



Bijdrage tot de kennis van geneesmiddelresistentie van surratrypanosomen

<https://hdl.handle.net/1874/311661>

A. qu. 192, 1932

Bijdrage tot de kennis van
geneesmiddelresistentie van
surratrypanosomen

M. v. ZWIETEN

Diss.
Utrecht

1932

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

BIJDRAGE TOT DE KENNIS VAN GENEESMIDDEL-
RESISTENTIE BIJ SURRATRYPANOSOMEN.



Bijdrage tot de kennis van geneesmiddelresistentie van surratrypanosomen

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR
IN DE VEEARTSENIJKUNDE AAN DE RIJKS-UNIVER-
SITEIT TE UTRECHT OP GEZAG VAN DEN RECTOR-
MAGNIFICUS DR. L. S. ORNSTEIN HOOGLEERAAR
IN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE
VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNI-
VERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FA-
CULTEIT DER VEEARTSENIJKUNDE TE VERDEDI-
GEN OP WOENSDAG 27 APRIL 1932 DES NAMIDDAGS
TE 4 UUR

DOOR

MATTHEUS VAN ZWIETEN

GOUVERNEMENTS-VEEARTS N. O. I.
GEBOREN TE AARLANDERVEEN (Z.-H.)

1932

KEMINK EN ZOON N.V. - OVER DEN DOM - UTRECHT

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

AAN DE NAGEDACHTENIS VAN MIJN VADER.
AAN MIJN MOEDER.

Bij de voltooiing van mijn proefschrift, grijp ik gaarne de mij geboden gelegenheid aan mijn dank te betuigen aan U, Hoogleeraren, conservatoren en prosectoren, voor het destijds van U genoten onderwijs.

In de eerste plaats ben ik aan U, Hooggeleerde D e B l i e c k, hooggeachte promotor, grooten dank verschuldigd voor de plaats die U voor mij openstelde aan de Tropische Afdeeling van het Instituut voor Parasitaire- en Infectieziekten, voor de belangstelling, die U voor mijn werk hebt getoond en de vele nuttige aanwijzingen, die ik van U heb mogen ontvangen.

U, Weledelzeergeleerde N i e s c h u l z, ben ik zeer erkentelijk voor de directe leiding bij mijn onderzoek. Verder dank ik U nog zeer voor de belangstelling, die ik gedurende het laatste jaar zelfs nog mocht ondervinden tijdens Uw verblijf in Zuid-Afrika.

Ook U, Weledelgeleerde B o s, dank ik ten zeerste voor de vele waardevolle raadgevingen bij het verdere gedeelte van mijn onderzoek en voor de voortdurend betoonde hulpvaardigheid.

Tenslotte wil ik nog een hartelijk woord van dank brengen aan allen die mij hebben geholpen bij de voltooiing van dit proefschrift.

INHOUD.

Bladz.

INLEIDING. Ervaringen omtrent recidive bij surra (waargenomen gevallen van Bayer 205 resistentie) Doel van het onderzoek.	1
HOOFDSTUK I. Literatuuroverzicht.	
a. Natuurlijke resistentie van trypanosomen tegen geneesmiddelen.	10
b. Verworven resistentie van trypanosomen tegen geneesmiddelen.	13
c. Resistentie van trypanosomen bij combinatietherapie.	16
d. Blijft resistentie evenals bij overspuiten van trypanosomenstammen ook bestaan na natuurlijke overbrenging?	20
e. Hoe is de werking van chemotherapeutica? Wat is vastheid van een trypanosoom en hoe is het ontstaan ervan te verklaren? Hoe ontstaan geneesmiddelvaste stammen van trypanosomen?	25
HOOFDSTUK II. Eigen onderzoek.	
a. Inleiding	34
b. Het verkrijgen van geneesmiddelvaste stammen	35
c. Passage van den geneesmiddelvasten stam door andere dieren.	53
d. Menging van een vasten en een normalen stam in de cavia	65
e. Proeven met de methode van imitatie van de natuurlijke overbrenging.	67
f. Invloed op den vasten stam uitgeoefend door overbrenging met insecten	74
SAMENVATTING EN CONCLUSIES	78
LITERATUUR.	82

INLEIDING.

Verkregen resistentie tegen of het verdragen van geneesmiddelen en vergiften is een algemeen biologisch phenomeen, dat geobserveerd is bij vele verschillende levende organismen tegen een groot aantal chemicaliën.

Verkregen resistentie tegen vergiften is niet beperkt tot lagere organismen, maar komt eveneens voor bij hogere dieren en bij den mensch.

Het verdragen van nicotine, alcohol, morphine, cocaïne enz. is overbekend.

Bij behandeling van met trypanosomen geïnfecteerde muizen met verschillende chemotherapeutische middelen, deed Ehrlich met zijn medewerkers het eerst de interessante ontdekking, dat de parasieten bij voortdurende behandeling met hetzelfde praeparaat zich hieraan gewenden en in hun ontwikkeling niet meer beïnvloed werden. Ehrlich schiep den theoretischen en experimenteelen grondslag van de heden voor de chemotherapie van de protozoenziekten van zoo groote beteekenis geworden „geneesmiddelvastheid”.

Men had weliswaar reeds vroeger een buitengewone verscheidenheid bij verschillende stammen van dezelfde microörganismen wat betreft hun gevoeligheid voor een chemisch praeparaat vastgesteld, doch de verschijnselen werden eerst door de waarnemingen van Ehrlich nader geanalyseerd.

Na Ehrlich werden zeer vele waarnemingen en proeven over vastheid van trypanosomen gedaan, van welke de voornaamste later in diverse hoofdstukken uitvoerig zullen worden verwerkt.

Het belang van geneesmiddelvastheid in verband met de behandeling van besmettelijke ziekten met chemotherapeutische agentia, zal voor iedere ziekte en voor ieder chemicalium bestudeerd dienen te worden, en de questie of een gegeven effectief middel bij een ziekte van practisch nut zal zijn, zal voor een groot deel afhangen

van het feit of het resistentie zal verwekken bij het veroorzakende organisme.

Bij de practische bestrijding in de tropen van dierziekten, w.o. de „surra”, is nog betrekkelijk weinig aandacht geschonken aan de gevaren, welke geneesmiddelvastheid met zich kan brengen.

Voor zoover mij momenteel bekend, zijn weliswaar nog geen aanwijzingen beschikbaar, dat werkelijk in bepaalde streken, waar de bestrijding van surra met geneesmiddelen reeds een tiental jaren geschiedt, thans de resultaten minder goed zijn dan vroeger. Wel zijn dergelijke aanwijzingen uit de literatuur bekend omtrent de bestrijding van de slaapziekte met germanin, die van de syphilis met salvarsan en van de malaria met chinine.

