dat de X-factor niet in het reactieproduct werd opgenomen, maar de omzetting bewerkstelligde en daarna weer vrij kwam.

Als we in plaats van de 5 % 0-erythrocytensuspensie ½ % suspensie gebruikten, werd voor de sterkte der bovenstaande vloeistoffen na verschillende contacttijden ongeveer hetzelfde verloop gevonden. Hier werden de erythrocyten van enige porties terstond geresuspendeerd in KVB tot 1 % suspensies en ongeveer 4 uren bij kamertemperatuur gelaten. Na centrifugeren van deze suspensies werden de bovenstaande elutie-vloeistoffen onderzocht op aanwezigheid van

TABEL 15

*Invloed van de temperatuur op de reactie tussen de X-factor
en de erythrocyten*

		Verduunningen van het Columbia SK-virus						
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	contrôle
4° C.	¼ % 0-er. (onbehandeld)	2	1/2	1/2	±/+	—	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:2) *	—	—	—	—	—	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:4)	—	—	—	—	—	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:8)	1	—	—	—	—	—	—
Kamertemperatuur	¼ % 0-er. (sp. 1:16)	1	1	—	—	—	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:2)	—	—	—	—	—	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:4)	—	—	—	—	—	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:8)	—	—	—	—	—	—	—
37° C.	¼ % 0-er. (sp. 1:16)	1	±/+	—	—	—	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:2)	—	—	—	—	—	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:4)	—	—	—	—	—	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:8)	—	—	—	—	—	—	—
45° C.	¼ % 0-er. (sp. 1:16)	±/+	±	—	—	—	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:2)	—	—	—	—	—	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:4)	—	—	—	—	—	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:8)	—	—	—	—	—	—	—
45° C.	¼ % 0-er. (sp. 1:16)	1	—	—	—	—	—	—

* ¼ % 0-er. (sp. 1:2) = ¼ % suspensie van 0-erythrocyten, behandeld met een 1:2 verduunning van speeksel.

X-factor. Van de cellen, die 0 minuten en 3 minuten met positief speeksel in contact waren geweest, werd meer X-factor geëluëerd dan van de erythrocyten, waar de aanraking respectievelijk $2\frac{1}{2}$ en 6 uur geduurd had. Dit stemde overeen met de hoeveelheden, die uit de oorspronkelijke speekselporties waren geadsorbeerd na de genoemde contacttijden, namelijk meer bij 0 en 3 minuten dan bij $2\frac{1}{2}$ en 5 uur.

Op grond van deze resultaten menen we te mogen zeggen, dat er hier waarschijnlijk sprake was van enzymatische veranderingen aan de erythrocyten onder invloed van deze X-factor, die zich dus evenzo gedroeg als de werkzame stof in de filtraten van de J-bacil en V. cholerae.

4. *Invloed van de temperatuur op de reactie tussen X-factor en de erythrocyten.*

Een positief speekselmonster werd verdeeld in 4 porties en ieder hiervan werd in 4 verdunningen (1:2, 1:4, 1:8 en 1:16) samengebracht met $\frac{1}{2}$ % suspensie van 0-erythrocyten. De verdunningen van de eerste portie bleven met de eraan toegevoegde erythrocytensuspensie 1 uur bij 4° C. en die van de tweede, derde en vierde portie respectievelijk bij kamertemperatuur, 37° C. en 45° C., gedurende eenzelfde tijd. Na centrifugeren, afgieten der bovenstaande vloeistof en resuspensie der erythrocyten werd hun agglutinabiliteit ten opzichte van Columbia SK-virus bepaald.

In tabel 15 is de uitkomst weergegeven.

Bij de 4 verschillende temperaturen heeft dus na een uur een duidelijke omzetting plaats gehad; bij kamertemperatuur, 37° C. en 45° C. was er geen verschil in de mate van de verandering van de cellen, maar bij 4° C. bleek deze geringer te zijn.

5. *Invloed van temperatuur en van bewaren op het X-factor gehalte van speeksels.*

Om de thermoresistentie van de X-factor te bepalen werden de hierna beschreven proeven verricht:

Enige X-factor bevattende speekselporties van één persoon werden samengevoegd en daarna werd dit mengsel verdeeld over een aantal buizen, welke gedurende $\frac{1}{2}$ uur geplaatst werden bij respectievelijk: kamertemperatuur, 37° C., 46° C., 50° C. en 56° C. Vervolgens werd van deze porties op de vroeger reeds beschreven wijze (Hoofdstuk III) het vermogen de Columbia SK-virus-agglutinabiliteit van 0-erythrocyten te verminderen en het T-antigeen te doen ontstaan, bepaald.

De X-factor werd dus, zoals tabel 16 toont, na een verblijf van een $\frac{1}{2}$ uur bij 46° C. reeds ernstig beschadigd, en indien het speeksel gedurende eenzelfde tijd bij 50° C. gestaan had, was er niets meer over van deze stof. Er bleek ook nu weer een volkomen overeenstemming te zijn tussen het verdwijnen van de agglutinabiliteit voor Columbia SK-virus en het te voorschijn komen van het T-antigeen,

TABEL 16

*Invloed van enige temperaturen op het X-factor gehalte
van een speeksel*

		Verdunningen van het Columbia SK-virus						
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	co
½ u. kamer- temperatuur	¼ % 0-er.(onbehandeld)	2	3	2	1	±/+	±	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:2) *	—	—	—	—	—	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:4)	1	±	—	—	—	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:8)	1	1	±/+	±	—	—	—
½ uur 37° C.	¼ % 0-er. (sp. 1:2)	—	—	—	—	—	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:4)	1	±/+	—	—	—	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:8)	2	2	1	±/+	±	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:16)	2	2	1/2	1	±/+	±	—
½ uur 46° C.	¼ % 0-er. (sp. 1:2)	1	2	1	±/+	±	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:4)	2	2	2	2	2	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:8)	2	2	2	1	1	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:16)	2	2	2	1	1	—	—
½ uur 50° C.	¼ % 0-er. (sp. 1:2)	2/3	2	2	2	1/2	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:4)	2/3	2	2	1/2	1	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:8)	2	2	2	2	1	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:16)	2/3	2	1/2	1	1	—	—
½ uur 56° C.	¼ % 0-er. (sp. 1:2)	1/2	2	1/2	1	1	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:4)	1	1/2	1/2	1	1	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:8)	2	1/2	1	1/2	1	—	—
	¼ % 0-er. (sp. 1:16)	2	1/2	1	1	1	—	—
		Verdunningen van het AB-serum						
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	co	
½ u. kt.	¼ % 0-er.(onbehandeld)	—	—	—	—	—	—	
	¼ % 0-er. (sp. 1:8)	1	1	1	±	—	—	
	¼ % 0-er. (sp. 1:16)	1	1	±	—	—	—	
½ u. 37° C.	¼ % 0-er. (sp. 1:8)	1	1	1	±	—	—	
	¼ % 0-er. (sp. 1:16)	1	1	±	—	—	—	
½ u. 46° C.	¼ % 0-er. (sp. 1:8)	1	±	—	—	—	—	
	¼ % 0-er. (sp. 1:16)	±	—	—	—	—	—	
½ u. 50° C.	¼ % 0-er. (sp. 1:8)	—	—	—	—	—	—	
	¼ % 0-er. (sp. 1:16)	—	—	—	—	—	—	
½ u. 56° C.	¼ % 0-er. (sp. 1:8)	—	—	—	—	—	—	
	¼ % 0-er. (sp. 1:16)	—	—	—	—	—	—	

* ¼ % 0-er. (sp. 1:2) = ¼ % suspensie van 0-erythrocyten, behandeld met een 1:2 verdunning van speeksel.

hetgeen pleit voor de opvatting, dat beide werkingen door dezelfde stof in het speeksel werden veroorzaakt.

Enige experimenten met andere positieve speekselmonsters, die op dezelfde wijze werden opgezet, gaven overeenkomstige resultaten.

Hierna werd nagegaan, hoe een X-factor bevattend speeksel zich gedroeg, indien het gedurende verschillende tijden aan een bepaalde temperatuur werd blootgesteld. Ter onderlinge vergelijking werden de sterkten van de diverse porties in een getal uitgedrukt, dat verkregen werd op de reeds enige malen beschreven wijze.

In tabel 17 is de uitkomst van dit experiment vermeld.

TABEL 17

De invloed van temperatuur en tijd op het X-factor gehalte van enige speeksels

Duur der blootstelling aan de genoemde temperaturen	Sterkte der porties	
	50° C.	56° C.
5 minuten	13¾	3½
10 minuten	11½	2½
15 minuten	11½	0
30 minuten	10	0
60 minuten	0	—
Speeksel, waarvan werd uitgegaan	13¾	19½

Tegelijkertijd werd ook nagegaan, hoeveel T-antigeen door de verschillende porties gevormd werd en de daarbij verkregen uitkomst was weer geheel in overeenstemming met de in tabel 17 vermelde. Uit de resultaten viel op te maken, dat de X-factor in het speekselmonster, dat bij 50° C. onderzocht werd, na een half uur reeds enige schade geleden had en na 1 uur geheel vernietigd was. Bij 56° C. was er na 5 minuten al bijna niets meer over, terwijl na 15 minuten alles verdwenen was. Onder de in het speeksel voorkomende omstandigheden was de stof dus zeer thermolabiel.

Het door ons gebruikte ruwe cholerafiltraat werd ook op zijn temperatuurgevoeligheid onderzocht.

De experimenten werden verricht met cholerafiltraatverdunningen van 1:100 in KVB. De sterkte van de werking hiervan op het vermogen van de 0-erythrocyten door Columbia SK-virus geagglutineerd te worden, kwam ongeveer overeen met die van een speekselmonster

van gemiddelde sterkte. Op dezelfde manier als boven beschreven werd, werden porties van deze cholerafiltraatverdunding gedurende verschillende tijden bij respectievelijk 50° C. en 56° C. geplaatst; daarna werd de sterkte van hun werkzaamheid bepaald, zowel met de methode van de Columbia SK-virus haemagglutinatie als met die van de T-agglutinatie.

Er werd gevonden, dat 50° C. gedurende 10 minuten reeds schadelijk was. Na 30 minuten was nog niet alles vernietigd, maar na 1 uur was er niets meer over. Bij 56° C. was er na 5 minuten al een belangrijke achteruitgang in het gehalte aan werkzame stof in het cholerafiltraat en na 30 minuten kon er nog slechts een spoor aangetoond worden. De resultaten op beide wijzen verkregen (Columbia SK-virus haemagglutinatie en T-agglutinatie) stemden weer volkomen overeen. De in dit opzicht werkzame stof in het cholerafiltraat toonde dus een thermoresistentie, die nauwelijks groter was dan die van de X-factor in het speeksel.

Om na te gaan, hoe lang een positief speeksel zijn werkzaamheid bleef behouden bij kamertemperatuur, werd een aantal speekselmonsters van een patient gemengd en daarna verdeeld in 7 gelijke porties, die, totdat hun sterkte werd bepaald in de haemagglutinatieproef met het Columbia SK-virus, bij kamertemperatuur verbleven. Iedere dag werd er een portie onderzocht. De sterkte van iedere portie werd op de vroeger besproken wijze in een getal uitgedrukt en deze zijn vermeld in tabel 18.

TABEL 18

Invloed van bewaren bij kamertemperatuur op het X-factor gehalte van een speeksel

Aantal dagen van staan bij kamertemperatuur	Sterkte der porties
0 (contrôle)	6
1	5
2	6
3	7 $\frac{3}{4}$
4	9
7	8 $\frac{1}{2}$

Gedurende 1 week bleven dus positieve speeksels hun volle werkzaamheid behouden bij kamertemperatuur. Het scheen zelfs, dat na

een aantal dagen bewaren onder deze omstandigheden de sterkte der porties nog iets toenam.

Op grond van dit resultaat kon wel aangenomen worden, dat tijdens het transport, waarbij de speeksels soms enige dagen onderweg waren geweest, het gehalte aan X-factor door de temperatuur niet ongunstig beïnvloed was.

De speekselmonsters werden veelal bewaard bij 4° C. Minstens 2 maanden konden ze zo hun werkzaamheid behouden. Wel trad er in sommige speeksels bij die temperatuur schimmelgroei op, waardoor ze onbruikbaar werden voor verdere proeven.

Onderzocht werd ook, of de werkzame stof in het speeksel behouden bleef bij bevroren bij —20° C. gevolgd door ontdooien. Een bepaald speekselmonster werd weer in enige porties verdeeld. Deze werden bevroren bij —20° C. en daarna weer ontdooid; van 1 portie werd nu het gehalte aan X-factor bepaald. Bij de andere werd deze procedure herhaald. In tabel 19 is het resultaat vermeld.

TABEL 19

Invloed van bevroren en ontdooien op het X-factor gehalte van een speekselmonster

	Sterkte der porties
Uitgangsmateriaal	12½
1 maal bevroren 1 maal ontdooien	14½
2 maal bevroren 2 maal ontdooien	7

Herhaling van de bevroering en ontdooiing bleek dus niet onschadelijk te zijn.

Indien positieve speeksels ingevroren werden bij —20° C., bleken zij bij gebruik, een half jaar later, nog hun volledige werkzaamheid te bezitten. Dit is dus de meest aanbevelenswaardige manier om speeksels langere tijd te bewaren.

6. *Invloed van de waterstofionenconcentratie op het gehalte aan X-factor van speeksels.*

Er werden weer enige positieve speekselmonsters bijeengevoegd en deze werden vervolgens verdeeld in 9 porties, waarna ze gedurende 3½ uur bij kamertemperatuur op respectievelijk de pH's 4; 5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8 en 9 werden gehouden, terwijl de negende buis als contrôle diende. De pH hiervan was 7,2. Na 3½ uur werden de speeksels op de vroeger reeds beschreven wijze (Hoofd-

stuk III) verdund met KVB, waardoor ze op pH 7,6 kwamen, en vervolgens onderzocht op hun gehalte aan X-factor. Voor de onderlinge vergelijking werden de sterkten weer in getallen uitgedrukt. Op dezelfde manier werd ook bij een andere speekselpool (pH 8,2) de invloed van de pH nagegaan.

Tabel 20 toont het resultaat van beide proeven:

TABEL 20

Invloed van de waterstofionenconcentratie op het gehalte aan X-factor van speeksels

pH	Sterkte der porties	
	pool 1	pool 2
3	—	4
4	6	11
5	6	10½
6	7½	11¼
6,5	6¾	—
7	4½	7½
7,2 (contrôle pool 1)	5½	—
7,5	5½	—
8	6¾	7½
8,2 (contrôle pool 2)	—	8
9	5½	7¾

Het bleek nu, dat de pH slechts een geringe invloed uitoefende op deze factor. De uitkomsten wezen erop, dat speeksels, die aan een lagere pH blootgesteld waren geweest, een iets sterkere werking toonden dan die, welke aan hogere pH's waren blootgesteld; vooral in de tweede proef kwam dit tot uiting.

De pH had dus tussen de waarden 4 en 9 geen schadelijke invloed op de X-factor. Uit het onderzoek van de tweede „speeksel-pool” bleek, dat er bij pH=3 wel een achteruitgang in het gehalte aan X-factor was opgetreden.

7. *Kan de X-factor door centrifugeren neergeslagen worden?*

2 buizen werden gevuld, ieder met 1½ cc. helder speeksel, dat 5 dagen oud was. Deze portie was terstond, nadat ze geproduceerd was, gecentrifugeerd

(3.000 r.p.m.¹, 10 minuten) en daarna bewaard bij 4° C. Op deze manier werden alle speekselmonsters behandeld. Beide bovengenoemde buizen met speeksel werden gedurende ½ uur gecentrifugeerd op 20.000 r.p.m. in een centrifuge, merk „Spineo”. De bovenstaande vloeistoffen werden daarna afzonderlijk verzameld en de sedimenten werden weer gesuspenseerd in 1½ cc. KVB. Deze laatste werden bij elkaar gevoegd. Eén buisje met bovenstaande vloeistof werd vervolgens weer gecentrifugeerd in dezelfde centrifuge, maar nu gedurende 1 uur op 40.000 r.p.m. De bovenstaande vloeistof werd afgepipetteerd en het nauwelijks zichtbare sediment werd geresuspenseerd in 1½ cc. KVB. Van al deze vloeistoffen werd vervolgens het gehalte aan X-factor bepaald (Columbia SK-haemagglutinatie) (zie Hoofdstuk III).