Vroeger kwam men in landen als Italië, Albanië enz. met lage, normale prophylactische doses chinine uit; later moest men steeds hogere prophylactische en therapeutische doseeringen toepassen, tot men gedwongen werd naar combinatie met andere, hoewel gevaarlijker medicamenten, over te gaan.

In het algemeen is het moeilijk een nieuw medicament doelmatig toe te passen.

De besmettelijke veeziekte „surra” komt verspreid in vrijwel alle gedeelten van de N.O.I.-Archipel voor en kan als een der belangrijkste ziekten van den inheemschen veestapel beschouwd worden.

De nauwkeurige bestudeering van onderwerpen op deze ziekten betrekking hebbende, zal dan ook m.i. zijn nut kunnen hebben.

Werkzaam als Gouvernementsveearts in Ned. Indië, maakte ik de ziekte in min of meer uitgebreide mate mee in diverse ressorten, n.l. op Java in de residentie Semarang, ressort Koedoes en de stad Semarang, (van Juli 1923 tot November 1925), daarna op Sumatra in een der belangrijkste Surrastreken van Indië, den ambtskring Sibolga, residentie Tapanoeli (van November 1925 tot Januari 1928), verder nog in mindere mate in den ambtskring Fort de Kock, residentie Sumatra's Westkust (van 1928 tot Maart 1929) en weer tamelijk veelvuldig in den ambtskring Benkoelen, residentie Benkoelen, Zuid-Sumatra (van Maart 1929 tot September 1930).

Door B a k k e r is in zijn proefschrift 1930: „Over de surra en hare bestrijding in Ned. Indië”, o.a. een duidelijke beschrijving van

de ziekte in het belangrijkste ressort Sibolga gegeven, waarnaar in hoofdzaak verwezen wordt.

Voor de bestrijding van de ziekte wordt veelvuldig aangewend het naganol, „Bayer 205”, vaak gecombineerd met atoxyl.

Het naganol is het laatste tiental jaren in toepassing, en is zeer zeker verre te prefereeren boven de vroeger gebruikelijke middelen v.n.l. atoxyl en antimoon.

Zooals bekend komen er echter toch *gevallen* voor, *waarbij het naganol geen of een minder goede werking heeft*, de resultaten door de diverse veeartsen in Ned.-Indië met de curatieve behandeling verkregen, zijn zeer uiteenlopend.

De *paarden* die niet herstellen kunnen behooren tot de klinisch zware gevallen.

Echter komen ook gevallen voor, die klinisch tot de lichte te rekenen zijn, waarbij het geneesmiddel, of de geneesmiddelen naganol-atoxyl gecombineerd, bij paarden falen.

Eén categorie betreft die dieren waarbij na behandeling geen trypanosomen meer aan te toonen zijn in het periphere bloed, maar wel in het cerebro-spinaalvocht. Dit is te beschouwen als een groep waarbij de trypanosomen, doordat ze genesteld zijn in het cerebro-spinaalvocht, moeilijk door chemotherapeutica bereikt kunnen worden.

Bij een andere groep krijgen de paarden „recidive”. Na enkele weken, soms na bijna nog 1 jaar na de behandeling, zijn opnieuw trypanosomen in het periphere bloed aanwezig, een nieuwe behandeling heeft zelden resultaat en de dieren sterven. Deze recidive trypanosomen zijn „vast” geworden, resistent tegen het geneesmiddel. Dit zijn dus gevallen van een verworven resistentie van de trypanosomen.

Gevallen waarbij werkelijke recidive in het spel was, heb ik bij een tiental paarden in mijn diverse ressorten gezien bij een totaal van honderden curatief behandelde paarden. Ik zeg „werkelijk” recidive, omdat het in vele andere gevallen niet duidelijk was of we met herinfectie dan wel met recidive te maken hadden.

In het bovengenoemde tiental gevallen van recidive konden we met groote waarschijnlijkheid weten dat werkelijk recidive aan-

wezig was. Tot deze conclusie kwam ik na in beschouwing nemen van ondervolgende factoren:

De klinische verschijnselen zijn bij de recidive-gevallen minder uitgesproken, tenminste wat betreft de oedemen, enz. (de verschijnselen van ataxie zijn vaak duidelijker dan bij oorspronkelijke gevallen).

Soms was het opnieuw aan de ziekte lijdende bevonden dier het eerste of wel eenige geval onder de vele paarden in een district.

Een enkele maal ook werd een geval van recidive gezien bij een rijpaard van een Inlandsch hoofd, het was het eenige paard aanwezig in den verren omtrek. Herinfectie vanaf karbouwen kon, wegens het tijdelijk grazen van de karbouwen in de ver afgelegen bosschen, gedurende het beplant zijn van de sawahs, ook moeilijk worden aangenomen.

Gedurende het eerste jaar van mijn werkzaamheid in den ambtskring Sibolga, werden in het zeer afgelegen district Baroemoen en Sosa, afd. Padang Lawas, enkele paarden met werkelijke recidive opnieuw behandeld met de curatieve dosis naganol-atoxyl. Bij deze dieren werden bij het maandelijksch herhaald massa-bloedonderzoek na 1 of enkele maanden wederom trypanosomen in het perifere bloed aangetoond. Deze paarden werden dus bij massa-bloedonderzoek gesignaleerd maar vertoonden zeer weinig klinische verschijnselen, *de dieren werden afgemaakt*.

Later werden in alle gevallen van eerste recidive de paarden afgemaakt en momenteel staat dit ook zeer terecht uitdrukkelijk vermeld in de verzameling van voorschriften van den B.V.D.

Het behoeft n.l. na het bovengenoemde geen betoog dat deze wijze van handelen de eenig juiste is.

Primo is de prognose voor de paarden met recidive ongunstig te stellen, een behandeling met medicamenten zal mogelijk het dier wel tijdelijk doen herstellen, maar een nieuwe recidive zal optreden, het dier zal zelden definitief genezen.

Secundo, last not least, leveren deze paarden, waar ze zonder klinische verschijnselen langen tijd onopgemerkt met positief bloedbeeld kunnen rondloopen een groot gevaar van besmetting voor de omgeving. Ze vormen een depôt van geneesmiddelvaste trypanoso-

men, welke mogelijkerwijs als zoodanig, dus met behoud van hun resistentie door Tabaniden overgebracht zouden kunnen worden op andere dieren.

In den loop der jaren zou aldus de ziekte-oorzaak in bepaalde streken ongevoelig kunnen worden voor op zichzelf waardevolle medicamenten.

Dit laatste, indien juist, zou van oneindig veel meer belang zijn dan de ongunstige prognose voor den patiënt zelf. De taak van den Gouvernementsveearts in N.-I. is vóór alles massa-behandeling van vee tegen besmettelijke ziekten en niet individueele behandeling van één dier, zooals die meer door den dierenarts in patria geschiedt.