TABEL 21

Bepaling van het X-factor gehalte in het sediment en de bovenstaande vloeistof van gecentrifugeerde speeksels

	Verdunningen van het Columbia SK-virus						
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	contrôle
¼ % 0-er. (onbehandeld)	2	2	1/2	1	±	—	—
¼ % 0-er. (bov. 20.000 1:2) *	—	—	—	—	—	—	—
¼ % 0-er. (bov. 20.000 1:4)	—	—	—	—	—	—	—
¼ % 0-er. (sed. 20.000 1:1)	1/2	2	1	±/+	—	—	—
¼ % 0-er. (sed. 20.000 1:2)	2	1/2	1	1	—	—	—
¼ % 0-er. (bov. 40.000 1:2)	2	1	±/+	±	—	—	—
¼ % 0-er. (bov. 40.000 1:4)	1/2	1	1	±/+	—	—	—
¼ % 0-er. (sed. 40.000 1:1)	—	—	—	—	—	—	—
¼ % 0-er. (sed. 20.000 1:2)	—	—	—	—	—	—	—

- * 1. ¼ % 0-er. (bov. 20.000 1:2) = ¼ % suspensie van 0-erythrocyten, behandeld met de bovenstaande vloeistof, 1:2 verdund, van de portie, die op 20.000 r.p.m. gecentrifugeerd was.
2. ¼ % 0-er. (sed. 20.000 1:1) = ¼ % suspensie van 0-erythrocyten, behandeld met het geresuspenseerde sediment (onverdund) van de portie, die op 20.000 r.p.m. gecentrifugeerd was.
3. ¼ % 0-er. (bov. 40.000 1:2) = ¼ % suspensie van 0-erythrocyten, behandeld met de bovenstaande vloeistof, 1:2 verdund, van de portie, die op 40.000 r.p.m. gecentrifugeerd was.
4. ¼ % 0-er. (sed. 40.000 1:1) = ¼ % suspensie van 0-erythrocyten, behandeld met het geresuspenseerde sediment (onverdund) van de portie, die op 40.000 r.p.m. gecentrifugeerd was.

¹ 3.000 r.p.m. = 3.000 toeren per minuut.

Uit het resultaat vermeld in tabel 21 blijkt, dat het „sediment 20.000” nauwelijks X-factor bevatte, maar dat de bovenstaande vloeistof hiervan sterk werkzaam was. Na 1 uur centrifugeren op 40.000 r. p. m. was echter nagenoeg alle X-factor werkzaamheid in het sediment terecht gekomen. De bovenstaande vloeistof bevatte toen bijna niets meer.

Een volgende proef met een ander speekselmonster van deze persoon leverde in grote trekken hetzelfde resultaat op, behalve, dat er nu in het sediment van 20.000 r. p. m. ook al een zekere hoeveelheid X-factor aanwezig was. De stof werd hier dus iets sneller neergeslagen.

Uit deze uitkomsten zou men kunnen afleiden, dat de werkzaamheid van de X-factor aan een vrij groot deeltje, ongeveer van de orde van grootte van het poliomyelitisvirus, gebonden is.

Niet altijd gaven dit soort proeven even sprekende resultaten. Eens werd een speekselportie gebruikt, die reeds enige weken oud was. Er had zich hierin vrij veel sediment gevormd. Toen bleek er zelfs na centrifugeren op 3.000 r. p. m. al veel X-factor met de grove deeltjes neergeslagen te zijn; de rest werd bij 20.000 r. p. m. gesedimenteerd. Waarschijnlijk was de werkzame stof dus aan deze deeltjes geadsorbeerd.

Men moet zich in verband met het bovenstaande dan ook wel afvragen, in hoeverre er in de eerstgenoemde proeven sprake was van het neerslaan van de X-factor als zodanig, of dat er ook daar wellicht een adsorptie opgetreden was aan bepaalde speekselbestanddelen, waarmee deze factor dan tegelijkertijd werd neergeslagen.

8. Gedrag van de X-factor tegenover de erythrocyten van een aantal diersoorten.

De rode bloedlichaampjes van schaap, muis, konijn en aap werden aan de invloed van de X-factor blootgesteld. Er werd nagegaan, of en in welke mate deze cellen de X-factor adsorbeerden en welke invloed deze factor op de bovengenoemde cellen uitoefende.

a. Schapenerythrocyten.

Een 5 % suspensie van schapenerythrocyten werd in aanraking gebracht met een positief speekselmonster, 1:2 verdund (gelijke hoeveelheden van beide). Er werden op deze wijze 5 buizen ingezet. Na respectievelijk 10, 20, 30, 45 en 60 minuten bij kamertemperatuur te hebben gestaan, werden de buizen gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistoffen werden afgepipetteerd en hierin werd de sterkte van de X-factor bepaald.

Uit tabel 22 blijkt, dat de X-factor eerst door de schapenerythrocyten geadsorbeerd werd en na enige tijd weer begon vrij te komen. Dit stemde volkomen overeen met het gedrag van deze stof tegenover menselijke erythrocyten.

TABEL 22

Adsorptie en elutie van de X-factor bij schapenerythrocyten

Bovenstaande vloeistoffen na aanrakingstijd van	Sterkte der bovenstaande vloeistoffen
10 minuten	1 $\frac{3}{4}$
20 minuten	1 $\frac{1}{2}$
30 minuten	3
45 minuten	4
60 minuten	4 $\frac{3}{4}$
contrôlespeeksel	10 $\frac{1}{2}$

Tevens werd nagegaan, welke veranderingen de schapenerythrocyten ondergingen door de inwerking der X-factor, en deze werden vergeleken met die, welke onder invloed van hetzelfde positieve speeksel bij mensenerythrocyten optraden.

Hiertoe werden zowel $\frac{1}{2}$ % schapenerythrocytensuspensie, als $\frac{1}{2}$ % 0-erythrocytensuspensie samengebracht met een positief speeksel in verschillende verdunningen. Van de aldus behandelde erythrocyten werd zowel de agglutinabiliteit voor het Columbia SK-virus, als het agglutinatievermogen tegenover „het-vrij” menselijk AB-serum bepaald.

Uit tabel 23 blijkt, dat de schapenerythrocyten onder invloed van de X-factor inagglutinabel werden voor Columbia SK-virus, maar dat de uitwerking van de X-factor op de schapenerythrocyten geringer was dan op de mensenerythrocyten. De schapenerythrocyten werden eveneens geagglutineerd door AB-serum, maar ook hier kwam de titer niet zo hoog, als dat meestal het geval was bij de menselijke rode bloedlichaampjes (ongeveer 1:32).

De erythrocyten van het schaap toonden dus in hun gedrag grote overeenkomst met die van de mens. Slechts quantitatief was er van enig verschil sprake. In zijn onderzoekingen over de T-agglutinatie verkreeg FRIEDENREICH ongeveer dezelfde resultaten.

b. Muizenerythrocyten.

Op dezelfde wijze als voor de schapenerythrocyten beschreven werd, werden eveneens 5% suspensies van muizenerythrocyten met een positief speeksel samengebracht.

TABEL 23

*Bepaling van de door positief speeksel aan schapenerythrocyten
teweeggebrachte veranderingen*

	Verdunningen van het Columbia SK-virus						
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	contrôle
¼ % sch.er. (onbehandeld)	1	1	1	—	—	—	—
¼ % sch.er. (sp. 1:2) *	—	—	—	—	—	—	—
¼ % sch.er. (sp. 1:4)	1	±	—	—	—	—	—
¼ % sch.er. (sp. 1:8)	1	1	±	—	—	—	—
¼ % sch.er. (sp. 1:16)	1/2	1	1	—	—	—	—
¼ % 0-er. (onbehandeld)	2	1/2	1	±	—	—	—
¼ % 0-er. (sp. 1:4)	—	—	—	—	—	—	—
¼ % 0-er. (sp. 1:8)	—	—	—	—	—	—	—
¼ % 0-er. (sp. 1:16)	1/2	1	—	—	—	—	—
	Verdunningen van het „het-vrije” AB-serum						
	2:3	1:3	1:6	1:12	1:24	contrôle	
¼ % sch.er. (onbehandeld)	—	—	—	—	—	—	
¼ % sch.er. (sp. 1:4)	1	1	—	—	—	—	
¼ % sch.er. (sp. 1:8)	1	—	—	—	—	—	
¼ % sch.er. (sp. 1:16)	±	—	—	—	—	—	

* ¼ % sch.er. (sp. 1:2) = ¼ % suspensie van schapenerythrocyten behandeld met speeksel, 1:2 verdund.

TABEL 24

Adsorptie en elutie van de X-factor bij muizenerythrocyten

Bovenstaande vloeistoffen na aanrakingstijd van	Sterkte der bovenstaande vloeistoffen
10 minuten	2½
20 minuten	2¼
30 minuten	2¾
45 minuten	2
60 minuten	2¼
contrôlespeeksel	3½

Het bleek (tabel 24), dat de muizenerythrocyten misschien een zeer geringe hoeveelheid X-factor adsorbeerden, maar uit niets bleek, dat er hier sprake was van een aanvankelijk duidelijke adsorptie gevolgd door een elutie.

Daar rode bloedlichaampjes van muizen niet geagglutineerd kunnen worden door Columbia SK-virus (HORVATH en JUNGBLUT) kan een eventuele verandering alleen maar nagegaan worden door het gedrag tegenover „het-vrij” AB-serum. Indien ½ % suspensies van deze erythrocyten voorbehandeld werden met respectievelijk positief speeksel en cholerafiltraat, en daarna als ¼ % suspensies samengebracht werden met „het-vrij” AB-serum, kregen wij het volgende resultaat (tabel 25).

TABEL 25

Onderzoek naar de invloed van positief speeksel en cholerafiltraat op muizenerythrocyten

	Verduunningen van het „het-vrije” AB-serum					
	1:3	1:6	1:12	1:24	1:48	contrôle
¼ % muizener. (onbehandeld)	—	—	—	—	—	—
¼ % muizener. (ch.filtr. 1:10) *	—	—	—	—	—	—
¼ % muizener. (ch.filtr. 1:20)	—	—	—	—	—	—
¼ % muizener. (sp. 1:4) **	—	—	—	—	—	—
¼ % muizener. (sp. 1:8)	—	—	—	—	—	—

* ¼ % muizener. (ch. filtr. 1:10) = ¼ % suspensie van muizenerythrocyten, behandeld met cholerafiltraat, 1:10 verdund.

** ¼ % muizener. (sp. 1:4) = ¼ % suspensie van muizenerythrocyten, behandeld met speeksel, 1:4 verdund.

Noch onder invloed van een positief speekselmonster, noch onder invloed van het veel sterkere cholerafiltraat kon bij de muizenerythrocyten een T-agglutinatatie te voorschijn geroepen worden.

Ook werd nagegaan, of de muizenerythrocyten in staat waren het Columbia SK-virus te adsorberen. De volgende proef werd verricht:

1.	Columbia SK-virussuspensie	1/10	0,5 cc. + muizener.	0,05 cc.
2.	idem		0,5 cc. + 0-er.	0,05 cc.
3.	idem		0,5 cc. + KVB	0,05 cc.

De drie mengsels werden gedurende 1 uur bij 4° C. geplaatst. Daarna werden ze gecentrifugeerd; de bovenstaande vloeistoffen werden afgepipetteerd en hierna werd met de methode der haemagglutinatie de hoeveelheid Columbia SK-virus bepaald.

TABEL 26

Onderzoek naar het adsorptievermogen voor Columbia SK-virus van muizenerythrocyten

	Verdunningen van het Columbia SK-virus					
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	contrôle
Bovenstaande vloeistof na adsorptie met muizenerythrocyten (1)	3	2	1/2	1/2	—	—
Bovenstaande vloeistof na adsorptie met 0-erythrocyten (2)	1	—	—	—	—	—
Contrôle (met KVB) (3)	4	2	1/2	—	—	—

Uit tabel 26 blijkt, dat muizenerythrocyten in tegenstelling tot mensenerythrocyten niet in staat waren Columbia SK-virus te adsorberen.

Resumerende kan dus gezegd worden, dat muizenerythrocyten de X-factor niet of nauwelijks adsorbeerden, er geen aantoonbare verandering door ondergingen en dat ze ook niet in staat waren Columbia SK-virus te adsorberen.

c. Konijnenerythrocyten.

Om de adsorptie te bepalen werden ook hier weer 5 % suspensies van konijnenerythrocyten met een over enige porties verdeeld positief speekselmonster samengebracht. Bij de daarop volgende bepaling van de hoeveelheid X-factor in de bovenstaande vloeistoffen werd het volgende gevonden (tabel 27).

Er werd dus wel X-factor geadsorbeerd, maar slechts in geringe mate.

Bij de bepaling van de veranderingen, die konijnenerythrocyten ondergingen onder invloed van hetzij positieve speeksel, hetzij cholerafiltraat, kon slechts het eventuele optreden van een T-agglutinatatie onderzocht worden, daar konijnenerythrocyten noch geagglutineerd

TABEL 27

Adsorptie en elutie van de X-factor bij konijnenerythrocyten

Bovenstaande vloeistoffen na aanrakingstijd van	Sterkte der bovenstaande vloeistoffen
10 minuten	3
20 minuten	2¼
30 minuten	1
45 minuten	1
contrôlespeeksel	3

kunnen worden door Columbia SK-virus, noch dit virus kunnen adsorberen.

In tabel 28 is het resultaat van dit onderzoek vermeld. De proef werd op dezelfde manier verricht als de overeenkomstige met muizenerythrocyten.

TABEL 28

Onderzoek naar de invloed van positief speeksel en cholerafiltraat op konijnenerythrocyten

	Verdunningen van het AB-serum („het-vrij”)				
	2:3	1:3	1:6	1:12	contrôle
¼ % kon.er. (onbehandeld)	—	—	—	—	—
¼ % kon.er. (chol.filtr. 1:2) *	±/+	—	—	—	—
¼ % kon.er. (pos. sp. 1:2)	3	1/2	1	±	—
¼ % kon.er. (pos. sp. 1:2) **	2	1	±	—	—

* ¼ % kon.er. (chol.filtr. 1:2) = ¼ % suspensie van konijnenerythrocyten, die behandeld waren met cholerafiltraat 1:2 verdund.

** Van deze konijnenerythrocyten werd hier nagegaan, hoe ze geagglutineerd werden, door „het-vrij” AB-serum, waaruit t-agglutinine verwijderd was.

Uit deze tabel blijkt, dat er onder invloed van de behandeling met cholerafiltraat een zeer zwak agglutinatievermogen optrad tegenover AB-serum. De erythrocyten, voorbehandeld met positief speeksel,

werden nog door hogere verdunningen van dit serum geagglutineerd, maar dit bleek niet te berusten op het gevormd zijn van eenzelfde antigeen aan deze cellen, want zij werden ook door hetzelfde AB-serum, waaruit het anti-t geabsorbeerd was, geagglutineerd, hoewel de titer hier een buisje lager kwam te liggen.

Konijnnerythrocyten konden dus moeilijk de X-factor uit het speeksel adsorberen en een T-agglutinatie trad er dus nauwelijks op. Ook FRIEDENREICH stelde dit reeds vast in zijn proeven met het filtraat van de J-bacil.

d. Apenerythrocyten.

Onderzocht werden de rode bloedlichaampjes van *Macacus Rhesus*. Bij de bepaling van het adsorptievermogen voor de X-factor, die weer op dezelfde wijze als boven beschreven werd, geschiedde, bleek, zoals tabel 29 toont, dat de erythrocyten weer in staat waren de stof te adsorberen. Het scheen ook, dat na verloop van enige tijd de X-factor weer losgelaten werd; door de geringe sterkte van het gebruikte speeksel kwam dit echter niet voldoende overtuigend tot uiting.

TABEL 29

Adsorptie en elutie van de X-factor bij apenerythrocyten

Bovenstaande vloeistoffen na aanrakingstijd van	Sterkte der bovenstaande vloeistoffen
10 minuten	$\frac{1}{2}$
20 minuten	0
30 minuten	$\frac{3}{4}$
45 minuten	$1\frac{1}{2}$
contrôlespeeksel	$3\frac{1}{4}$

Vervolgens werd nagegaan, welke veranderingen er aan de erythrocyten waren opgetreden na de inwerking van respectievelijk positief speeksel en cholerafiltraat.

Uit de resultaten, vermeld in tabel 30, blijkt, dat de apenerythrocyten, zowel de met cholerafiltraat, als de met positief speeksel voorbehandelde, geagglutineerd werden door „het-vrij” AB-serum, maar noch normale, noch op één van beide bovengenoemde wijzen voorbehandelde erythrocyten werden door Columbia SK-virus tot agglutinatie gebracht.

TABEL 30

Onderzoek naar de invloed van positief speeksel en cholerafiltraat op apenerythrocyten

	Verdunningen van het AB-serum					
	2:3	1:3	1:6	1:12	1:24	contrôle
¼ % apen-er. (onbehandeld)	—	—	—	—	—	—
¼ % apen-er. (sp. 1:2) *	1	1	1	—	—	—
¼ % apen-er. (chol.filtr. 1:2)	2	1/2	1	±	—	—
	Verdunningen van het Columbia SK-virus					
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	contrôle
¼ % 0-er. (onbehandeld)	2	2	1	±/+	±	—
¼ % apen-er. (onbehandeld)	—	—	—	—	—	—
¼ % apen-er. (sp. 1:2)	—	—	—	—	—	—
¼ % apen-er. (chol.filtr. 1:2)	—	—	—	—	—	—

* ¼ % apen-er. (sp. 1:2) = ¼ % suspensie van apenerythrocyten, behandeld met speeksel, 1:2 verdund.

Daarom werd ook nog nagegaan, of apenerythrocyten Columbia SK-virus konden adsorberen, waarbij op dezelfde wijze werd tewerk gegaan, als boven bij de muizenerythrocyten.

TABEL 31

Onderzoek naar het adsorptievermogen voor Columbia SK-virus van apenerythrocyten

	Verdunningen van het Columbia SK-virus						
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	contrôle
Contrôle ongeabsorbeerd	3	3	2	1/2	±/+	±	—
Bovenstaande vloeistof na absorptie met apenerythrocyten	2/3	2	1/2	1	±/+	±	—
Bovenstaande vloeistof na absorptie met 0-erythrocyten	1	±	—	—	—	—	—

Hieruit blijkt, dat er ook van adsorptie aan de apenerythrocyten geen sprake was.

De rode bloedlichaampjes van een Rhesus-aap waren dus onder de gegeven omstandigheden niet in staat te agglutineren met Columbia SK-virus en ook niet het te adsorberen. Ze konden wel X-factor adsorberen en er zo door veranderd worden, dat ze door AB-serum geagglutineerd werden. Dezelfde veranderingen ondergingen deze cellen ook door inwerking van cholerafiltraat.

De resultaten, verkregen met de in deze paragraaf beschreven experimenten, zijn met enige gegevens uit de literatuur samengevat in tabel 32.

TABEL 32

Overzicht van enige onderzochte eigenschappen van de erythrocyten van een aantal diersoorten¹

Erythrocyten van	Columbia SK-virus		X-factor		Vorming T-antigeen door		Doen verdwijnen Columbia SK-HA	
	HA	Ads.	Ads.	El.	X-factor	chol. filtr.	X-factor	chol. filtr.
1. mens	+	+	+	+	+	+	+	+
	(47, 52)	(52)				(41)		
2. schaap	+	+	+	+	+	+	+	+
	(46, 102)	(5, 47, 52)				(41)		(5)
3. muis	—	—	?		—	—		
	(47, 52)							
4. konijn	—	—	sp.	?	sp. (?)	sp. (41)		
	(47, 52)	(52)						
5. Rhesusaap	—	—	+	+	+	+		
				(?)				

¹ Verklaring der tekens en afkortingen:

de getallen tussen haakjes verwijzen naar de desbetreffende literatuur

HA = Haemagglutinatievermogen

Ads. = adsorptie

El. = elutie

chol.filtr. = cholerafiltraat

+ = trad op

— = trad niet op

? = trad waarschijnlijk niet op

+? = trad waarschijnlijk wel op

sp. = trad zeer zwak op.

9. *Oefenen speeksels van verschillende mensen invloed op elkander uit?*

Een reeks proeven werd verricht, waarbij gelijke hoeveelheden speeksels van verschillende personen met elkander gemengd werden. Nadat deze mengsels gedurende 1 uur bij kamertemperatuur hadden gestaan, werden er de volgende verdunningen van gemaakt: 1:2; 1:4; 1:8 en 1:16; de positieve speeksels, waarvan werd uitgegaan, waren dan respectievelijk 1:4; 1:8; 1:16 en 1:32 verdund. Van deze verdunningen werd op de bekende wijze (hoofdstuk III) de invloed op het vermogen der 0-erythrocyten, door Columbia SK-virus geagglutineerd te worden, bepaald en in enige experimenten werd ook nagegaan, of T-antigeen te voorschijn werd geroepen.

Tabel 33 toont het resultaat van deze proeven.

TABEL 33

Invloed van het mengen van verschillende speeksels op de X-factor werkzaamheid

Speeksel van	gemengd met	Speeksel van	Mengsel
1. H. (neg.)		J. (pos.)	neg.
2. H. (neg.)		Sn. (pos.)	neg.
3. H. (neg.)		F. (pos.)	neg.
4. H. (neg.)		d. J. (pos.)	neg.
5. H. (neg.)		R. (pos.)	neg.
6. H. (neg.)		St. (pos.)	neg.*
7. K. (neg.)		d. J. (pos.)	neg.
8. Y. (neg.)		d. J. (pos.)	neg.
9. L. (neg.)		J. (pos.)	neg.
10. L. (neg.)		F. (pos.)	neg.
11. Kl. (neg.)		J. (pos.)	zwak pos.
12. Kl. (neg.)		F. (pos.)	zwak pos.
13. B. (neg.)		J. (pos.)	zwak pos.
14. B. (neg.)		F. (pos.)	zwak pos.
15. F. (neg.)		J. (pos.)	pos.
16. F. (neg.)		F. (pos.)	pos.
17. J. (neg.)		F. (pos.)	pos.
18. J. (neg.)		J. (pos.)	pos.
19. J. (pos.)		F. (pos.)	pos.

* Hier werd ook de vorming van het T-antigeen bepaald. Deze was niet opgetreden.

Uit deze experimenten viel op te maken, dat negatieve speeksels van sommige personen in staat waren de X-factor in speeksels van anderen onwerkzaam te maken. De negatieve speekselsmonsters, die deze eigenschap toonden, waren voor het merendeel (H, K, Y en L) verkregen voor personen, bij wie nooit X-factor in het speeksel was aangetroffen. Daarnaast was er nog een groep negatieve speeksels (Kl. en B.) die, na 1 uur contact bij kamertemperatuur met positieve, de werkzaamheid hiervan in meerdere of mindere mate konden doen

dalen en tenslotte waren er ook nog enige negatieve (F. en J.), die geen enkele invloed op de sterkte der X-factor in positieve speekselmonsters uitoefenden. De twee laatste waren afkomstig van personen, die vaak de X-factor in hun speeksel hadden. Het mengen van verschillende positieve porties van eenzelfde persoon had geen enkele nadelige invloed op het gehalte aan X-factor.

Om nog eens de invloed van een aantal negatieve speeksels op de X-factor na te gaan, werden positieve speekselmonsters van een 4-tal personen samengebracht met een aantal negatieve speeksels (gelijke hoeveelheden, contact 1 uur bij kamertemperatuur, bepaling van de sterkte der X-factor in de mengsels als boven).

In tabel 34 is de uitkomst van deze proef vermeld.

TABEL 34

Individuele verschillen in het „X-factor-remmende” vermogen van enige negatieve speeksels

van	Mengsels	met	Sterkte van het mengsel	Gem. sterkte per portie *
1.	J. (pos.)	KVB	9	
2.	id.	F. (neg.)	9 $\frac{3}{4}$	4,2
3.	id.	Kl. (id.)	7	2,2
4.	id.	M. (id.)	6	0,6
5.	id.	Ga. (id.)	2 $\frac{3}{4}$	0,6
6.	id.	L. (id.)	$\frac{3}{4}$	0
1.	d. J. (pos.)	KVB	3 $\frac{1}{4}$	
2.	id.	Erk. (neg.)	4	4,4
3.	id.	Di. (id.)	2 $\frac{1}{2}$	
4.	id.	E. (id.)	2	2,6
5.	id.	Y. (id.)	0	0
6.	id.	K. (id.)	0	0
1.	R. (pos.)	KVB	5 $\frac{3}{4}$	
2.	id.	Fo. (neg.)	5 $\frac{1}{4}$	
3.	id.	Ko. (id.)	0	0,5
4.	id.	B. (id.)	0	0,6
5.	id.	H. (id.)	0	0
1.	Ku. (pos.)	KVB	16	
2.	id.	Ko. (neg.)	9	0,5
3.	id.	C. (id.)	15 $\frac{3}{4}$	1,9
4.	id.	B. (id.)	12 $\frac{3}{4}$	0,6

* In de laatste kolom zijn vermeld de gemiddelde sterkten per portie voor de desbetreffende persoon, voorzover deze berekend waren.

De sterkten zijn hier berekend op de manier, zoals die reeds vroeger (hoofdstuk III) werd beschreven. Uit deze proef viel op te maken, dat het „X-factor-inhiberende” vermogen van allerlei negatieve speeksels nogal wat verschilde. Toen we dit vergeleken met de getallen (tabel 34, laatste kolom), waarin uitgedrukt was, hoe sterk de porties gemiddeld waren bij de personen, waarvan de negatieve speekselmonsters onderzocht werden, viel er een zekere correlatie te ontdekken. Hoe groter namelijk de gemiddelde sterkte per portie bij een bepaalde persoon was, des te geringer bleek het „X-factor-inhiberende” vermogen van een negatieve portie van diezelfde persoon te zijn.

Hierna werd onderzocht, hoe sterk de „X-factor inhiberende” werking van een bepaald negatief speeksel (H.) was, en vooral, hoe thermo-resistent de daarvoor verantwoordelijke stof was.

Van een positief speekselmonster, 1:2 verdund, werden 9 porties gemaakt, die respectievelijk in contact werden gebracht met 4 verdunningen (1:2, 1:4, 1:8 en 1:16) van het negatieve speeksel, 4 verdunningen van dezelfde sterkte van het negatieve speeksel, nadat dit eerst gedurende 15 minuten op 100° C. was verhit en, de laatste positieve portie, die als contrôle diende, met KVB.

Gedurende 1 uur stonden de mengsels bij kamertemperatuur en daarna werd het gehalte aan X-factor bepaald op dezelfde wijze als boven. Voor een gemakkelijke onderlinge vergelijking werden de gevonden sterkten weer in een getal uitgedrukt, en deze laatste zijn vermeld in tabel 35.

TABEL 35

Bepaling van de sterkte van de X-factor remmende werking van een negatief speekselmonster, zowel voor als na verhitten (15 minuten 100° C.) van dit laatste

van	Mengsels		met	Sterkte van het mengsel	
1.	Bo. (pos.)	1:2	H. (neg.)	1:2	$\frac{1}{2}$
2.	id.		id.	1:4	$\frac{1}{2}$
3.	id.		id.	1:8	$1\frac{3}{4}$
4.	id.		id.	1:16	$8\frac{1}{2}$
5.	id.		id. (verhit)	1:2	$\frac{1}{2}$
6.	id.		id.	1:4	2
7.	id.		id.	1:8	11
8.	id.		id.	1:16	11
9.	id.		KVB		14

De „X-factor inhiberende” stof toonde dus een grote thermo-resistentie. Een temperatuur van 100° C. gedurende 15 minuten maakte deze stof slechts gedeeltelijk onwerkzaam. Verder bleek, dat

normaal negatief speeksel (H.) in een verdunning van 1:8 nog een bijna volledige remming gaf van de X-factor in het gebruikte speekselmonster; in hogere verdunningen nam de werkzaamheid van deze stof echter snel af.

Dat er bij de menging en de daardoor dikwijls optredende remming van de werking der X-factor geen sprake was van een invloed

TABEL 36

Bepaling van een mogelijke verandering van de 0-erythrocyten door negatief speeksel, waardoor ze hun ontvankelijkheid voor de X-factor verloren zouden hebben

	Verdunningen van het Columbia SK-virus				
	1:20	1:40	1:80	1:160	contrôle
¼ % 0-er. (onbehandeld)	1/2	1	1	±/+	—
¼ % 0-er. (neg. sp. 1:2)	1/2	1	1	±/+	—
¼ % 0-er. (neg. sp. en pos. sp. 1:2) *	—	—	—	—	—
¼ % 0-er. (neg. sp. en pos. sp. 1:4)	1	±/+	—	—	—
¼ % 0-er. (neg. sp. en pos. sp. 1:8)	1	1	±/+	—	—
¼ % 0-er. (neg. sp. en pos. sp. 1:16)	1	1	1	±/+	—
¼ % 0-er. (pos. sp. 1:2)	—	—	—	—	—
¼ % 0-er. (pos. sp. 1:4)	1	±	—	—	—
¼ % 0-er. (pos. sp. 1:8)	1/2	1	±/+	—	—
¼ % 0-er. (pos. sp. 1:16)	1/2	1	1	±/+	—

* ¼ % 0-er. (neg. sp. en pos. sp. 1:2) = ¼ % suspensie van 0-erythrocyten, die, na voorbehandeling met negatief speeksel, behandeld werden met positief speeksel, 1:2 verdund.

¼ % 0-er. (pos. sp. 1:2) = ¼ % suspensie van 0-erythrocyten, die slechts behandeld werden met positief speeksel, 1:2 verdund.

van het negatieve speeksel op de 0-erythrocyten, mocht blijken uit de hierna vermelde proef.

Negatief speeksel (H.), 1:2 verdund, werd gemengd met een gelijke hoeveelheid $\frac{1}{2}$ % suspensie van 0-erythrocyten. Het mengsel werd, na 1 uur bij kamertemperatuur gestaan te hebben, gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof werd afgegoten en de gesedimenteerde erythrocyten werden geresuspendeerd tot een $\frac{1}{2}$ % suspensie. Deze werd verdeeld in 5 porties en op ieder daarvan lieten we een positief speeksel in respectievelijk de verdunningen 1:2, 1:4, 1:8 en 1:16 inwerken; de vijfde portie bleef bewaard voor contrôle om zonder verdere behandeling met Columbia SK-virus te worden samengebracht. Tegelijkertijd werden ook verdunningen van het positieve speeksel gemengd met een $\frac{1}{2}$ % suspensie van onbehandelde 0-erythrocyten. Na 1 uur contact bij kamertemperatuur met deze positieve speeksels, gevolgd door centrifugeren, afgieten van de bovenstaande vloeistoffen en resuspenderen van de gesedimenteerde erythrocyten, werd hiervan het agglutinatievermogen ten opzichte van Columbia SK-virus bepaald.

Zoals uit tabel 36 blijkt, had het negatieve speeksel de erythrocyten dus niet minder ontvankelijk gemaakt voor de X-factor.

Vervolgens werd nagegaan, of, behalve de positieve speeksels, ook het cholerafiltraat door een negatief speeksel onwerkzaam gemaakt kon worden.

Een negatief speekselmonster (H.) werd gemengd met een gelijke hoeveelheid van respectievelijk de volgende cholerafiltraatverdunningen: 1. onverdund, 2. 1:100, 3. 1:400. De laatste twee diluties van het cholerafiltraat kwamen in de sterkte van hun werkzaamheid ongeveer overeen met de meeste positieve speeksels. Na 1 uur bij kamertemperatuur te hebben gestaan werd van deze mengsels het vermogen, de Columbia SK-haemagglutinabiliteit van 0-erythrocyten te niet te doen, bepaald. De sterkte werd, zoals gebruikelijk, in een getal uitgedrukt, dat in tabel 37 vermeld is.

TABEL 37

Bepaling van de invloed van een negatief speeksel op de werkzaamheid van cholerafiltraat

	Mengsel cholerafiltraat-KVB	Mengsel cholerafiltraat-speeksel H.
Cholerafiltraat 1:1	17	> 22
Cholerafiltraat 1:100	11 $\frac{1}{4}$	3
Cholerafiltraat 1:400	2 $\frac{3}{4}$	1

Het onverdunde cholerafiltraat scheen na contact met negatief speeksel nog iets beter te werken. Dit zou misschien kunnen berusten op een wat gunstiger ionenmilieu. De verdunningen 1:100 en 1:400

van het cholerafiltraat werden door het negatieve speeksel echter onder de omstandigheden van de proef bijna onwerkzaam gemaakt. Dit kwam dus overeen met de resultaten, die in vorige proeven (zie tabellen 33 en 34) met positieve speeksels werden verkregen. In deze laatste twee mengsels trad niet alleen een vermindering op van de invloed op de Columbia SK-agglutinabiliteit, maar ook het T-antigeenvormende vermogen was in gelijke mate achteruitgelopen.

Daarna hebben wij ons afgevraagd, wat het lot van de „X-factor inhiberende” stof in negatieve speeksels zou zijn na contact met positieve of met cholerafiltraat. Zou er misschien sprake zijn van een meer of minder langzame enzymatische vernietiging door de X-factor, waarbij deze laatste dan na verloop van tijd weer vrij zou komen? De proeven, die met het oog hierop verricht werden, gaven niet alle een even duidelijke uitkomst, maar zij vestigden wel de indruk, dat er van enige werking in de bovenaangegeven zin sprake was.

Cholerafiltraat (onverdund) werd gemengd met negatief speeksel (H.) (gelijke hoeveelheden van beide). Na 1 uur incuberen bij 37° C. werd dit mengsel gedurende 30 minuten in een waterbad op 65° C. verhit, om alle enzymwerking van het cholerafiltraat te vernietigen. Dit mengsel (I) (zie tabel 38), waarin het negatieve speeksel dus 1:2 verdund was, werd samengebracht met een positief speekselmonster. Ook hier duurde het contact bij kamertemperatuur weer 1 uur, waarna op de reeds bekende wijze (hoofdstuk III) de invloed van het laatste mengsel (II) (zie tabel 38) op het vermogen van 0-erythrocyten geagglutineerd te worden door Columbia SK-virus werd bepaald. Tegelijkertijd werd een aantal contrôles ingezet.