Een enkel dier moet dus worden opgeofferd voor het welzijn van de groote massa.

Door verschillende omstandigheden bestond voor mij in Indië niet veel gelegenheid om de mogelijkheid van voortleven van geneesmiddelvaste surra-stammen in geheele streken, te vervolgen.

Tijdens mijn verlof eenigen tijd aan de Tropische Afdeeling van het Instituut voor Parasitaire- en Infectieziekten werkende, werd in overleg met Prof. de Blicck en Dr. Nieschulz besloten dit onderwerp nader te bestudeeren.

Niettegenstaande de groote practische beteekenis van het probleem van de geneesmiddelvastheid, bestaan op het gebied van de surra nog geen uitgebreide onderzoekingen daaromtrent, wel is reeds meer uitgewerkt bij slaapziekte, nagana, enz.

Allereerst diende dus te worden opgelost de vraag, of tegen de in Indië gebruikelijke medicamenten: naganol bij buffels en runderen, naganol-atoxyl bij paarden, geneesmiddelvastheid bij surra-trypanosomen in kleine proefdieren optreedt.

In de vorige bladzijden werden genoemd de gevallen van recidive, dus van een verworven geneesmiddelvastheid.

Ziektegevallen, waarbij dadelijk bij de eerste behandeling de trypanosomen absoluut resistent blijken te zijn tegen het geneesmiddel, ondanks de injectie direct in het periphere bloed persisteren, zich dus vermeerderen ondanks het chemotherapeuticum, heb ik in Indië niet waargenomen en zijn ook niet beschreven, voor zoover mij bekend.

Wel wordt als een geval van „natuurlijke resistentie” van trypanosomen beschreven, het door Rodenwaldt en Douwes (1922) waargenomene bij een paard; 10 tot 20 minuten na de eerste injectie met naganol isoleerden zij een trypanosomen-stam, die een zekere, hoewel beperkte vastheid bleek te hebben tegen het middel.

Mogelijk echter zouden deze trypanosomen niet oorspronkelijk geneesmiddelvast zijn, maar afkomstig, of overgebracht kunnen zijn van een ander dier, waarbij het geneesmiddel niet in staat was geweest een recidive te voorkomen. Dit zou dus een verworven vastheid zijn, de trypanosomen zijn gewend geraakt aan het gif. De mogelijkheid van overgebracht zijn uit recidive-gevallen is groot, omdat die gevallen bij paarden vaak niet onderkend worden als ziekte; vrijwel geen klinische verschijnselen treden op, van tijd tot tijd vertoonen ze parasieten in het bloed. Zulke schijnbaar genezen, chronisch zieke dieren zullen dus een groot gevaar voor hun omgeving kunnen opleveren als rondlopende reservoirs van geneesmiddelvaste trypanosomen.

Hiermee wordt dus ook de vraag gesteld, die op het gebied van dit onderwerp van het grootste belang is, of een geneesmiddelvaste stam van trypanosomen gevormd bij een dier als zoodanig op een ander dier wordt overgebracht, dus of zijn verworven eigenschap van vastheid behouden zal blijven, of dat door de passage door natuurlijke overbrengers, de Tabaniden, die eigenschap verloren zal gaan of verminderd worden.

Te trachten in principe uit te maken of er gevaren bestaan voor het *voortleven van geneesmiddelvaste trypanosomenstammen* als zoodanig in een bepaalde streek, zal dus een der hoofdpogaven van deze studie zijn.

Een verschijnsel analoog aan de geneesmiddelvastheid is de eigenschap van „serumvastheid”, die trypanosomen kunnen verwerven. Het bloed van een dier vormt bepaalde antistoffen tegen de trypanosomen. Recidivetrypanosomen zijn als serumvast te betitelen. Mogelijk dat de recidive of serumvaste trypanosomen door de natuurlijke overbrenging hun eigenschappen van resistentie tegen serum zullen verliezen. Een beschouwing over de waarschijnlijkheid hiervan geven Schilling en Schreck.

De in de natuur in het wild levende dieren, als herten, zijn alle gevoelig voor trypanosomen, maar bevinden zich door een zekere immuniteit in labiel evenwicht met de trypanosomen.

Alle recidivestammen zijn immunologisch verschillend van de oorspronkelijke, de genuïne stammen, d.w.z. voor die recidivestammen worden nieuwe antistoffen gevormd.

Zouden na natuurlijke overbrenging de recidivestammen hun serumvastheid behouden, dan zouden de aan herhaaldelijke infecties blootstaande dieren, steeds weer een nieuwe immuniteit moeten vormen tegen immunologisch andere trypanosomen, dus steeds in labiel evenwicht verkeerden. Practisch gesproken zou het bestaan van deze dieren onmogelijk worden.

De epidemiologische ervaringen leeren echter dat door de natuurlijke overbrengers de recidive-stam wordt teruggevormd tot een genuïnen stam. In Z.-Afrika, n.l. in het groote verbreidingsgebied van de tsetsevliege, is zeer veel wild, dat goed gedijt.

Over dezen „invloed van de natuurlijke overbrengers” als vreemd medium voor de in de zoogdier-gastheeren vastgeworden trypanosomen, zijn proeven door G o n d e r verricht, die als resultaat geven een opheffen der vastheid. Proeven van D u k e en van R e i c h e n o w en R e g e n d a n z geven geen verlies van vastheid aan. De resultaten der proeven, waaraan ook vele fouten kleven, spreken elkaar dus tegen.

Uit het bovenstaande blijkt dus duidelijk, dat nog geen bewijzende, overtuigende resultaten van proeven hierover, zijn bereikt.

Mogelijk kan, behalve de invloed van het insect als vreemd milieu voor trypanosomen, bij de overbrenging van de surra door Tabaniden nog een andere factor in het spel zijn, die bewerkstelligt dat de eigenschap van geneesmiddelvastheid na enkele passages verminderd is of opgeheven.

Het idee is dat overbrenging van surra door een Tabanus slechts een kwestie is van een klein aantal, van enkele trypanosomen. In den geneesmiddelvasten stam zal wat betreft de vastheid, variatie van individuen van trypanosomen voorkomen. Bij overbrenging van enkele trypanosomen zal door selectie en bovendien door een natuurlijke neiging van teruggang tot het normale, een verlies van

resistentie sneller optreden, dan bij telkens overspuiten van dier op dier, waarbij dan een geheele populatie van trypanosomen, dus ook maximaal vaste worden overgespoten.

Geneesmiddelvaste trypanosomen worden gevormd, door geleidelijk systematisch gewennen aan opklimmende doseeringen in series van kleine proefdieren. De vaste trypanosoom is als een „dauer-modificatie” te betitelen, d.w.z. zeer lang, misschien onbegrensd, blijft deze verworven eigenschap aanwezig bij herhaald overspuiten op dezelfde proefdiersoort.