Tabel 38 A geeft de uitkomst.

Het in tabel 38 onder A vermelde resultaat steunde inderdaad de opvatting, dat de „X-factor inhiberende” stof door cholerafiltraat onwerkzaam gemaakt kon worden, maar daartegenover stond de uitkomst van een andere proef, die bijna op dezelfde wijze werd opgezet (tabel 38 B).

Hier, waar de omstandigheden in geringe mate gewijzigd waren, bleek niets van een vermindering van de werking van de „X-factor inhibitor”.

Daar het bekend was, dat er voor een maximale werkzaamheid van het cholerafiltraat een bepaalde concentratie van het Ca-ion vereist is, werd ertoe overgegaan het door ons gebruikte ruwe filtraat met calciumchloride (CaCl₂) te behandelen.

Hiertoe werden op de door KRET aangegeven wijze aan 100 cc. cholerafiltraat 5½ cc. van een 50 % CaCl₂-oplossing toegevoegd. Het mengsel werd op pH = 7 gebracht. Het gevormde Ca-phosphaat werd door centrifugatie volkomen neergeslagen en de bovenstaande vloeistof, die nu de optimale hoeveelheid Ca-ion bevatte, werd in de volgende proef gebruikt. Het aldus behandelde filtraat zal verder aangeduid worden als „Ca-cholerafiltraat”.

TABEL 38

Invloed van het cholerafiltraat op de „X-factor inhiberende” eigenschap van een negatief speeksel¹

Mengsel I	Behandeling mengsel I	Mengsel II	Behandeling mengsel II	Sterkte mengsel II
A 1. chol. filtr. + neg. sp. (H.)	1 uur 37° C. gevolgd door ½ uur 65° C.	Mengsel I + pos. sp. (M. d. B.)	1 uur kamertemperatuur	8
2. KVB + neg. sp. (H.)		id. + id.		4
3. chol. filtr. + KVB		id. + id.		8¼
B 1. chol. filtr. 1:2 + neg. sp. (H.)	1 uur kamertemp. gevolgd door ½ uur 56° C.	Mengsel I + pos. sp. (Da)		0
2. KVB + neg. sp. (H.)		id. + id.		0
3. chol. filtr. 1:2 + KVB		id. + id.		5½
C 1. Ca. chol. filtr. + neg. sp. (H.)	1 uur kamertemp. gevolgd door ½ uur 70° C.	Mengsel I + pos. sp. (Cl.)		5
2. KVB + neg. sp. (H.)		id. + id.	0	
3. Ca. chol. filtr. + KVB		id. + id.	4½	
D 1. Ca. chol. filtr. + neg. sp. (H.)	1 uur kamertemp. gevolgd door 8 minuten 100° C.	Mengsel I + pos. sp. (L.)	2¼	
2. KVB + neg. sp. (H.)		id. + id.	0	
3. Ca. chol. filtr. + KVB		id. + id.	6¼	

¹ Verklaring der afkortingen:

1. chol.filtr. = cholerafiltraat
2. Ca-chol.filtr. = met CaCl₂ behandelde cholerafiltraat (zie tekst)
3. neg. sp. = negatief speeksel
4. pos. sp. = positief speeksel.

In een experiment, dat in beginsel weer op dezelfde wijze werd uitgevoerd als de hiervoor beschrevene, werd de in tabel 38 onder C vermelde uitkomst verkregen.

Het bleek, dat het negatieve speeksel, dat van te voren bloot gesteld was geweest aan „Ca-cholerafiltraat”, zijn „X-factor inhiherende” vermogen verloren had.

In een volgende soortgelijke proef werd echter weer een minder uitgesproken resultaat verkregen (tabel 38 D).

Niet alleen werd de invloed van het cholerafiltraat op de „X-factor remming” door negatieve speeksels onderzocht, maar ook werd getracht de invloed van positieve speeksels op deze eigenschap te bepalen.

De in tabel 39 vermelde uitkomst werd daarbij verkregen.

TABEL 39

*Invloed van positief speeksel op de „X-factor inhiherende” eigenschap ven een negatief speeksel*¹

Mengsel I	Behandeling mengsel I	Mengsel II	Behandeling mengsel II	Sterkte mengsel II
1. pos. sp. (Jo.) + neg. sp. (H.)	15 uur 37° C. gevolgd door 8 minuten 100° C.	mengsel I + pos. sp. (Sch.)	1 uur kamertemperatuur	4¾
2. pos. sp. (598) + neg. sp. (H.)		mengsel I + pos. sp. (Sch.)		12¼
		3. neg.sp. (H.) + pos.sp. (Sch.)		0
		4. KVB + pos.sp. (Sch.)		11½
		5. KVB + pos.sp. (Jo.)		6
		6. KVB + pos.sp. (598)		14½

¹ Verklaring afkortingen: zie tabel 38.

Hieruit viel op te maken, dat ook positieve speeksels de „X-factor inhibitor” konden aantasten. Het sterkste van de twee positieve speekselmonsters (598) scheen ook de schadelijkste werking uitgeoefend te hebben.

Daarna werd nagegaan, of een positief speeksel, dat na een vrij kort contact met een „X-factor inhiherende” portie zijn werkzaamheid verloor, na een langer tijdsverloop deze eigenschap weer terugkreeg.

Een aantal positieve speekselmonsters werd gemengd met een negatief speeksel en gedurende 15 uren bij 37° C. geplaatst; een contrôlegroep met dezelfde mengsels werd 1 uur bij kamertemperatuur gelaten, terwijl er tenslotte nog een reeks contrôlemengsels van positieve speekselporities en KVB werd ingezet, die ook 1 uur bij kamertemperatuur stond. Na deze perioden werd van ieder dezer mengsels bepaald, in hoe sterke mate ze het vermogen van Columbia SK-virus 0-erythrocyten te doen agglutineren konden beïnvloeden.

Tabel 40 laat het resultaat hiervan zien.

TABEL 40

Bepaling van de X-factor-werkzaamheid na contact van respectievelijk 1 uur en 15 uur met een „X-factor inhiberend” negatief speeksel

Positief speeksel van	Gemengd met		
	1. neg. sp. H. 15 uur 37° C.	2. neg. sp. H. 1 uur kamer- temperatuur	3. KVB 1 uur kamer- temperatuur
1. Cl.	8¾	0	
2. De.	½	0	6
3. Schm.	¾	0	9
4. v. d. M.	1	0	1
5. St.	3	1	6¾
6. La.	0	0	2½
7. Jo.	3¾	4	6
8. 598.	7½	6	14½

Van de 8 onderzochte positieve speeksels bleek er slechts één te zijn, die na 1 uur kamertemperatuur geen X-factor werkzaamheid meer toonde, maar deze na 15 uren herkregen had. Hoewel er bij enige andere misschien ook wel zulk een neiging te constateren was, viel het toch moeilijk uit deze proef op te maken, dat ook positieve speeksels de „X-factor inhibitor” in het negatieve speeksel aantastten.

De met het mengen van allerlei speekselmonsters verkregen resultaten kunnen dus als volgt worden samengevat:

1. Sommige negatieve speeksels waren in staat de X-factor onwerkzaam, respectievelijk minder werkzaam te maken na er 1 uur mee in contact te zijn geweest.
2. De mate van de remmende werkzaamheid der negatieve speeksels van bepaalde personen kwam in grote trekken overeen met de gemiddelde sterkte van de X-factor per portie bij die personen, met dien verstande, dat negatieve speekselmonsters van mensen, die een hoog gemiddeld gehalte aan X-factor toonden, geen remmende werking hadden op deze factor, terwijl zij, die nooit X-factor uitscheidten in hun speeksel, juist sterk deze factor remden.
3. De „X-factor-remmende” stof in negatieve speeksels bezat een grote mate van thermoresistentie.
4. Cholerafiltraat in hogere verdunningen kon ook in zijn werkzaamheid geremd worden door deze stof.

5. De „X-factor-remmende” stof maakte de erythrocyten zelf niet minder ontvankelijk voor de X-factor.
6. De indruk werd gevestigd, dat geconcentreerd cholerafiltraat in staat was de „X-factor-remmende” stof onwerkzaam te maken. Niet alle in dit opzicht verrichte proeven gaven echter een eensluidend resultaat.
7. Ook werd de indruk verkregen, dat althans sommige X-factor bevattende speeksels na wat langer inwerkingsduur hiertoe in staat waren.
8. Dat er na mengen van positieve en negatieve speeksels na aanvankelijk onwerkzaam worden der mengsels, later weer X-factor werkzaamheid te voorschijn kwam, kon niet duidelijk worden vastgesteld. Bij 1 speeksel was dit inderdaad het geval; bij enige andere was hier een zwakke aanduiding van, en er waren er ook, waar hiervan niets bleek.

Men moet er echter wel rekening mee houden, dat over het algemeen de enzymwerking in dit opzicht van de speeksels gering was, vergeleken met die van het cholerafiltraat. Als er dus ergens weinig X-factor specifiek geadsorbeerd zou blijven, of tijdens de reactie onwerkzaam zou worden, zou dit reeds aanstonds sterk op kunnen vallen.

Helaas maakte de moeilijkheid om over voldoende positieve speekselmonsters te beschikken een nauwkeuriger onderzoek over wat er bij het mengen geschiedde, niet goed mogelijk.

10. *Is de X-factor in staat bloedgroeps substantie af te breken?*

Daar het bekend was, dat in speeksels ook fermenten voorkomen, die bloedgroeps substantie kunnen vernietigen, en daar de uitscheiding hiervan ook individuele en dagelijkse verschillen toonde, werd nagegaan, of er misschien een identiteit bestond tussen deze en de X-factor.

Er werd onderzocht, of positieve speeksels in staat waren bloedgroep A-substantie in een bepaald speekselmonster onwerkzaam te maken. De verdunningen in deze proef werden alle in physiologische keukenzoutoplossing gemaakt. We gingen als volgt te werk:

Bij een „secretor” werd speeksel opgevangen. Terstond daarna werd dit speekselmonster gedurende 10 minuten verhit in kokend water om alle enzymen onwerkzaam te maken. Vervolgens werd het 1:50 verdund en 0,3 cc. van deze verdunning werd samengebracht met 0,3 cc. van een bekend positief speeksel. Zo werd een aantal mengsels gemaakt met verschillende positieve speeksels. Nadat deze laatsten 15 uur bij 37° C. geïncubeerd waren geweest, werden er verdunningen van gemaakt (0,2 cc. per buis). Aan iedere buis werd 0,2 cc. anti-A serum, 1:4 verdund (= 8 agglutinerende eenheden, want de titer was 1:32), toegevoegd. Nadat deze buizen een half uur bij kamertemperatuur hadden gestaan, werd in ieder nog 0,2 cc. van een ½ % suspensie van menselijke erythro-

cyten der bloedgroep A gepipetteerd. Er werd goed geschud en het geheel werd 1—2 uren bij kamertemperatuur geplaatst. Daarna werd, na voorzichtig opschudden, met het blote oog de agglutinatie afgelezen.

Zo werd ook de invloed van cholerafiltraat nagegaan op het A-substantie bevattende speeksel. Hier werden de mengsels echter, nadat ze 15 uur geïncubeerd waren geweest bij 37° C. eerst gedurende 8 minuten op 100° C. verhit om de sterke RDE werkzaamheid van het cholerafiltraat te vernietigen.

Tabel 41 geeft de uitkomsten van deze proef.

TABEL 41

Onderzoek naar de bloedgroepsuubstantie vernietigende werking van positieve speeksels

Speeksel V. (1:50) gemengd met	Verdunningen van het speeksel V.							con- trôle
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1200	1:1600	1:2000	
1. sp. Da. (pos.)	—	—	—	—	—	—	—	—
2. sp. Wa. (pos.)	—	—	—	±	1	1	2	2
3. sp. Sch. (pos.)	—	—	—	—	±	1	1	2
4. sp. 598 (pos.)	±	1	1	1	1/2	2	2	2
5. sp. v. d. M. (pos.)	—	—	—	—	1	2	2	2
6. sp. Ku. (pos.)	2	2	2	2	3	3	3	3
7. sp. CL (pos.)	—	—	—	—	—	—	—	3
8. sp. De. (pos.)	2	2	2	2	3	—	—	3
9. Ca. chol. filtr.	—	—	—	—	—	—	—	2
10. chol. filtr.	—	—	—	—	—	—	—	2
11. phys. NaCl-opl.	—	—	—	—	—	1	2	2

Er was dus een aantal positieve speeksels, die de bloedgroep A-substantie konden vernietigen, maar een groter aantal was daar niet toe in staat. Bij verder onderzoek van nog een aantal positieve speeksels werd hetzelfde resultaat verkregen. Ook het cholerafiltraat bleek A-substantie niet te kunnen vernietigen. Dat het gehalte aan A-substantie in het mengsel van cholerafiltraat en speeksel nog groter was dan in de contrôle, zou kunnen berusten op het aanwezig zijn van pepton in de voedingsbodem, waarin V. cholerae werd gekweekt. Van pepton is het bekend, dat het een hoog gehalte aan A-substantie heeft.

Op grond van deze uitkomsten bleek dus wel, dat de X-factor-werkzaamheid van de speeksels niet identiek was met het vermogen bloedgroep A-substantie af te breken.

11. *Worden 0-erythrocyten na contact met Columbia SK-virus of „klassiek” poliomyelitisvirus „panagglutinabel”?*

Het was reeds bekend, dat 0-erythrocyten, die in contact waren geweest met Columbia SK-virus, daarna weer even goed door dit virus

geagglutineerd konden worden als ervoor, terwijl ook van een spontane elutie van het virus niets of nauwelijks iets gebleken was. Op deze gronden werd dan ook aangenomen, dat het Columbia SK-virus geen enzymatische invloed uitoefende op de erythrocyten, in tegenstelling tot het influenzavirus.

Door ons werd nog nagegaan, hoe de cellen zich gedroegen, wanneer ze, na in contact te zijn geweest met Columbia SK-virus, werden samengebracht met AB-serum.

Een suspensie van $\frac{1}{2}$ % 0-erythrocyten werd gemengd met een gelijke hoeveelheid Columbia SK-virussuspensie, 1:10 verdund. Het mengsel stond gedurende 3 uur bij 4° C., daarna werd het gecentrifugeerd en de bovenstaande vloeistof werd bewaard. Hieruit bleek bij verder onderzoek bijna alle Columbia SK-virus geabsorbeerd te zijn. De erythrocyten werden nog driemaal gewassen met een overmaat KVB en vervolgens werden ze geresuspendeerd in 2 cc. van een hypertonische NaCl-oplossing (waarin volgens HALLAUER elutie zou plaats vinden).

Nadat deze suspensie gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur gestaan had, werd ze weer gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof werd bewaard. De erythrocyten werden vervolgens tweemaal gewassen met overmaat KVB en daarna geresuspendeerd tot $\frac{1}{4}$ % suspensie. Toen werd bepaald, of ze agglutineerden met AB-serum.

Het bleek nu, dat deze erythrocyten, die dus Columbia SK-virus hadden geabsorbeerd, na deze behandeling nog even goed te agglutineren waren door Columbia SK-virus als normale. Met AB-serum werd geen agglutinatie vastgesteld.

Echter kon in de bovengenoemde elutievloeistof geen Columbia SK-virus worden aangetoond. Wellicht was de hoeveelheid hiervoor te klein.

Vervolgens werd nog onderzocht, welke invloed suspensies van apenruggemergen, die zogenaamd klassiek poliomyelitisvirus bevatten, op 0-erythrocyten uitoefenden.

Drie stammen werden hiervoor gebruikt, namelijk: type 1 (Brunhilde), type 2 (Aycock) en type 3 (Leon). Suspensies van deze drie ruggemergen in een verdunding van 1:10 werden samengebracht met een gelijke hoeveelheid $\frac{1}{2}$ % 0-erythrocytensuspensie. Ieder mengsel werd over drie porties verdeeld, die gedurende 1 uur bij respectievelijk 4° C., kamertemperatuur en 37° C. werden geplaatst. Nadat deze tijd verstreken was, werden de 9 buizen gecentrifugeerd; de bovenstaande vloeistoffen werden verwijderd en de erythrocyten werden geresuspendeerd tot $\frac{1}{4}$ % suspensie. Deze werden samengebracht met verdunningen van het AB-serum. Na 2 uren staan bij 4° C. werd afgelezen. Nergens was sprake van een agglutinatie.

Ook de „klassieke” poliomyelitisstammen toonden dus geen enzymwerking, waardoor zij in staat waren T-antigeen te vormen aan de erythrocyten.

In een volgende proef werd nog nagegaan, of 0-erythrocyten, die voorbehandeld waren met een suspensie van poliomyelitisvirus (type 3),

daarna nog konden agglutineren met Columbia SK-virus. Zij waren hiertoe nog even goed in staat als de normale 0-erythrocyten.

Het is dus gebleken, dat noch door Columbia SK-virus, noch door de „klassieke” stammen van poliomyelitisvirus aan de oppervlakte van erythrocyten dezelfde omzettingen teweeggebracht konden worden als door het influenzavirus, het cholerafiltraat of de X-factor uit het speeksel. Dit maakte het zeer waarschijnlijk, dat zij niet zulk een enzym bezitten.

VI BESPREKING

Uit de resultaten van de door ons verrichte proeven bleek, dat de X-factor inderdaad in sterkere mate aanwezig was bij poliomyelitis-patienten dan bij gezonde personen. Op de volgende bladzijden zal getracht worden een verklaring te vinden voor dit verschijnsel.

Eerst zal echter aandacht besteed moeten worden aan hetgeen omtrent enige eigenschappen van deze zogenaamde X-factor bekend werd. De veranderingen, die aan de oppervlakten van de erythrocyten ontstonden onder invloed van de X-factor, waren geheel gelijk aan de door het cholerafiltraat teweeggebrachte, namelijk:

1. vernietiging der receptoren voor het Columbia SK-virus, en
2. het doen ontstaan van T-antigeen.

Dat deze beide veranderingen door éénzelfde stof werden teweeggebracht, mag op grond van onze proeven wel als vaststaand worden aangenomen. Hiervoor pleit, dat

1. onder invloed van speeksels van verschillende sterkte de mate, waarin beide verschijnselen tot uiting kwamen, steeds gelijk was;
2. zowel in de proeven met cholerafiltraat als met speeksel, er steeds dezelfde verhouding bestond tussen de verdunningen, waardoor de Columbia SK-receptorvernietiging en de T-antigeenvorming teweeggebracht werden (men kan zich deze overeenkomst moeilijk voorstellen, als er van 2 stoffen sprake zou zijn);
3. als onder invloed van bepaalde temperaturen de werkzaamheid van speeksels nadelig werd beïnvloed, dit ook weer in beide verschijnselen volkomen gelijk tot uiting kwam;
4. beide verschijnselen niet meer op te roepen waren door het mengsel van een bepaald positief en een bepaald negatief speekselmonster.

Daar zowel het cholerafiltraat als de filtraten van de door FRIEDENREICH gebruikte J-bacil T-antigeen vormden, mag dus ook wel worden aangenomen, dat door de laatste de receptor voor het Columbia SK-virus vernietigd zou kunnen worden. De receptor voor het influenza-virus kon immers door filtraten van de zogenaamde M-bacil (FRIEDENREICH) ook vernietigd worden (STONE 94).

Het gedrag van de X-factor tegenover de 0-erythrocyten was

gelijk aan dat van filtraten van de J-bacil, hetwelk door FRIEDENREICH beschreven werd. De X-factor werd vrij snel geadsorbeerd aan de erythrocyten, waarna deze langzaam een verandering begonnen te ondergaan; geleidelijk kwam de X-factor weer vrij, terwijl de verandering voltooid werd. De X-factor verscheen dus niet in het reactieproduct. Op grond hiervan mag aangenomen worden, dat we hier te maken hadden met een enzym.

Ook in het gedrag tegenover schapenerythrocyten en tegenover konijnenerythrocysten stemde de X-factor geheel overeen met de werkzame stof uit de filtraten van de J-bacil.

Bij de konijnenerythrocysten trad nog een complicatie op. Ofschoon hier wel van een slechte adsorptie van de X-factor sprake was, werd toch na inwerking van een speeksel, dat deze factor bevatte, een duidelijk agglutinatievermogen waargenomen ten opzichte van AB-serum; ook als uit het AB-serum het t-agglutinine was verwijderd, bleef dit agglutinatievermogen, hoewel iets minder sterk, aanwezig. Dit wijst er op, dat er hier slechts in zeer geringe mate sprake is geweest van T-antigeenvorming, wat overeenstemt met hetgeen FRIEDENREICH vond bij konijnenerythrocysten.

Waarschijnlijk zal het verschil in agglutinatievermogen, dat optrad tussen met cholerafiltraat behandelde en met speeksel behandelde erythrocyten, geweten moeten worden aan een naast de X-factor in speeksel voorkomende stof. Dit verschijnsel werd evenwel nog niet verder onderzocht.

Wat de thermoresistentie van de X-factor betreft, bestond er eveneens een goede overeenstemming met de vondsten van FRIEDENREICH. Na een half uur verhitten bij 50° C. was in zijn proeven het merendeel der werkzaamheid reeds verdwenen. Bij het beoordelen der thermoresistentie moet er echter rekening mee worden gehouden, dat deze misschien door bepaalde invloeden wel kan variëren. (Men denke hier bijvoorbeeld aan de invloed van het calciumion op de thermoresistentie van RDE in cholerafiltraat).

Op grond van de door ons gevonden eigenschappen van de X-factor en van de door anderen medegedeelde eigenschappen van de filtraten van de J-bacil en *Vibrio cholerae*, menen we, dat aangenomen mag worden, dat deze X-factor een enzym is, identiek met datgene, dat voorkomt in filtraten van cultures van de bovengenoemde microorganismen. We zouden dan ook de X-factor willen aanduiden als „speeksel RDE”, naar analogie van de in hetzelfde opzicht werkzame stof in het cholerafiltraat, die RDE („receptor destroying enzyme”) genoemd werd.

Naast het bovengenoemde werden er in speeksel nog een aantal enzymen aangetroffen; één hiervan is het bloedgroepsuubstantie-vernietigende enzym van SCHIFF.

Daar een aantal door ons onderzochte speekselmonsters, die

duidelijke RDE-werking toonden, niet in staat bleken te zijn om bloedgroep A-substantie in het speeksel van een „secretor” af te breken, terwijl ook het cholerafiltraat, zowel voor als na calciumchloride behandeling, dit vermogen niet bleek te bezitten, kan gezegd worden, dat het speeksel RDE niet identiek is met het zogenaamde bloedgroepenferment van SCHIFF.

Door DOLD c. s. werd in het speeksel een stof aangetroffen, die de groei van vele bacteriën kon remmen. Hij gaf er de naam „inhibines” aan en hij sprak het vermoeden uit, dat het om een enzymachtige stof ging. Het voorkomen ervan wisselde individueel nogal en ook bij eenzelfde persoon werd ze van dag tot dag in verschillende hoeveelheid aangetroffen. Helaas vermeldde hij nergens, hoeveel mensen inhibines uitscheidde en in welke mate en, of er ook personen waren, bij wie deze stof nooit in het speeksel gevonden werd.

Een aantal eigenschappen, bijvoorbeeld de grote thermolabiliteit, kwam overeen met die van het speeksel RDE, maar wat de bestendigheid tegen bewaren betrof, schenen er toch wel verschillen te zijn. De inhibines toonden in dit opzicht minder weerstand dan het speeksel RDE.

Of deze inhibines identiek geacht kunnen worden met speeksel RDE, valt hier moeilijk te zeggen, daar wij zelf geen proeven verrichtten om deze vraagstelling te beantwoorden.

De vraag kan nu nog gesteld worden, waar het speeksel RDE gevormd wordt. Is het een product van het menselijke lichaam of wordt het misschien door bacteriën in de mondholte geproduceerd?

Door JUNGBLUT c. s. werd enige aandacht aan dit probleem besteed. Het gelukte hen echter niet, uit speeksel bacteriën te kweken, die in staat waren deze stof te vormen. Voor dit doel entten zij speeksel op agarplaten en persten deze later uit. In de filtraten konden zij geen X-factor-werkzaamheid aantonen.

Het zal echter niet gemakkelijk zijn om op deze wijze een eventuele bacteriële oorsprong met zekerheid uit te sluiten, daar het moeilijk is, alle in het speeksel voorkomende bacteriën te kweken. Door antagonistische werkingen zouden wel eens enige soorten in de verdrukking kunnen komen. En zelfs indien dit gelukt zou zijn, blijft het nog de vraag, of er dan onder de in de kunstmatige voedingsbodem heersende omstandigheden nog wel vorming van RDE zou plaats hebben. Van allerlei stammen van *V. cholerae* is het toch bekend, dat de RDE-productie na een zeker tijdsverloop pas zijn maximum bereikt. Ook als men uit het speeksel bacteriën zou isoleren, die op de voedingsbodem RDE zouden kunnen produceren, zou hier nog niet mee bewezen zijn, dat het eventueel voorkomende speeksel RDE van deze stammen afkomstig was, want ook dan zou men nog niet

zeker weten, in welke mate deze bacteriën in de mondholte groeiden en daar de kans kregen RDE te produceren. Wij hebben zelf over de herkomst van het speeksel RDE geen verdere onderzoekingen verricht.

In de loop der jaren is er wel van een aantal microorganismen bekend geworden, dat ze in staat zijn dit enzym te vormen.

Indien men zich echter realiseert, hoeveel cholera-vibrionen er in de cultures gegroeid waren, waaruit wij ons RDE verkregen, dan kan men zich moeilijk voorstellen, dat de daarmee vergeleken zeer geringe hoeveelheid bacteriën in de mondholte in staat zou zijn een aantoonbare hoeveelheid RDE te produceren, laat staan, dat deze in voldoende concentratie terecht zou komen in de binnen een vrij kort tijdsbestek langstromende hoeveelheid speeksel van de voor onderzoek te produceren portie.

Voor het in speeksel aangetroffen „bloedgroepenferment” van SCHIFF kon inderdaad aangetoond worden, dat het in het menselijke lichaam zelf voorkwam, ofschoon het ook door bacteriën gevormd kon worden.

Al hadden de bovengenoemde proeven van JUNGBLUT, zoals aangegeven werd, slechts een beperkte waarde, toch zijn wij op grond van de negatieve uitkomsten daarvan en nog meer op grond van onze hierboven gegeven beschouwing, geneigd, aan te nemen, dat het in het speeksel voorkomende RDE gevormd wordt door het menselijke lichaam.

Nadat op de vorige bladzijden aannemelijk is gemaakt, dat het verdwijnen van het vermogen der O-erythrocyten door Columbia SK-virus geagglutineerd te worden en de vorming van het T-antigeen aan diezelfde cellen op de werking van één enkele stof berusten, zouden we hier nog wat verder op dit verband willen ingaan.

In allerlei proeven bleek er steeds een duidelijke correlatie te bestaan tussen de mate, waarin het vermogen door Columbia SK-virus geagglutineerd te worden was verminderd en er T-antigeenvorming was opgetreden.

Op grond van deze steeds weer opgevallen betrekking werd vermoed, dat de receptorsubstantie voor het Columbia SK-virus aan de erythrocyt identiek was met de stof, waaruit na inwerking van het RDE T-antigeen gevormd werd.

Dat niet alleen het agglutinatievermogen van de erythrocyten verdween onder invloed van RDE, maar ook de receptor vernietigd werd, moge eveneens blijken uit het feit, dat de aldus behandelde cellen niet meer in staat waren het Columbia SK-virus te adsorberen.

Men kan zich nu voorstellen, dat op een bepaald moment, wanneer de werking van het RDE op de erythrocyten juist begonnen is, er nog slechts weinig substraat is omgezet, dat wil zeggen, dat er weinig T-antigeen gevormd is en weinig Columbia SK-virusreceptor

vernietigd is. In dat stadium zouden er nog relatief te weinig Columbia SK-virusreceptoren onwerkzaam kunnen zijn geworden om een waarneembare vermindering van de haemagglutinatie titer te veroorzaken, maar wel zou er dan al zoveel T-antigeen kunnen zijn ontstaan, dat een, weliswaar nog zwakke, agglutinatie door AB-sera optrad.

Zo zou verklaard kunnen worden, waarom we de T-agglutinatie altijd iets eerder zagen optreden dan we het vermogen, door het Columbia SK-virus geagglutineerd te worden, zagen verminderen. Het bepalen van de T-agglutinatie was dus een nauwkeuriger maat voor het opgetreden zijn van geringe veranderingen onder invloed van zwakke RDE werking.

Steun voor de opvatting, dat de Columbia SK-virusreceptorsubstantie identiek is met de stof, waaruit T-antigeen ontstaat, zou ook gevonden kunnen worden in het gedrag van de erythrocyten van een aantal diersoorten tegenover RDE. Muizenerythrocyten bleken niet in staat te zijn Columbia SK-virus te adsorberen. Zij zouden dus geen receptor voor dit virus hebben, dat wil zeggen, geen substantie bezitten, waaruit onder invloed van RDE T-antigeen gevormd kan worden.

Dit laatste nu bleek inderdaad het geval te zijn. Vorming van T-antigeen kon niet vastgesteld worden. Ook werd het RDE niet of nauwelijks geadsorbeerd.

Bij de konijnenerothrocyten was het wat ingewikkelder. Zij konden niet geagglutineerd worden door Columbia SK-virus en ook bleken ze niet zoveel Columbia SK-virus te kunnen adsorberen uit een 1:10 suspensie, dat er met de haemagglutinatiemethode hierin een vermindering van de hoeveelheid virus kon worden aangetoond. Zoals we echter reeds eerder opmerkten, is deze methode vrij grof, en een geringe vermindering van het gehalte aan Columbia SK-virus is op deze wijze niet vast te stellen.

De mogelijkheid, dat konijnenerothrocyten dus toch een weinig Columbia SK-virus kunnen adsorberen, mag niet uitgesloten worden geacht. Dat zou kunnen betekenen, dat deze erythrocyten nog een zeer geringe hoeveelheid Columbia SK-virusreceptorsubstantie bezitten.

Dit zou dan in overeenstemming zijn met het feit, dat vastgesteld kon worden, dat bij konijnenerothrocyten door RDE-inwerking een gering agglutinatievermogen tegenover AB-sera optrad. Er zou dus slechts een beetje T-antigeen gevormd worden. Hiermee in overeenstemming was ook, dat de konijnenerothrocyten een geringe hoeveelheid RDE konden adsorberen.

Bij de schapenerothrocyten werd weer dezelfde duidelijke overeenkomst gevonden tussen het verdwijnen van de ene eigenschap en het optreden van de andere als bij de mensenerothrocyten. Alleen scheen hier het proces enigszins minder gemakkelijk te verlopen.

Dan is er nog de waarneming van FRIEDENREICH, dat met filtraat van J-bacillen behandelde, fijngewreven hersenmassa van een cavia een groot adsorptievermogen ging tonen voor t-agglutinine. Dit betekende dus, dat in genoemd hersenweefsel veel T-antigeen gevormd was en dat er dus volgens onze opvatting veel Columbia SK-virus-receptorsubstantie moet zijn.

Dat dit niet onwaarschijnlijk is, zou ook kunnen blijken uit de grote voorkeur, die het Columbia SK-virus toont voor dit weefsel.

Het gedrag van de rode bloedlichaampjes van de rhesus-aap paste niet zonder meer in deze gedachtengang. Zowel onder invloed van cholerafiltraat als van het speeksel RDE waren ze wel in staat om T-antigeen te vormen en volgens de hierboven verkondigde opvatting zouden ze dus ook Columbia SK-virusreceptor moeten bezitten, maar toen dit onderzocht werd, was het resultaat negatief. Er was noch sprake van agglutinatie door dit virus, noch van aantoonbare adsorptie ervan aan de cellen.

Het is natuurlijk mogelijk, dat door de grofheid van de methode om Columbia SK-virus te bepalen, waaraan reeds aandacht geschonken werd, een vermindering van het gehalte aan virus door wel plaats gehad hebbende adsorptie aan de aandacht ontsnapt is. Het zou ook kunnen zijn, dat, hoewel er inderdaad wel voldoende Columbia SK-virusreceptor was, door bijkomstige factoren geen of slechts geringe adsorptie optrad. Zonder verder onderzoek, vooral met gevoelige methoden, kan naar onze mening dan ook niet gezegd worden, dat het bij deze apenerythrocyten vastgestelde gedrag zonder meer in strijd was met de opvatting, dat Columbia SK-virusreceptorsubstantie en de stof, waaruit T-antigeen gevormd wordt, identiek zijn.

Het moet zeer wel mogelijk geacht worden, dat een nader onderzoek in deze richting nieuwe gezichtspunten zou kunnen opleveren, wat betreft het bestaan van bepaalde constellaties, die de werking der receptoren zouden kunnen beïnvloeden.

Als we nu onze aandacht nog even richten op het proefschrift van DE BAAN, dan vermoeden wij dus, dat de stof, die hij receptorsubstantie noemde, en waarvan hij meende te moeten aannemen, dat ze voorkomt in de receptoren voor de virussen der influenzagroep en der Columbia SK-groep, identiek is met de stof, waaruit T-antigeen gevormd wordt.

Als de hier genoemde opvatting juist is, zou misschien langs de weg van een nader onderzoek van het T-antigeen meer inzicht verkregen kunnen worden in de aard van de receptorsubstantie.