Behalve de bovengenoemde factoren, die invloed kunnen uitoefenen op een verlies van vastheid, is het bekend uit de literatuur dat een geneesmiddelvaste stam zeer in zijn eigenschap van vastheid wordt aangetast door een „passage door een diersoort verschillende van die, waarin de stam geneesmiddelvast geworden is.”

In Indië zal bij de surra deze factor van zeer veel belang zijn. Een geneesmiddelvaste stam zal bijv. gevormd worden bij het paard. Paarden sterven vlug aan deze ziekte, de surra zal dus niet steeds in paarden blijven voortleven in een bepaalde streek, maar de karbouwen en runderen zijn de dieren, die de surra in de diverse streken steeds onderhouden, dus de dragers van trypanosomen.

Mogelijk kunnen nu de diverse passages door karbouwen en runderen van zoo'n eventueel gevormden geneesmiddelvasten stam, een gevoeligen stam terugvormen.

Mogelijk echter bestaat in Indië nog meer gevaar, dat geneesmiddelvaste stammen in buffels ontstaan dan in paarden.

In Toba en andere streken van den N.-I. Archipel worden jaarlijks honderden buffels met zeker subtherapeutische doseeringen (1—5 gr.) naganol behandeld. Zijn eenmaal, vooral in buffels, vaste stammen gevormd, zoo blijven ze mogelijk jaren in die streek aanwezig.

Een stam van trypanosomen door omstandigheden vast geworden of spontaan resistent tegen giften, zal dus verschillende invloeden ondergaan.

Diverse vraagstukken kunnen dus hierbij worden opgeworpen en de omstandigheden kunnen worden nagebootst bij kleine proefdieren.

Niet in alle opzichten zullen de resultaten, verkregen bij kleine proefdieren, zonder meer kunnen worden overgezet als te zijn van toepassing op onze groote huisdieren: paarden, runderen en buffels in N.-Indië.

De bestudeering van de resultaten bij kleine proefdieren zal dan ook alleen voornamelijk ten doel kunnen hebben het nader bestudeeren van de *factoren, die invloed kunnen uitoefenen op het ontstaan van geneesmiddelvaste stammen en die, welke eventueel gevormde vaste stammen hun resistentie weder zouden kunnen doen verliezen.*

Uit de resultaten van de proeven bij kleine dieren zal echter getracht worden eenige conclusies te trekken, om met eenige waarschijnlijkheid te beredeneeren in hoeverre in Ned.-Indië bij de bestrijding van de surra de resistentie van trypanosomen tegen naganol vooral, maar ook tegenover andere geneesmiddelen w.o. atoxyl (geneesmiddelvastheid van een microorganisme is vaak niet erg specifiek) zou tengevolge kunnen hebben dat het resultaat van de behandeling met geneesmiddelen in bepaalde streken minder zou worden of nihil.

HOOFDSTUK I.

LITERATUURVERZICHT.

a) Natuurlijke resistentie van trypanosomen tegen geneesmiddelen.

In de literatuur wordt algemeen als een geval van „natuurlijke resistentie” aangegeven hetgeen door R o d e n w a l d t en D o u w e s werd waargenomen, n.l. dat reeds korten tijd na de injectie van Bayer 205 (10—20 min. er na) uit een surraziek paard trypanosomen gekweekt kunnen worden, die een duidelijke hogere resistentie tegen het middel toonen dan normale.

Indien dit een kwestie van „gewennen aan het middel” zou zijn, zouden de trypanosomen in 10—20 min. die vastheid moeten hebben verkregen, wat volgens de onderzoekers zelf wel zeer onwaarschijnlijk is. Onder die omstandigheden kan naar hun meening het ontstaan van een artseniJVastheid alleen door „selectie” verklaard worden.

Walther en Pfeiler beschrijven een geval van dourine met natuurlijke resistentie tegen Bayer 205.

Hier is volgens onderzoekers het middel van den beginne af onwerkzaam. In de subarachnoideaalruimte werd bij sectie na het sterven van het paard na lang zoeken 1 trypanosoom gevonden.

Hierop is als kritiek m.i. aan te voeren, dat mogelijk door herhaaldelijke injecties Bayer-205-vastheid zich heeft ontwikkeld, 1ste injectie was met 5 gram, is mogelijk voor een zwaar paard een te kleine dosis.

Verder is ook de dourine volgens de kritiek ook van R o d e n w a l d t en D o u w e s met haar bijzondere wijze van overbrenging, die zonder bemiddeling van stekende insecten, op een experimenteele infectie lijkt, met haar bijzonder chronisch verloop, met dikwijls jarenlange remissies, niet zeer geschikt om er een trypanosomenmiddel op te beproeven.

Verder kan m.i. worden gezegd dat deze ééne gevonden trypanosoom mogelijk niet resistent was, maar niet bereikt kon worden door het geneesmiddel, aangezien in de subarachnoideaalruimte zeer slecht chemotherapeutica doordringen.

Mijn opvatting is, dat *geen eigenlijk natuurlijk resistente stammen bestaan, maar slechts van nature vastere individuen* in een stam kunnen voorkomen.

Persoonlijk heb ik in Indië bij paarden nooit waargenomen, dat ondanks de injectie van $3\frac{1}{2}$ gr. naganol en $3\frac{1}{2}$ gr. atoxyl per paard, de trypanosomen zich direct in het bloed vermeerderden, dat dus een absolute natuurlijke vastheid bestond. Wel werd bij meerdere paarden recidive gezien, de trypanosomen waren dan door de geneesmiddelen niet goed meer te beïnvloeden; ze verdwenen uit het bloed na injectie, maar na 1 maand of later zag men weer een 2e recidive; een relatieve vastheid bestond dus, de recidivetrypanosomen zelf bleken mij nooit absoluut vast.

Absoluut vast zijn de trypanosomen, als ze zich ondanks het injiceeren van geneesmiddelen direct in het bloed vermeerderen. Een relatieve vastheid hebben de trypanosomen, als ze na de injectie verdwijnen uit de bloedsbaan, echter later recidiveeren.

Wel werd bij een karbouw, in marga Oeloe Danau, distr. Bintoehan, gewest Benkoelen, welke 1 maand tevoren met 5 gr. naganol curatief behandeld was geworden, recidive aangetoond. De recidivetrypanosomen verdwenen ondanks 5 gram naganol niet uit het bloed, hadden dus toen een absolute vastheid tegen 5 gram naganol verkregen.

Collier heeft bij met nagana geïnfecteerde muizen de proeven van Rodenwaldt en Douwes herhaald, het is hem echter niet gelukt iets overeenkomstigs te verkrijgen.

Daarmee zijn de genoemde feiten echter niet weerlegd. Het paard kan zich anders gedragen dan de muis, zooals het ook op Bayer 205 geheel anders reageert.

Behalve deze gevallen van z.g. natuurlijke resistentie van stammen, zijn verder wel talrijke voorbeelden van een „plotseling optredende verhoogde resistentie” van trypanosomen tegen chemi-

caliën, die constant de betreffende trypanosomensoort wel beïnvloeden, sedert langen tijd bekend.

In de beschouwingen van Morgenroth en Halberstädter wordt gezegd, dat er blijkbaar primair geneesmiddel-ongevoelige trypanosomen in de geheele wereld bestaan; er behoeft hier slechts herinnerd te worden aan de arseenresistentie van Congolense en Vivax-groep, of aan die van tryp. lewisi tegen Bayer 205 en alle andere trypanosomenmiddelen, slechts door arsenophenylglycin is deze laatste te beïnvloeden.

Volgens v. d. Branden en v. Hoof vertoont een gevonden vorm van *T. congolense*, volgens v. Hoof identisch met *T. dimorphon* (Laveran en Mesnil), tegenover Bayer 205 een maximale natuurlijke resistentie, terwijl toepassing van het middel bij *T. congolense* een therapia sterilisans magna geeft.

Het Ehrlich'sche trypaanrood, uitstekend werkzaam bij Mal de Caderas, heeft weinig of geen invloed tegen Nagana; de Naganatrypanosomen bezitten dus een natuurlijke resistentie tegen trypaanrood. Evenzoo bestaat groot onderscheid in de geneesmiddelgevoeligheid ook tusschen naverwante spirochaetenrassen en malariaplasmodiën; zoo is atoxyl werkzaam bij sp. gallinarum, niet bij sp. duttoni, salvarsan werkzaam bij tertiana, minder bij quartana.

Maar zelfs de in de laboratoria in proefdieren verder gekweekte trypanosomenstammen van dezelfde soort gedragen zich zeer verschillend.

De Mal de Caderasstam van Ehrlich was gevoelig voor trypaanrood, die van Uhlenhuth resistent. Ook tegen zeer werkzame arsenicaliën bestaan zeer groote quantitatieve verschillen (tusschen stammen van dezelfde soort). (Ehrlich, tenax en debilis).

Door Morgenroth en Halberstädter wordt dan beschreven de Mal de Caderasstam van Pro w a z e k, die in ratten was voortgekweekt en een spontane hoge absolute vastheid tegen de zeer werkzame arsenicaliën, atoxyl, arsacetin, en salvarsan vertoonde. 2 gr. arsacetin per K.G. muis beïnvloedde niet in het minst het infectieverloop; 0,2 gr. salvarsan per K.G. muis was eveneens onwerkzaam.

Vergeleken werd, bij gebrek aan een normalen Mal de Caderasstam, met een Naganastam, die door 0,005 gram per K.G. muis werd beïnvloed. 0,15 gr. arsacetin genas nog in een laat ziektestadium.

Van een noemenswaardige vastheid tegen ars. phen. glyc. was geen sprake. De stam werd goed beïnvloed door parafuchsine, evenzoo door tartarus stibiatus.

Bij den kunstmatig tegen arsacetin vastgemaakten naganastam bestond gelijktijdig een vastheid tegen kaliumantimonyltartraat. Deze antimoonvastheid was na passages in muizen verloren gegaan, kon echter direct door één keer in aanraking brengen met braakwijnsteen hersteld worden.

Ten slotte toonde zich bij in vitroproeven met salvarsan een sterke vastheid van den Mal de Caderasstam.

Normale naganastam 1 : 100.000 verdunning gevoelig.

Mal de Caderasstam 1 : 2.000 gevoelig, dus een 50 maal sterkere oplossing noodig om gedood te worden.

Of men echter gerechtigd is primair het voorkomen van maximaal vaste individuen, temidden van zulke stammen, die als geheel zeer gevoelig voor het betreffende geneesmiddel zijn, aan te nemen, is zeer de vraag.

Robertson (1929) neemt aan, dat er „primair vastere trypanosomen individuen in iederen stam voorkomen, welke voortbestaan na iedere behandeling met geneesmiddelen in de diverse passages, geleidelijk nog resistenter worden en aldus een volledig vaste stam geven.”

Zij deed proeven met *Bodo caudatus*, door geneesmiddelen ontstonden aparabasale exemplaren. Bij haar proeven gaven stammen, gegroeid van enkele geïsoleerde *Bodo caudatus* van den onbehandelden massastam, verschillende graden van natuurlijke resistentie tegen geneesmiddelen te zien.

De onbehandelde massastam groeide nooit in platen bevattende acriflavine 1/5000. De meest resistente stammen, gegroeid van enkele isolaties, groeiden hierin wel, maar niet in 1/2000.

Deze natuurlijke verscheidenheid van resistentie van individuen in een stam is ook van groot belang voor de verklaring van het verdere ontstaan van een maximaal vasten stam. De opvatting van Robertson houdt dus het midden tusschen het begrip van uitsluitend selectie en dat van uitsluitend gewinnen aan het geneesmiddel en lijkt mij ook het meest plausibele.

b) Verworven resistentie van trypanosomen tegen geneesmiddelen.

Men kan de gifvastheid op 2 verschillende manieren bereiken. Door voorzichtige behandeling met geleidelijk stijgende doses van het medicament tijdens vele dierpassages, konden Ehrlich en Gonder de z.g. „adaptieve” vastmaking bereiken, terwijl Ehrlich, Kudicke, Marks Shiga waarnamen, dat bij onvolgende behandeling van met trypanosomen geïnfecteerde muizen

met ortochinoïde kleurstoffen een vastheid, z.g. „mutatief” tot stand kwam.

Volgens de vroegere algemeen gebruikelijke methoden kwamen geneesmiddelvaste stammen tot stand uit „recidiven” van chemisch beïnvloede individuen. Tegenwoordig weten we dat men zonder moeite specifiek artsensijvaste stammen „ook zonder recidive” kan verkrijgen, als men de door G o n d e r het eerst bij spirochaeten toegepaste vastmakingsmethode benut (zie bl. 35) (M o r g e n r o t h, F r e u n d, L e w y e n C u r e w i t s c h, S c h n i t z e r). Verder hebben de bevindingen van V o e g t h l i n, D y e r, M i l l e r e n C o l l i e r geleerd, dat reeds verdwijnende kleine hoeveelheden van chemotherapeutische agentia, die na een eenmalige behandeling in het organisme achter blijven, voldoende zijn om trypanosomen een behoorlijke mate van vastheid te geven. Het tot stand komen van de vastheid zou men daarom zoo kunnen verklaren, dat immunologisch getroffen en tot recidive voorbeschikte trypanosomen onder de inwerking van achter gebleven sporen van geneesmiddel vast worden. Daardoor laat zich ook het relatief gemakkelijk verkrijgen van vaste stammen door behandeling met kleurstoffen, die lang in het organisme circuleeren, verklaren en evenzoo de onmogelijkheid vast te maken tegen tartarus emeticus, wat snel uitgescheiden wordt.