Men kan zich nu afvragen, of het verschil in uitscheiding van „speeksel RDE” tussen de poliomyelitispatienten en de contrôlepersonen oorzaak of gevolg is van de ziekte. Indien dit laatste het geval zou zijn, zou men zich moeten afvragen, waarom dan niet bij alle poliomyelitispatienten in behoorlijke mate „speeksel RDE” werd

uitgescheiden. Dit toch was niet het geval. Ook het feit, dat wij bij een kind, dat tijdens het acute stadium van de ziekte een sterke uitscheiding toonde, 21½ maand later dit verschijnsel nog in precies dezelfde mate aantreffen gedurende een aantal opeenvolgende dagen, pleit naar onze mening niet voor de opvatting, dat de uitscheiding een gevolg zou zijn van de ziekte, tenzij men zou willen aannemen, dat dit verschijnsel lang bestaan bleef.

Het in verschillende mate aanwezig zijn van de stof bij gezonde mensen maakt de tweede veronderstelling wel niet onmogelijk, maar wijst toch in ieder geval op een individueel verschil in het vermogen het enzym uit te scheiden.

Het lijkt ons dan ook waarschijnlijker, dat het vermogen, deze stof in meerdere of mindere mate in het speeksel uit te scheiden, een eigenschap is van bepaalde mensen. Dit verschijnsel kennen we bijvoorbeeld ook bij de uitscheiding van de bloedgroeps substanties. Kinderen zouden dan deze eigenschap, RDE in het speeksel uit te scheiden, in sterkere mate bezitten dan volwassenen, zoals bleek uit ons materiaal.

Na het aannemen van deze veronderstelling, die, naar het ons toeschijnt, minder bezwaren heeft dan de andere, komt dan de vraag naar voren, of en hoe deze bij allerlei mensen aangetroffen eigenschap invloed zou kunnen uitoefenen op de infectie met het poliomyelitisvirus.

Hierover kunnen slechts enkele veronderstellingen uitgesproken worden, daar het feitelijke bewijsmateriaal slechts vaag is, of ontbreekt.

Algemeen wordt thans aangenomen, dat het poliomyelitisvirus via de mondkeelholte en de tractus digestivus het lichaam binnendringt. Hoe vanaf deze plaatsen het virus verder zijn weg in het lichaam vindt, doet hier niet ter zake en zal dan ook verder onbesproken blijven.

Uit de literatuur, die in het 2e hoofdstuk besproken werd, is het bekend, dat sommige mucineachtige stoffen uit de maag in staat zijn een infectie met poliomyelitisvirus, type Lansing, bij muizen te voorkomen. Ook werd een thermostabiele stof in het speeksel van sommige mensen beschreven, die de infectie met Columbia SK-virus bij muizen kon voorkomen. Van deze laatste stof meende men zelfs gevonden te hebben, dat ze door een RDE bevattend speekselmonster vernietigd kon worden. Voor het influenzavirus kon eveneens aangetoond worden, dat mucineachtige stoffen de infectie van proefdieren met sommige stammen wisten te verhinderen en ook hier konden deze beschermende stoffen door het cholerafilteraat worden vernietigd.

Men zou dus kunnen aannemen, dat onder de vele slijmige substanties in de mondholte stoffen voorkomen, die een zekere neutraliserende werking op het poliomyelitisvirus uitoefenen.

Onze eigen proeven toonden aan, dat er in speeksel van allerlei

mensen een stof met grote thermoresistentie voorkwam, die speeksel RDE onwerkzaam kon maken. Verder onderzoek van deze „RDE inhiberende” stof wees er op, dat ze onwerkzaam gemaakt kon worden door cholerafiltraat en misschien ook door speeksel RDE.

Men zou zich derhalve kunnen voorstellen, dat mucoïde substanties in speeksel het poliomyelitisvirus kunnen verhinderen de cellen van de tractus digestivus binnen te dringen, en dat deze stoffen onwerkzaam gemaakt kunnen worden door RDE uit speeksel (en eventueel ook uit cholerafiltraat).

Hiermede zou dan verklaard zijn, waarom onder poliomyelitispatiënten zoveel meer personen gevonden werden, die vrij frequent en in vrij sterke mate RDE in hun speeksel uitscheidde. Bij deze personen zou door het RDE de tegen infectie beschermende stof onwerkzaam worden gemaakt, waardoor de kans op binnendringen van het poliomyelitisvirus groter zou worden. Hoe frequenter en in hoe groter hoeveelheid het RDE gevonden wordt, des te groter zou de kans zijn door poliomyelitis getroffen te worden.

Dat er tussen de verschillende leeftijdsgroepen bij de poliomyelitispatiënten veel minder verschil in uitscheiding van het RDE werd gevonden dan bij gezonden, zou zo verklaard kunnen worden, dat juist die personen, welke speeksel RDE vormen, de klinisch waarneembare verschijnselen van de poliomyelitis tonen.

De gemiddeld frequentere en in sterkere mate optredende uitscheiding van speeksel RDE bij kinderen, zou, naast het meestal geringere gehalte aan antilichamen dan bij volwassenen, een oorzaak kunnen zijn van een grotere ontvankelijkheid van deze groep voor de infectie.

Als we nu aannemen, dat de hierboven opgestelde hypothese over de functie van het speeksel RDE juist is, dan kan men zich afvragen, of deze vondsten ook enige praktische waarde hebben met name voor de prophylaxe van de poliomyelitis.

Volgens deze hypothese zouden namelijk personen, die dit RDE vrij frequent en in meerdere of mindere mate uitscheiden, meer gepredisponeerd zijn om geïnfecteerd te worden met het poliomyelitisvirus, dan zij, die het bovengenoemde vermogen niet bezitten. Wanneer het eens mogelijk zou worden over te gaan tot bescherming tegen deze ziekte, bijvoorbeeld door vaccinatie, zou het wenselijk kunnen zijn hiervoor de meest vatbaren te nemen. Dan zou men naar deze maatstaf bepaalde mensen kunnen selecteren. In de praktijk zou dat echter nog wel enige bezwaren opleveren, daar het op een aantal achtereenvolgende dagen verzamelen van speekselporties vaak op moeilijkheden stuit, terwijl ook de bepaling van de hoeveelheid RDE enige tijd vergt.

Uit het in dit hoofdstuk besprokene moge blijken, dat vele vragen

over de betekenis van het door ons gevonden verschijnsel (het in sterkere mate dan bij gezonden voorkomen van RDE in speeksel van poliomyelitispatienten) nog onvoldoende beantwoord konden worden.

Toch zijn wij ervan overtuigd, dat verdere onderzoekingen naar de wijzen, waarop het poliomyelitisvirus gehinderd kan worden op zijn weg naar de plaats, waar het voor de getroffen en de zeer ernstige en helaas vaak permanente verwoestingen kan aanrichten, dat is in de voorhoorn van het ruggemerg, nog vele mogelijkheden zullen openen voor het voorkomen van deze terecht zo gevreesde ziekte.

VII SAMENVATTING

Een onderzoek werd verricht naar het voorkomen van een factor in menselijke speeksels, die in staat was het vermogen van sommige erythrocyten door Columbia SK-virus geagglutineerd te worden, teniet te doen.

In het literatuuroverzicht werden in het kort een aantal onderwerpen besproken, namelijk:

1. het optreden van een abnormale agglutinabiliteit van de erythrocyten.
2. het verschijnsel van de haemagglutinatie door de virussen der influenzagroep en stoffen, die invloed daarop uitoefenen.
3. het Columbia SK-virus.
4. bestanddelen van menselijk speeksel en hun betekenis bij infecties.

Vervolgens werden de in de experimenten gebruikte materialen besproken en er werd een beschrijving gegeven van enige vaak toegepaste werkwijzen. Daarbij werd vooral ingegaan op de wijze van berekening van de sterkte van de werkzame factor (voorlopig door ons X-factor genoemd), in de onderzochte speekselmonsters.

De op die manier gevonden getallen stelden ons in staat met zekere beperkingen, de werkzaamheid der diverse speekselporties te vergelijken.

De speeksels van 111 personen werden onderzocht; van deze personen waren er 64 lijdende aan poliomyelitis, hiervan toonden er 47 duidelijke verschijnselen van de kant van het centrale zenuwstelsel, terwijl 27 van hen slechts symptomen ener lymphocyttaire meningitis hadden. Van de overige 47 personen waren er 35 geheel gezond, terwijl 12 leden aan diverse ziekten.

In tabel 5 (blz. 27), waarin een overzicht van deze mensen gegeven werd, is ook een onderverdeling naar een aantal leeftijdsgroepen gemaakt.

Van de meeste personen werden 8 à 10 speekselporties, zoveel mogelijk op achtereenvolgende dagen verkregen, onderzocht.

Bij enige personen werd gedurende langere tijd het verloop van het gehalte aan X-factor der speekselporties bestudeerd. Daarbij bleek, dat er van dag tot dag wisselingen optraden, zonder dat er daarbij van enige regelmaat sprake was.

Verder bleek bij het overzien van de verkregen resultaten, dat

er individueel ook sterkere verschillen in uitscheiding van de werkzame stof bestonden.

Bij een groep van 12 normale kinderen werd gedurende een bepaalde periode het speeksel onderzocht en nagegaan werd, of er misschien een overeenkomst bestond in het verloop van de sterkten van de X-factor in de diverse porties. Inderdaad viel er bij enige van deze kinderen in het begin der periode een daling op, die tegen het einde weer gevolgd werd door een stijging van het gehalte aan X-factor.

Toen nagegaan werd, hoe de barometerstanden geweest waren gedurende de dagen, waarop de speeksels van die kinderen onderzocht werden, bleek, dat de gevonden daling met de daarbij aansluitende stijging met enige dagen vertraging gevolgd was op eenzelfde verloop van de barometerstanden.

Uit de verrichte experimenten bleek verder, dat er geen enkel verschil in uitscheiding van de X-factor bestond tussen gezonde mensen en de 12 lijders aan diverse ziekten (poliomyelitis niet inbegrepen).

Daarom werden deze verder als één groep beschouwd. Binnen deze groep was er wel een duidelijk verschil tussen kinderen en volwassenen; de eersten scheidten gemiddeld meer X-factor uit en bij hen was ook het aantal volledig negatieve (wat betreft de X-factor) speekselporties gemiddeld geringer. Binnen de groep der poliomyelitispatienten kon dit leeftijdsverschil niet gevonden worden. In deze laatste groep werd ook geen verschil vastgesteld tussen patienten met aandoeningen van het centrale zenuwstelsel en hen, die slechts de verschijnselformen ener lymphocyttaire meningitis hadden.

Toen binnen iedere leeftijdsgroep, waarvan bij een voldoende aantal personen het speeksel onderzocht was, werd nagegaan, of er verschil bestond tussen de poliomyelitispatienten en de contrôlepersonen, bleek dit overal het geval te zijn. De eersten scheidten gemiddeld meer werkzame stof uit in het speeksel en het gemiddelde aantal negatieve porties was bij hen geringer.

Deze conclusies konden ook door een statistische berekening bevestigd worden.

Bij onderzoek naar de eigenschappen van de werkzame stof in het speeksel bleek, dat de erythrocyten door de inwerking van de X-factor niet alleen hun vermogen, door Columbia SK-virus geagglutineerd te worden, verloren hadden, maar ook, dat zij niet meer in staat waren het virus te adsorberen.

Verder bleek, dat de 0-erythrocyten „panagglutinabel” waren geworden, dat wil zeggen, zij agglutineerden met sera van mensen behorende tot de bloedgroep AB (AB-sera). Deze agglutinatie bleek bij nader onderzoek te berusten op de vorming van hetzelfde antigeen als dat, hetwelk door de inwerking van cholerafiltraat aan de oppervlakte van deze cellen kan ontstaan. We hadden hier dus te

maken met het zogenaamde phenomeen van THOMSEN-FRIEDENREICH. Hierbij wordt het zogenaamde T-antigeen gevormd, dat de aldus veranderde erythrocyten agglutinabel maakt voor alle sera, die het t-agglutinine (anti-T) bevatten.

Er kon een volledige overeenstemming worden vastgesteld tussen het verdwijnen der Columbia SK-agglutinabiliteit en het verschijnen van het T-antigeen aan de erythrocyten.

De X-factor bleek eerst geadsorbeerd te worden aan de cellen, enige tijd daarna trad de verandering op en langzamerhand kwam de X-factor weer vrij, terwijl de verandering voltooid werd. De X-factor werd dus niet in het reactieproduct opgenomen.

Het bleek, dat er bij 4° C. minder omzetting optrad dan bij kamertemperatuur of 37° C.

Het werkzame principe was thermolabiel; een half uur blootstellen aan 50° C. werd meestal niet meer verdragen, terwijl een temperatuur van 56° C. reeds na 5 minuten de factor bijna geheel vernietigde.

Bewaren van een X-factor bevattend speekselmonster bij kamertemperatuur bleek na 1 week het gehalte aan deze stof niet noemenswaard te hebben veranderd. Wanneer de speekselmonsters bij — 20° C. ingevroren werden, behielden ze zeker een half jaar lang hun werkzaamheid.

Wat de invloed van de waterstofionenconcentratie betreft, bleek de factor binnen het gebied van pH 4 tot pH 9 stabiel te zijn. Beneden pH = 4 scheen de X-factor in werkzaamheid terug te lopen.

Centrifugatie op 40.000 toeren per minuut deed de X-factor neerslaan.

Niet alleen werd onderzocht, hoe de X-factor zich gedroeg tegenover menselijke erythrocyten, maar ook werd nagegaan, wat zijn invloed was op de erythrocyten van een aantal diersoorten (schaap, muis, konijn, rhesusaap).

Tussen schapenerythrocyten en mensenerythrocysten was slechts een gering quantitatief verschil.

Muizenerythrocyten, die noch geagglutineerd konden worden door Columbia SK-virus, noch dit virus konden adsorberen, bleken ook niet in staat te zijn X-factor te adsorberen en vormden evenmin T-antigeen.

Konijnenerythrocysten toonden slechts een zeer zwakke werkzaamheid vergeleken met schapen- of mensenerythrocysten.

De erythrocyten van de rhesusaap, die Columbia SK-virus niet konden adsorberen en er ook niet mee konden agglutineren, adsorbeerden wel X-factor en vormden ook wel T-antigeen.

Een overzicht van de met de erythrocyten van deze 4 diersoorten verkregen resultaten werd gegeven in tabel 32 (blz. 59).

Eveneens werd een onderzoek ingesteld naar het gebeuren, indien

de speekselparties van verschillende personen met elkaar gemengd werden. Hierbij bleek, dat sommige speeksels, vooral die van personen, die nooit X-factor met hun speeksel uitscheidden, in staat waren de X-factor werkzaamheid van andere speekselparties te niet te doen.

Deze inhiberende functie berustte op een thermostabiele stof.

Verder onderzoek van dit verschijnsel deed vermoeden, dat de „X-factor inhibitor” door het receptorenvernietigende enzym (RDE) uit cholerafiltraat onwerkzaam gemaakt kon worden en misschien ook door de X-factor zelve, mits het contact lang genoeg duurde.

Ook werd nagegaan, of er een identiteit was tussen het zogenaamde bloedgroepsuubstantievernietigende ferment en de X-factor. Deze kon niet worden vastgesteld.

Tenslotte kon aangetoond worden, dat noch Columbia SK-virus, noch „klassieke” poliomyelitisstammen 0-erythrocyten „panagglutina-bel” konden maken. In dit opzicht bleek dus ook niets van een enzymwerking in de bovenvermelde zin op de erythrocyten.

Bij de bespreking van de verkregen resultaten werd aannemelijk gemaakt, dat de X-factor een enzym was, identiek met dat, hetwelk voorkomt in cholerafiltraat, waarmee ook een aantal experimenten werd verricht, en in filtraten van cultures van andere bacteriën. Daarom werd de X-factor verder aangeduid als „speeksel RDE”, naar analogie van dezelfde stof in het cholerafiltraat, die door BURNET c. s. RDE werd genoemd.

In aansluiting daaraan werden enige gedachten ontwikkeld over het verband tussen de vorming van het T-antigeen en het verdwijnen der Columbia SK-agglutinabiliteit. Het vermoeden werd uitgesproken, dat de Columbia SK-virusreceptor aan de erythrocyten identiek is met het substraat, waaruit T-antigeen gevormd wordt onder invloed van RDE.

Op grond van de resultaten der eigen proefnemingen en van hetgeen door anderen medegedeeld is, werd een hypothese opgesteld over de betekenis van het in sterkere mate voorkomen dan bij gezonden van dit zogenaamde speeksel RDE bij poliomyelitispatienten en het mechanisme, dat hier in het spel zou kunnen zijn.

Er werd aannemelijk gemaakt, dat het vermogen, RDE in meerdere of mindere mate in het speeksel uit te scheiden, een constitutionele eigenschap is. Mucoïde stoffen in speeksel zouden volgens deze opvatting poliomyelitisvirus in speeksel onwerkzaam, respectievelijk minder werkzaam kunnen maken; deze mucoïde stoffen zouden vernietigd kunnen worden door speeksel RDE. Dit zou kunnen verklaren, waarom deze stof in sterkere mate door poliomyelitispatienten werd uitgescheiden, en waarom hier ook het leeftijdsonderscheid in uitscheidingssterkte was verdwenen.