De „antilichamen” zijn meestal niet in staat een blijvende genezing van trypanosomeninfecties te bewerkstelligen. Zelfs zijn juist de door de antilichamen getroffen doch niet gedooide trypanosomen als uitgangspunten van de recidive te beschouwen. Door de medewerking van den gastheer (de antilichamen) ontstaan dus de daaraan aangepaste recidive trypanosomen. In zooverre is dus die antilichamenwerking geen voordeel en vormt een „belemmering voor een therapia sterilisans magna”.

Overigens is het zeer de vraag of een sterilisans magna wel werkelijk het ideale zal zijn, waar het zoo goed als zeker is, dat een onvatbaarheid tegen nieuwe infecties slechts aanwezig is, als de ziekteverwekkers in klein aantal in het lichaam achterblijven „Immunisatio non sterilisans” (S c h i l l i n g).

Zooals uit mededeelingen van verschillende schrijvers zou blijken,

zou bij het praeparaat Bayer 205 geen bijzonder lange behandeling noodig zijn om een maximale ongevoeligheid van de trypanosomen te verkrijgen. Hier zou zich duidelijk het nadeel toonen van die eigenschap van het praeparaat, die anders juist zijn voordeel uitmaakt, n.l. het langer verblijven in het organisme. Verder is waarschijnlijk de relatief snel intredende maximale vastheid het gevolg van de relatief langzame werking van Bayer 205. Hoe langer een middel in het organisme zwerft en hoe langzamer het zijn werking ontvouwt, des te gemakkelijker kan zich bij trypanosomen de toestand vormen, die langs verhoogde resistentie tot absolute ongevoeligheid leidt.

Op bijzonder instructieve wijze wordt dit aangetoond door een proef van R o d e n w a l d t (1922) bij het paard, waarbij van recide tot recide de gevoeligheid van de trypanosomen afneemt. Uit de proeven van L e u p o l d (1924) blijkt, dat op dezen weg snel een absolute vastheid ontstaat. Na een 50-tal passages bereikte Fr. L e u p o l d een relatieve vastheid tegen 25 mg; 25 mg was dus de recidivedosis. Na 100 passages tegen 333 mg. Bij mijn proeven bereikte ik in 25 passages een absolute vastheid tegen 10 mg, in 30 passages in muizen absolute vastheid tegen 25 mg. Hier waren tijdelijk echter bij wijze van depôt enkele cavia's tusschengeschakeld geweest.

Door de proeven van C o l l i e r wordt bewezen, dat ook de Arsenobenzolderivaten (altsalvarsan en neosalvarsan) langer dan meestal aangenomen is, in het lichaam verblijven, en wel in een vorm, die, in den zin van de genezingsmogelijkheid, gunstige en ongunstige werkingen heeft. De eerste bestaan daarin, dat normaal gevoelige trypanosomen een verzwakking van virulentie ondervinden. Ongunstig is ongetwijfeld, dat van zulke depôts invloeden uitgaan, die de resistentie van de parasieten verhoogen en daarmede de genezingsmogelijkheid verhinderen.

M i e s z n e r en B e r g e konden de eerste kunstmatige Bayer 205 vastheid bij een paard door meermalige behandeling met het praeparaat bereiken. Nadien zijn meerdere gevallen van naganolvastheid bij groote huisdieren waargenomen.

Persoonlijk heb ik meerdere gevallen van resistentie gezien,

welke hier niet alle zullen worden opgesomd; ze vonden reeds elders in dit proefschrift vermelding. Bij paarden zag ik een „relatieve vastheid”, d.w.z. de trypanosomen verdwenen wel langzaam uit het bloed na injectie van geneesmiddelen, maar recidiveerden vlug.

Bij 1 karbouw nam ik waar een „absolute vastheid” van trypanosomen, die weer waren opgetreden in het perifere bloed 1 maand na de curatieve behandeling van het dier; deze „recidivetrypanosomen” verdwenen niet na de injectie van naganol, vermeerderden zich rechtstreeks ondanks het chemotherapeuticum.

c) Resistentie van trypanosomen bij combinatietherapie.

Ehrlich beschouwde in den beginne de vastheid als streng specifiek. Zijn trypanosomenstammen vast tegen bepaalde geneesmiddelen, dan zijn ze dat niet tegen andere, v.n.l. niet tegen geneesmiddelen uit een andere groep, dus b.v. arsenicumvaste zouden niet vast zijn tegen antimoon. Verschillende variaties van chemoceptoren zouden dus voorkomen.

Bij de moeilijk te beïnvloeden parasieten moeten we van één geneesmiddel therapeutische doses toedienen, die de doses tolerata te dicht naderen, sommige patiënten overgevoelig van nature of gevoelig tengevolge van de ziekte sterven.

Daarom zou te prefereeren zijn een *combinatie van geneesmiddelen simultaan* te geven, en wel de gunstigste combinatie der verschillende middelen. De opvatting van verschillende chemoceptoren der parasietencel, leidde naar een behandeling van infecties, veroorzaakt door lastig te beïnvloeden parasieten, gelijktijdig met meerdere medicamenten, de z.g. combinatietherapie. Inderdaad werden schitterende resultaten bereikt.

Waargenomen werd dat door een combinatietherapie een geneesmiddelvastheid opgeheven kon worden of kon worden voorkomen.

Leupold (1924) zag dat een tegen trypaflavine vastgemaakte en daardoor ook tegen arsenicaliën vaste stam, door vastmaking tegen Bayer 205 zijn resistentie tegen arsacetin verloor en ook door trypaflavine iets beter te beïnvloeden was dan tevoren.

Dit verschijnsel kan genoemd worden „Biologische Umbildung”.

Een zoodanig verlies van geneesmiddelvastheid door behandeling met een ander medicament, werd waargenomen door N o c h t en W e r n e r bij de behandeling van chininevaste malariagevallen met salvarsan, wat een verdwijnen van de chinineresistentie van de plasmodiën tengevolge had.

Bij trypanosomen is reeds vroeger door M o r g e n r o t h en R o s e n t h a l dit phenomeen beschreven geworden.

De verhoogde werking in vivo door combinatie van twee middelen is volgens W e c h s e l m a n n te verklaren aldus, dat de eene stof als kalalysator op het andere chemicalium werkt. Ook kan de organotropie van het eene praeparaat door het andere verminderd worden.