Tenslotte werd gewezen op het belang van het onderzoek naar de wijze, waarop het poliomyelitisvirus, na binnendringen in het lichaam, verhinderd kan worden de voorhoornellen van het ruggemerg te bereiken.

SUMMARY

An inquiry was made into the occurrence of a factor in human salivas being able to destroy the property of some erythrocytes of becoming agglutinated by Columbia SK-virus.

In the survey of the literature a number of subjects were briefly discussed, viz.

1. the occurrence of abnormal agglutinability of the erythrocytes.
2. the phenomenon of the hemagglutination by the viruses of the influenza group and principles exercising influence on it.
3. the Columbia SK-virus.
4. components of human saliva and their significance in case of infections.

Further the materials used for the experiments were discussed and a description given of a few often applied methods. Especially the manner of calculating the value of the factor (provisionally called by us X-factor) acting in the samples of saliva examined.

The figures found in this way enabled us, with certain restrictions, to compare the activity of the various samples of saliva.

The salivas of 111 persons were examined; 64 of them suffered from poliomyelitis, of whom 47 showed clear symptoms caused by lesions in the central nervous system, whereas 27 of them only showed symptoms of a lymphocytic meningitis. Of the other 47 persons 35 were quite healthy, and 12 suffered from various diseases.

In table 5 (page 27) giving a survey of these examined persons, also a subdivision is made with respect to a number of age groups.

Of most subjects 8 or 10 samples of saliva, as much as possible obtained on consecutive days, were examined. For a few of them, however, during a somewhat longer period the trend of the doses of X-factor in the samples of saliva was studied. From this it appeared, that from day to day there occurred variations without any regularity could be stated.

Further it appeared on checking the results obtained that individually great differences in secretion of the active principle could be observed.

For a group of 12 normal children during a certain period the salivas were examined to find out, if there might be an agreement

between the trends of the doses of X-factor in the various samples.

In fact in some of these children in the beginning of the period a decrease was stated, which, towards the end, was followed by an increase of the dose of X-factor.

When the heights of the barometer were compared for the days, on which the salivas of these children were examined, it was found that the decrease stated with the subsequent increase corresponded with the same trend of the heights of the barometer with a few days' interval.

It further appeared from the experiments made that there did not exist any difference in secretion of the X-factor in healthy subjects and the 12 patients suffering from various diseases, poliomyelitis not included.

Therefore they were further considered as one group. Within this group there was a marked difference between children and adults though; the former secreted on an average more X-factor and in them also the number of completely negative samples of saliva (with respect to the X-factor) was on an average smaller. Within the group of the poliomyelitis patients this difference in age could not be found. In the latter group there could not be stated either a difference between patients with lesions of the central nervous system and those only showing symptoms of lymphocytic meningitis.

When within each age group of which for a sufficient number of subjects the salivas had been examined, we tried to find out, whether there was a difference between the poliomyelitis patients and the controls, this appeared to be the case without any exception. The former secreted on an average more active principle in their salivas and the average number of negative samples was smaller for them.

These conclusions could also be confirmed by statistical calculation.

On inquiring into the properties of the active principle in the saliva it appeared that owing to the X-factor working on them the erythrocytes had not only lost their property to be agglutinated by Columbia SK-virus, but that they were not able either to adsorb the virus any longer.

It further appeared, that the 0-erythrocytes had become "pan-agglutinable", that means, they agglutinated with sera of people belonging to the bloodgroup AB (AB-sera). On further examination this agglutination proved to be based on the forming of the same antigen as what can arise on the surface of these cells through the action of cholera filtrate. So in this case we had to deal with the so-called "phenomenon of THOMSEN-FRIEDENREICH".

Then the so-called T-antigen is formed, by which the changed erythrocytes can agglutinate with nearly all human sera, these nearly all possessing t-agglutinin (anti-T).

It could be stated, that there exists a parallelism between the

disappearance of the Columbia SK-agglutinability and the appearance of the T-antigen on the erythrocytes.

The X-factor appeared first to be adsorbed on the cells, some time later the change set in and gradually the X-factor came free, while the changes were completed. So the X-factor did not become a part of the reaction product.

It proved, that at 4° C. less transformation occurred than at roomtemperature or at 37° C.

The active principle was thermo-labile; mostly it could not stand being exposed to 50° C. for half an hour, a temperature of 56° C. being very detrimental after five minutes already.

Keeping a sample of saliva containing X-factor at roomtemperature appeared practically not to have changed the quantity of this principle after one week. When the samples of saliva were frozen at minus 20° C., they remained active for at least six months.

As regards the influence of the hydrogen ion concentration, the factor proved to be stable within the pH 4—pH 9 range. Below pH = 4 it seemed as if the X-factor was losing its activity.

Centrifugation at 40.000 rotations pro minute (r. p. m.) caused the X-factor to be found in the sediment.

It was not only examined how the X-factor behaved towards human erythrocytes, but also investigated, what its influence was on the erythrocytes of a number of species of animals (sheep, mouse, rabbit, rhesusmonkey).

Between erythrocytes of sheep and man there existed only a small quantitative difference.

Erythrocytes of mice, which could neither be agglutinated by Columbia SK-virus, nor could adsorb this virus, appeared not to be able to adsorb X-factor either, nor could they form T-antigen.

Rabbit erythrocytes showed but a very low activity compared to the erythrocytes of sheep or man.

The erythrocytes of the rhesusmonkey, which could not adsorb Columbia SK-virus and could not agglutinate with it either, did adsorb X-factor and also formed T-antigen.

A survey of the results obtained with the erythrocytes of these 4 species of animals was given in table 32 (page 59).

An inquiry was made into what happened if the samples of saliva of different persons were mixed. It appeared that some salivas, especially of those people, who never secreted X-factor with their saliva, could destroy the activity of the X-factor of other samples of saliva.

This inhibiting function was based on a thermostable principle.

Further investigation of this phenomenon led to the supposition that the X-factor "inhibitor" could be inactivated by the receptor

destroying enzyme of cholera filtrate and perhaps also by the X-factor itself, provided the contact lasted long enough.

It was also investigated, if identity existed between the so-called bloodgroup substance destroying ferment and the X-factor. This could not be stated. Finally it could be proved, that neither Columbia SK-virus nor classical poliomyelitis strains could make 0-erythrocytes "panagglutinable". In this respect, therefore, there was no indication either of enzyme activity on erythrocytes in the above sense.

With the discussion of above mentioned results it was made plausible that the X-factor was an enzyme identical with that occurring in cholera filtrate, with which also a number of experiments were made, and in filtrates of cultures of other bacteria. Therefore the X-factor was further indicated as "saliva RDE", analogous to the same principle in cholera filtrate called by BURNET c.s.: RDE.

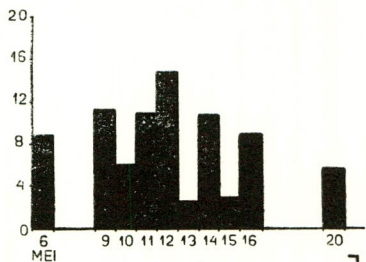
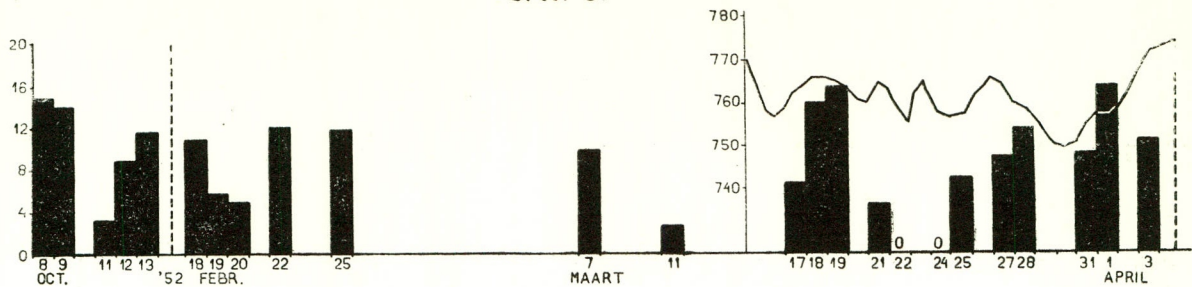
Subsequent to this some reflections were given on the connection between the forming of the T-antigen and the disappearing of the Columbia SK-agglutinability. It was presumed that the Columbia SK-receptor on the erythrocytes might be identical with the substrate from which T-antigen was formed under the influence of RDE.

Based on the results of our own experiments and those of others a hypothesis was given about the significance of the more frequent occurrence of this so-called saliva RDE in poliomyelitis patients than in healthy subjects and about the possible mode of action.

The property of secreting to a certain degree RDE in the saliva being "constitutional" was made acceptable. Mucoid substances in saliva, according to this conception, would be able to make poliomyelitis virus in saliva inactive, respectively less active; it would be possible for these substances to be destroyed by saliva RDE. This could explain, why this substance is to a higher degree secreted by poliomyelitis patients and why in this case also an age distinction with respect to degree of secretion has disappeared.

Finally attention is drawn to the importance of the inquiry into the manner in which the poliomyelitis virus after penetrating into the body can be prevented from reaching the cells of the anterior horn of the spinal cord.

C.W. J.



J.D. V.

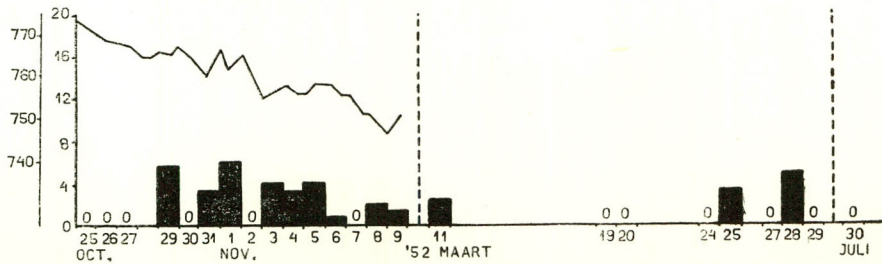


Fig. 1a

STELLINGEN

STELLINGEN

I.

De „panagglutinabiliteit” van erythrocyten kan veroorzaakt worden door bacteriën of virussen; indien er niet zulk een oorzaak voor dit verschijnsel gevonden kan worden, verdient het aanbeveling na te gaan, of misschien in het bloed voorkomend RDE dit verschijnsel teweeggebracht zou kunnen hebben.

II.

De productie van antilichamen heeft plaats in reticulo-endothelcellen, die zich gedurende dit proces ontwikkelen tot plasmacellen.

III.

Het is niet langer verantwoord, personen, behorende tot de bloedgroep O, als „universele” donores te beschouwen.

IV.

Het is waarschijnlijk, dat bij de verhindering van de serologische reactie door haptenen dezelfde regels gevonden zullen worden als bij de competitieve remming van enzymen door substraatanalogen.

V.

Toediening van chloromycetine mag slechts geschieden onder nauwkeurige contrôle van het bloedbeeld.

VI.

Daar langdurig verblijf in ziekenhuis of inrichting voor het kind nadelige invloed kan hebben op de geestelijke ontwikkeling, moet de oefentherapie van het poliomyelitispatientje zo mogelijk in eigen omgeving plaats hebben.

VII.

Het is waarschijnlijk, dat het „syndroom van Guillain-Barré” berust op een allergische aandoening van het zenuwstelsel.

VIII.

Met het oog op het complementgehalte van bloed moet grote voorzichtigheid betracht worden bij het toepassen van bloedtransfusies bij patienten, lijdende aan paroxysmale koude haemoglobinurie.

IX.

Indien het stelsel van vaccinatie*drang* (inentingwet 1939) niet zou leiden tot een toestand, waarbij de bevolking in *alle* delen van Nederland op bevredigende wijze tegen pokken beschermd is, verdient het aanbeveling over te gaan tot een directe vaccinatie*wang* met beperkte mogelijkheden tot vrijstelling.

X.

Hulp aan onderontwikkelde gebieden met het doel de volksgezondheid aldaar te verbeteren, zal in het algemeen slechts doeltreffend kunnen zijn, indien ze verleend wordt in het kader van een welvaartsplan, waarbij eveneens aandacht besteed wordt aan de culturele, economische en sociale verheffing van de desbetreffende bevolking.

XI.

Verkregen haemolytische anaemieën kunnen ook berusten op veranderingen, die de erythrocyten door een virus hebben ondergaan.

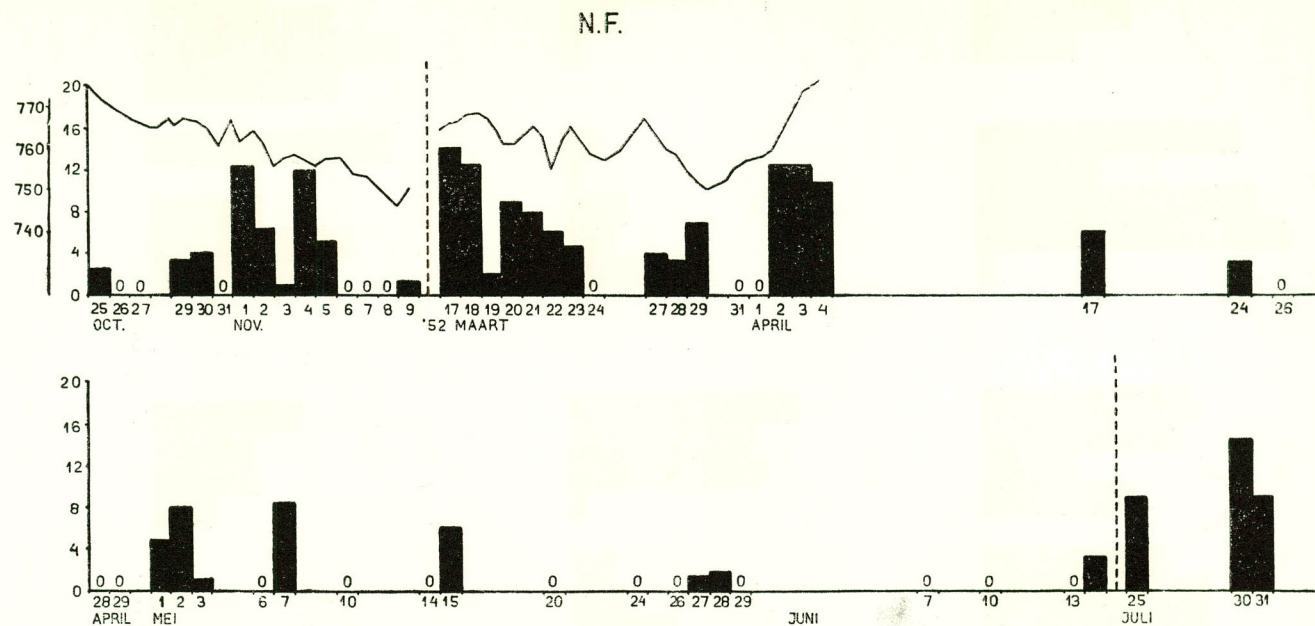


Fig. 1b

Voorkomen van de X-factor in het speeksel van enige personen gedurende een bepaald tijdsverloop. De zwarte blokken geven de sterkte aan van de op de genoemde dagen verkregen speekselmonsters. De zwarte lijn toont het verloop van de barometerstanden gedurende een aantal dagen.