A. V. W a s s e r m a n, K e y s e r en M. W a s s e r m a n probeerden met succes werkzame substanties, die geen specifieke affiniteiten voor bepaalde microorganismen bezitten, door combinatie met onwerkzame, maar van specifieke hechtgroepen voorziene middelen, aan de ziekteverwekkers te verankeren en tot werking te brengen.

De opvatting van E h r l i c h, n.l. *strenges specificiteit der vastheid*, gebaseerd op de chemoceptoretheorie, is intusschen gebleken niet altijd juist te zijn.

Bij de vroegere proeven (1924) kreeg L e u p o l d dus als resultaat, dat trypanosomen die tevoren tegen arsenigzuren, braakwijnsteen en trypaflavine vastgemaakt zijn, door Bayer 205 minder sterk beïnvloed worden dan normale stammen. Ze zijn ook vlugger dan normale stammen tegen het middel vast te maken. Vastmaking tegen trypaanblauw had een maximale vastheid tegen Bayer 205 tot gevolg.

K o l l e, L e u p o l d en C o l l i e r kregen een matige Bayer-205-resistentie ook bij trypanosomen die tegen arsenicaliën; een groote vastheid bij trypanosomen, die tegen trypaanblauw (zie ook M o r g e n r o t h) vastgemaakt waren.

Is een Bayer 205 vastheid nu ook sneller te bereiken bij een *gelijktijdig* laten inwerken van diverse geneesmiddelen, gecombineerd met naganol?

Ook een combinatie van 2 chemisch verafstaande therapeutica, simultaan toegediend, gaf n.l. lang niet altijd een gunstiger doo-dende werking op de trypanosomen dan één enkel middel of ver-hoedde lang niet altijd het optreden van een vastheid.

Integendeel werd door *Browning en Gulbransen* beschreven het „interferentie-phenomeen”, wat volgens *Leupold* beteekent dat bij kort na elkaar toedienen van twee in chemisch opzicht verafstaande stoffen snel een vastheid tegen beide middelen ontstond.

Browning en Gulbransen (1922) Interference Phenomen.

Beschreven wordt de observatie, dat een chemotherapeutische substantie (parafuchsine) indien aanwezig in de weefsels van een dier, geïnfecteerd met trypanosomen, de werking van een ander geneesmiddel verhinderde (trypaflavine of acriflavine).

Trypaflavine op zich zelf had een duidelijk therapeutisch effect op die-ren, geïnfecteerd met een parafuchsinevasten stam van *T. brucei*. Maar als parafuchsine al reeds aanwezig was, in het lichaam, als een gevolg van voeding met deze substantie, faalde het trypaflavin in zijn gene-zende werking.

Bevestigd werd het phenomeen door *Schnitzer en Rosenberg*, die vonden dat het verschijnsel ook optrad bij een niet parafuchsinevasten stam.

Het verschijnsel trad op als parafuchsine was ingespoten 4 uren of zelfs langer vóór de injectie van het andere middel, niet alleen ten opzichte van trypaflavin maar ook ten opzichte van arsacetin en salvarsan.

Bij den vasten stam moest de dosis parafuchsine in geval van arsacetin-toediening grooter zijn en nog grooter in geval van salvarsan.

Bij den gevoeligen stam was de optimum dosis van parafuchsine dezelfde voor trypaflavin, arsacetin en salvarsan.

Bij excessieve dosis parafuchsine trad bij normalen stam geen inter-ferentie op (cumulatieve effecten).

De werking van tartarus emeticus bij parafuchsinevasten stam wordt verhinderd door parafuchsine (*Schnitzer en Silberstein, 1927*). Het phenomeen trad op bij subcutane injectie van parafuchsine (0,5 cc 1 : 2000 oplossing voor 20 G muis) en 4 uur later arsacetin (0,5 cc 1 : 100 oplossing voor 20 G muis), bij muizen geïnfecteerd met *T. brucei* (*nagana*).

Interferentie met arsacetin geven nog aethylviolet (verwant aan para-

fuchsine) terwijl tryparosan (dezelfde groep) geen interferentie geeft, evenmin als Döbner's violet. Trypaanblauw geeft eenige interferentie. Een kleine dosis parafuchsine interfereert met het verwante tryparosan, maar niet met zich zelf.

Het mechanisme berust voornamelijk op de directe actie van parafuchsine op de trypanosomen.

Er is geen enkele theoretische verklaring voor 't verschijnsel te bedenken.

Strikt genomen gaat het bij *Browning-Gulbransen* niet om vastheid. Door *Leupold* werd waargenomen, dat bij simultane toediening van arsacatin gecombineerd met tryparosan en trypaflavin interferentie optreedt, zij dient dus niet de geneesmiddelen toe met een tusschenruimte van 4 uren zooals *Browning* en *Gulbransen*. Echter moet het optreden van interferentie toch eigenlijk m.i. worden beschouwd als behoorende tot de uitzonderingen, daarom komt het mij lichtelijk verkeerd voorgesteld voor, als *Leupold* zegt, dat bij de combinatie van Bayer 205—arsacatin simultaan gegeven geen vastheid wordt verkregen, maar integendeel het onverwachte, dat de trypanosomen gevoeliger worden voor Bayer 205.

Bij combinatie van Bayer 205 met tryparosan en trypaflavine komt ze tot analoge resultaten.

De combinatie met Bayer 205 verhindert dus een optreden van vastheid der trypanosomen in tegenstelling met combinatie met andere chemotherapeutica, dan Bayer 205.

Meerdere voorbeelden uit de literatuur van het te prefereeren zijn van theapie met combinatie van meerdere geneesmiddelen boven één geneesmiddel, zouden hier aan te halen zijn, maar dit zou het theoretische gedeelte te uitvoerig maken.

Door eigen proeven werden deze questies gecontroleerd en werd als resultaat verkregen dat bij een combinatie van naganol-arsacatin simultaan wel degelijk ook een vastheid tegen naganol optreedt.

Mijn resultaten zijn dus in zooverre bij den *surrastam* (Tr. *evansi*) niet accoord met de bevindingen van *Leupold* bij den *nagana-stam* (Tr. *brucei*).

d) Blijft resistentie evenals bij overspuiten van trypanosomenstammen ook bestaan na natuurlijke overbrenging?

De vraag, of de vastheid van trypanosomen tegen een bepaald geneesmiddel bestaan blijft na passage door de natuurlijke overbrengers, is van groote practische beteekenis.

Zou in het insect conjugatie plaats hebben, dan zou bij het bestaan blijven van vastheid na passage een vaste stam als een mutatie der trypanosomen aangenomen kunnen worden. Bevruchttingsverschijnselen schijnen echter bij de flagellaten te ontbreken.