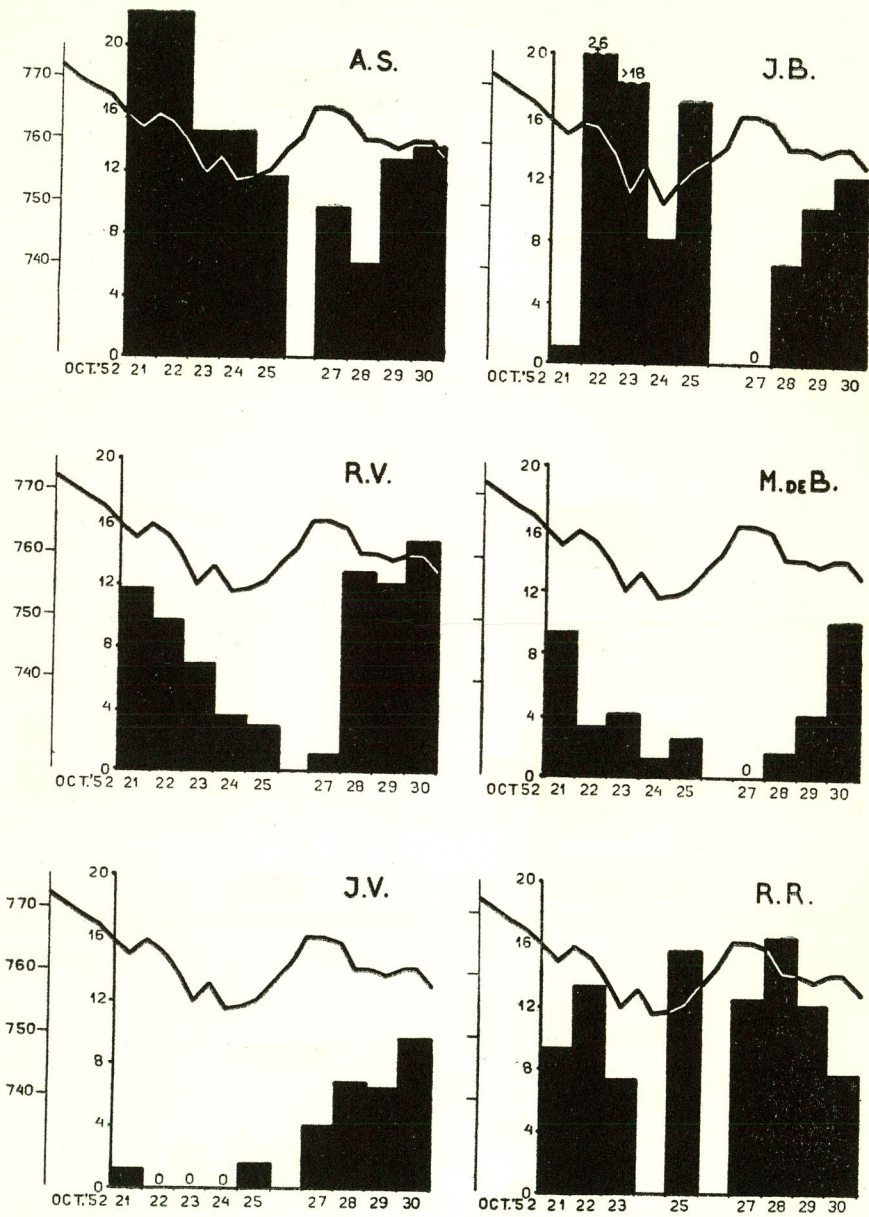


Fig. 2a

Voorkomen van de X-factor in het speeksel van 12 normale kinderen, gedurende een bepaalde periode en verloop van de barometerstanden gedurende dezelfde tijd.

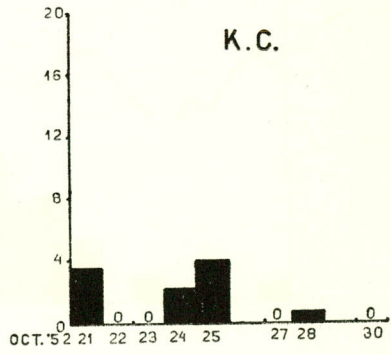
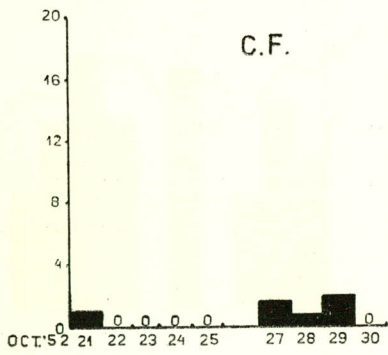
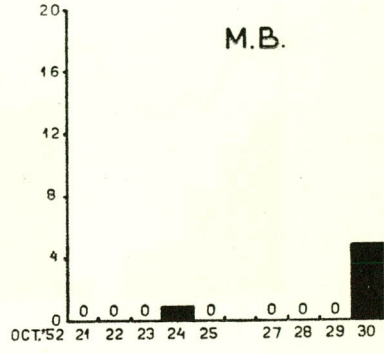
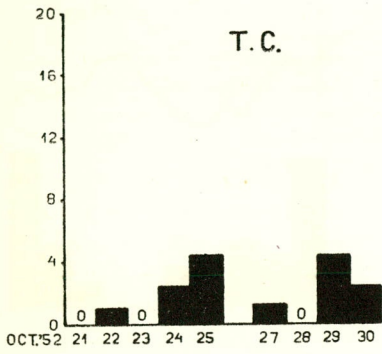
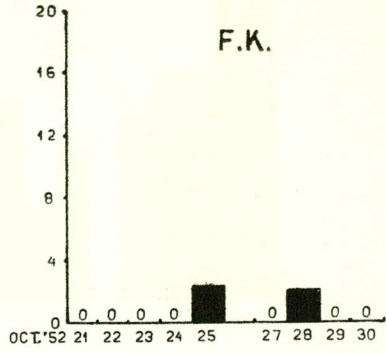
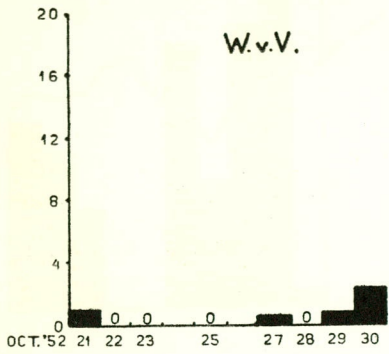


Fig. 2b

LITERATUUR

1. ADA, G. L. en FRENCH, E. L.: — I. c. BURNET, F. M.: *Physiol. Rev.* 31: 131 (1951).
2. ANDERSON, S. G.: *Austr. J. exp. Biol. & med. Sc.* 26: 347 (1948).
3. ANDERSON, S. G., BURNET, F. M., FAZEKAS DE ST. GROTH, S., MC. CREA, J. F. en STONE, J. D.: *Austr. J. exp. Biol. & med. Sc.* 26: 403 (1948).
4. ARMSTRONG, CH.: *Am. J. Publ. Health* 40: 1296 (1950).
5. DE BAAN, P.: *Haemagglutinatie door neurotrope virussoorten.* Ac. proefschrift - Leiden. Uitg.: Stenfert Kroese, Leiden 1950.
6. BELLER, K. en KELLER, W.: *Kl. Wochenschrift* 27: 422 (1949).
7. BIELING, R.: *Oesterreichische Mikrobiologen Tagung - Salzburg 1950.*
8. BREMER, A. en MUTSAARS, W.: *C. R. Soc. Biol.* 142: 1194 (1948).
9. BÖNICKE, R., REIF, W. en ARNDT, J.: *Z. Hyg.* 135: 252 (1953).
10. BORTELS, H.: *Zentrallbl. f. Bakt. Abt. II.* 105: 305 (1942).
11. DEN BURGH, P. M., YU-PEN-CHUNG, HOWE C. en BOVARNICK, M.: *J. exp. Med.* 87: 1 (1948).
12. BURNET, F. M.: *Austr. J. exp. Biol. & med. Sc.* 20: 81 (1942).
13. BURNET, F. M., MC. CREA, J. F. en STONE, J. D.: *Br. J. exp. Path.* 27: 228 (1946).
14. BURNET, F. M. en MC. CREA, J. F.: *Austr. J. exp. Biol. & med. Sc.* 24: 277 (1946).
15. BURNET, F. M. en ANDERSON, S. G.: *Austr. J. exp. Biol. & med. Sc.* 25: 213 (1947).
16. BURNET, F. M.: *Austr. J. exp. Biol. & med. Sc.* 26: 371 (1948).
17. BURNET, F. M.: *Austr. J. exp. Biol. & med. Sc.* 26: 381 (1948).
18. BURNET, F. M.: *Austr. J. exp. Biol. & med. Sc.* 26: 389 (1948).
19. BURNET, F. M.: *Lancet* 154: 7 (1948).
20. BURNET, F. M.: *Physiol. Rev.* 31: 131 (1951).
21. BURNET, F. M.: *Austr. J. exp. Biol. & med. Sc.* 30: 251 (1952).
22. CHASE, M. W.: *J. Bact.* 36: 383 (1938).
23. CLELLAND, L. MC. en HARE, R.: *Canad. J. publ. Health* 32: 530 (1941).
24. DAVIDSOHN, I. en TOHARSKY, B.: *J. inf. Dis.* 67: 25 (1940).
J. Imm. 43: 213 (1942).

25. DICK, G. W. A., SMITHBURN, K. C.
en HADDOW, A. J.: Br. J. exp. Path. 29: 547 (1948).
26. DICK, G. W. A.: Br. J. exp. Path. 29: 559 (1948).
27. DICK, G. W. A.: J. Imm. 62: 375 (1949).
28. DOLD, H. en WEIGMANN, F.: Z. Hyg. 116: 158 (1934).
29. DOLD, H., LÄCHELE, W. en
DU DSCHENG HSING: Z. Hyg. 118: 369 (1936).
30. DOLD, H., WIZEMANN, E. en
KLEINEN, C.: Z. Hyg. 119: 525 (1937).
31. DOLD, H.: Z. Hyg. 124: 519 (1942).
32. DOLD, H.: Z. Hyg. 124: 579 (1942).
33. DOLD, H.: Z. Hyg. 127: 296 (1947).
34. FAZEKAS DE ST. GROTH, S.: Austr. J. exp. Biol. & med. Sc. 26:
29 (1948).
35. FAZEKAS DE ST. GROTH, S.: Austr. J. exp. Biol. & med. Sc. 26:
271 (1948).
36. FLEMING, A. en ALLISON, V. D.: Lancet 206: 1303 (1924).
37. FRANCIS, T.: J. exp. Med. 85: 1 (1947).
38. FRANCIS, T. en MINUSE, E.: Proc. Soc. exp. Biol. & Med. 69: 291
(1948).
39. FRIEDENREICH, V. en THUNE
ANDERSEN, T.: Acta path. & microbiol. scand. 6: 236
(1929).
40. FRIEDENREICH, V. en MUNCK, J.: Acta path. & microbiol. scand. 7: 117
(1930).
41. FRIEDENREICH, V.: The Thomsen Hemagglutination Phe-
nomenon.
Ac. proefschrift - Kopenhagen. Uitg.:
Levin & Munksgaard - Kopenhagen
1930.
42. GAFFNEY, J. C. en SACHS, H.: J. Path. & Bact. 55: 589 (1943).
43. GOTTSCHALK, A. en LIND, P. E.: Br. J. exp. Path. 30: 85 (1949).
44. GREEN, R. H. en WOOLLEY, D. W.: J. exp. Med. 86: 55 (1947).
45. GREENFIELD, G.: Z. Imm. Forschung 56: 107 (1928).
46. HALLAUER, C.: Proc. 4th Int. Congr. Microbiol. 257.
Kopenhagen 1947; 1949.
47. HALLAUER, C.: Arch. f. ges. Virusforschung 4: 224
(1951).
48. HARTMANN, GR.: Groupantigens in human organs.
Ac. proefschrift - Kopenhagen. Uitg.:
E. Munksgaard - Kopenhagen 1941.
49. HENNINGSEN, K.: Act. path. & microbiol. scand. 26: 339
(1949).
50. HIRST, G. K.: Science 94: 22 (1941).
51. HIRST, G. K.: J. exp. Med. 76: 195 (1942).
52. HORVATH, B. en JUNGEBLUT, C. W.: J. Imm. 68: 627 (1952).
53. HUEBENER, G.: Z. Imm. Forschung 45: 223 (1926).
54. IGNATIUS, A.: Z. Hyg. 118: 445 (1936).
55. JUNGEBLUT, C. W.: Proc. Soc. exp. Biol. & Med. 32: 1534
(1935).
56. JUNGEBLUT, C. W. en SANDERS, M.: J. exp. Med. 72: 407 (1940).
57. JUNGEBLUT, C. W. en DALLDORF, G.: Am. J. Publ. Health 33: 169 (1943).
58. JUNGEBLUT, C. W.: A. M. A. Arch. of Path. 52: 18 (1951).
59. JUNGEBLUT, C. W., HORVATH, B.
en KNOX, A. W.: Arch. Ped. 69: 321 (1952).

60. JUNGEBLUT, C. W.: persoonlijke mededelingen.
Human Biochemistry p. 181 e.v. Uitg.:
Mosby—St. Louis - 1945.
61. KLEINER, I. S.: Z. f. Kinderheilkunde 68: 138 (1950).
persoonlijke mededelingen.
62. KOCH, F.: J. inf. Dis. 80: 201 (1947).
63. KRET, A.: Z. Imm. Forschung 66: 175 (1930).
64. LAWSON, R. B. en MELNICK, J. L.: Science 102: 117 (1945).
65. LEHRS, H.: Austr. J. exp. Biol. & Med. Sc. 25:
127 (1947).
66. LEVENS, J. H. en ENDERS, J. F.: Austr. J. exp. Biol. & Med. Sc. 26:
355 (1948).
67. MC. CREA, J. F.: Undersøgelser over en gruppe actino-
myceter, isolerede fra menneskets
svaelg.
Ac. proefschrift - Kopenhagen 1936.
68. MC. CREA, J. F.: J. exp. Med. 84: 535 (1946).
69. MAGNUS, R. VON: J. Imm. 53: 157 (1946).
70. MAYER, M. M., OSLER, A. G., Federation Proc. 7: 308 (1948).
71. BIER, O. G. en HEIDELBERGER, M.: Bact. Rev. 14: 233 (1950).
72. MELNICK, J. L.: Br. J. exp. Path. 25: 5 (1944).
73. MELNICK, J. L. en WARD, R.: Br. J. exp. Path. 32: 34 (1951).
74. MELNICK, J. L.: Science 111: 717 (1950).
75. MORGAN, W. T. J. en v. HELJNINGEN, R.: C. R. Soc. Biol. 146: 1394 (1952).
76. MORGAN, W. T. J. en WATKINS, W. M.: J. inf. Dis. 59: 11 (1936).
77. MOSKOWITZ, M. en TREFFERS, H. P.: Proc. Soc. exp. Biol. & Med. 71: 719
(1949).
78. NUNGESTER, W., JOURDOUNAIS, L. F. en WOLFF, A. A.: Br. J. exp. Path. 33: 196 (1952).
79. OLITZKY, P. K. en YAGER, R. H.: Maandschr. v. Kindergeneeskunde 20:
231 (1952).
80. POTTERFIELD, B. M.: J. of Clin. Path. 5: 266 (1952).
81. REEFMAKER, J.: Z. Imm. Forschung 77: 101 (1932).
82. SASAKI, H.: Z. Imm. Forschung 48: 414 (1926).
83. SCHIFF, F. en HALBERSTAEDTER, W.: Ueber die gruppenspezifischen Sub-
stanzen des menschlichen Körpers. p.
38. Uitg.: Fischer - Jena 1931.
84. SCHIFF, F.: Biochem. Ztschr. 235: 454 (1931).
ibid. 239: 489 (1931).
85. SCHIFF, F. en WEILER, G.: Münch. Med. Wschr. 78: 657 (1931).
86. SCHIFF, F. en AKUNE, M.: Kl. Wschr. 14: 710 (1935).
87. SCHIFF, F. en BURON, F. A.: Kl. Wschr. 14: 750 (1935).
88. SCHIFF, F.: Am. J. Path. 24: 97 (1948).
89. SCHMIDT, E. C. H.: Kl. Wschr. 13: 1640 (1934).
90. SIEVERS, O.: J. clin. Inv. 26: 1197 (1947).
91. SMADEL, J. E. en WARREN, J.: J. Path. & Bact. 61: 456 (1949).
92. STEWART, F. S.: Z. Imm. Forschung 76: 159 (1932).
93. STIMPFL, A.: Austr. J. exp. Biol. & Med. Sc. 25:
137 (1947).
94. STONE, J. D.: Austr. J. exp. Biol. & Med. Sc. 26:
49 (1948).
95. STONE, J. D.:

96. STONE, J. D.: Austr. J. exp. Biol. & Med. Sc. 26: 287 (1948).
97. TAMM, I. en HORSFALL, F. L.: Proc. Soc. exp. Biol. & Med. 66: 99 (1947).
98. THOMSEN, O.: C. R. Soc. Biol. 96: 556 (1927).
Z. Imm. Forsch. 52: 85 (1927).
ibid. 57: 301 (1928).
99. TOOMEY, J. A. en TAKACS, W. S.: Proc. Soc. exp. Biol. & Med. 47: 123 (1941).
J. Bact. 43: 87 (1942).
100. TOPLEY, W. W. C. en WILSON, G. S.: Principles of Bacteriology and Immunology p. 1986. Uitg. Williams & Wilkins - Baltimore 1946.
101. TRASK, J. D., VIGNEC, A. J. en PAUL, J. R.: Proc. Soc. exp. Biol. & Med. 38: 147 (1938).
102. VERLINDE, J. D. en DE BAAN, P.: Ann. Inst. Past. 77: 632 (1949).
103. VERLINDE, J. D. en VAN TONGEREN, H. A. E.: in druk.
104. VIVELL, O.: 51. Tagung der D. Ges. f. Kinderheilkunde - Heidelberg 1951.
105. VIVELL, O. en MAUER, R.: Z. Imm. Forschung 109: 246 (1952).
106. WEIGMANN, F. en NOESKE, H.: Z. Hyg. 119: 413 (1937).
107. WEIGMANN, F. en KOEHN, A.: Z. Hyg. 118: 507 (1936).
108. WITBEBSKY, E. en SATOH, T.: Kl. Wschr. 12: 948 (1933).
109. YAMAKAMI, K.: J. Imm. 12: 185 (1926).