Afgezien hiervan is deze kwestie toch zeer van belang. In een surrastreek zouden gevormde gifvaste stammen, indien ze na natuurlijke overbrenging voortbestonden met behoud van de eigenschap van gifvastheid, de opzichzelf waardevolle geneesmiddelen waardeeloos kunnen maken.

Onderzoekingen in die richting werden gedaan door *Gonder* met tryp. lewisi evenals door *Reichenow* en *Regendanz* en door *Duke* met een trypanosoom van het brucei-type.

Het eenige medicament wat tegen tryp. lewisi als werkzaam bekend is, is arsenophenylglycin, alle andere middelen zijn onwerkzaam, ook Bayer 205.

Geëxperimenteerd werd door *Gonder* met tryp. lewisi met als overbrengend insect *Haematopinus spinulosus*. Oorspronkelijk was 0,1 gram arsen. phen. glyc. per K.G. rat gemakkelijk in staat de infectie geheel te overwinnen.

In een tijd van 2 jaren was de lewisistam vastgemaakt tegen 0,2 gram per K.G. rat. De arseenvastheid wijzigde zich absoluut niet, nadat de stam zonder behandeling verder werd aangehouden.

De vaste stam was nog natuurlijk over te brengen door luizen evenals de normale stam. De normale trypanosomen verschenen 15—17 dagen na overzetten van de luizen, de vaste 25—30 dagen. Volgens *Gonder* heeft een ontwikkeling in de rattenluis moeten plaats hebben.

De trypanosomen bleken door hun ontwikkelingsgang in *Haematopinus* hun vastheid te hebben verloren.

Bij een mechanische overbrenging, die enkele malen gelukte, (5 dagen na overzetten van de luizen verschijnen van trypanosomen in het bloed) bleef de arseenvastheid behouden.

Door *Gonder* werden in de luis *Leptomonas*-vormen gezien, meer-

malen oökinetachtige (8ste dag) en crithidiënachtige vormen. Verder werden proeven gedaan met luizenemulsies. Infecties veroorzaakt met emulsies na den 12den dag geïnjecteerd waren niet meer arseenvast, maar normaal. Die van vòòr den 12den dag waren nog arseenvast, dus het vreemde medium, het luizenlichaam nam de arseenvastheid niet weg, maar volgens den onderzoeker de ontwikkeling, resp. de bevruchting in de rattenluis.

G o n d e r kwam dus tot de conclusie dat *na de passage door de luis de arseenvastheid* van lewisistammen *verloren* was gegaan.

Hij beschouwde de verandering als een gevolg van de bevruchting die zich in de Haematopinus afspeelt. Indien men geslachtelijke ontwikkeling niet aanneemt, blijft de verklaring over, dat de groote verandering van levensvoorwaarden de z.g. „Dauer-modifikation” weer tot het normale teruggebracht heeft.

Tegenwoordig weten we dat niet rattenluizen maar rattenvlooien de natuurlijke overbrengers van tryp. lewisi zijn. In de luis komt het slechts bij uitzondering tot ontwikkeling der trypanosomen, een geslaagde overbrenging is een toeval.

R e i c h e n o w en R e g e n d a n z gingen uit van een lewisistam, waarbij 0,17 Ars. phen. glyc. per K.G. lichaamsgewicht de curatieve dosis was en bereikte dat 0,2 A. niet meer werkzaam was, dus ze bereikten slechts een geringe resistentieverhoging, wat ze trouwens bij hun conclusie ook vermelden.

Zij vinden dat *geen resistentieverzwakking tengevolge van de passage door de vloot plaats vindt, evenmin als D u k e*, die atoxylvastheid bestudeert bij Tryp. brucei stam van antilopen bij passage door glossinen. D u k e gebruikte ook slechts een stam van geringe arseenvastheid.

D u k e experimenteerde met een trypanosomenstam geïsoleerd uit een antilope en 17 maanden voortgekweekt in apen. De algemeene eigenschappen kwamen overeen met tryp. brucei, de stam was iets minder virulent voor apen dan brucei. Van de 20ste—30ste passage in 9 maanden werd de stam onder invloed van arsenik gebracht, was daarna nog goed over te brengen door tsetse. De trypanosomen van dezen stam demonstreerden zich dagelijks in het bloed, in zooverre verschil makend met tryp. gambiense, versch van menschen geïsoleerd, deze parasieten zijn over het algemeen zeldzaam in het bloed van apen aan te wijzen, kunnen voor vele dagen geheel afwezig zijn.

De techniek was aldus dat de apen geïnfecteerd werden door vliegen, na positief worden van het bloedsbeeld dagelijks werden behandeld met doses atoxyl, in verloop van enkele maanden opklimmend van 0,001—0,05 gram per K.G. lichaamsgewicht.

Het was de bedoeling na te gaan of een experimenteele toename van de *resistentie* tegen arsenik *behouden* zou blijven na cyclische passage door het normale overbrengende insect, wat wel het geval bleek, in ieder geval *tot de 3de generatie van cyclische passages*.

Uit de beschouwing van de tabellen van Duke blijkt niet, dat een absolute vastheid tegen die dosis van 0,05 gram per K.G. verkregen is. De trypanosomen verdwenen daardoor bij vele proefdieren voor ongeveer 1 of 2 weken uit het bloed.

Voor den aanvang van de proeven zijn geen aparte proeven gedaan om de gevoeligheid van de trypanosomen voor arsenik vast te stellen (gebrek aan proefdieren), in den loop van de proeven werd de conclusie getrokken dat die gevoeligheid bestond. De „dosis efficax” was ongeveer 0,01 gram.

Verder mogen hier worden vermeld de beschouwingen van Schilling en Schreck. Hoewel zij betrekking hebben op „serumvastheid” van trypanosomen en niet op geneesmiddelvastheid, worden zij hier vermeld, omdat er toch een groote analogie bestaat tusschen deze eigenschappen.

Evenals de gifvastheid is de „antilichaam”- of „serum”-vastheid van trypanosomen een verworven eigenschap die zeer lang, misschien onbegrensd, wordt overgeërfd.

Epidemiologisch van groot belang is de vraag of deze verworven eigenschap van serumvastheid ook dan behouden blijft, als de serumvaste parasiet door een natuurlijke overbrenger, een bloedzuigend insect, passeert. Zou dit het geval zijn, dan zouden onder natuurlijke verhoudingen ontelbare varianten van ziekteverwekkers optreden. Tegen zulke varianten zou ook de immuniteit, die het organisme tegen zijn primaire infectie heeft verworven, niet stand houden.

Dat echter zoo'n splitsing in varianten in werkelijkheid plaats vindt, moet volgens onderzoekers uit epidemiologische ervaringen uitgesloten worden. In Afrika, in het groote verbreidingsgebied van de tsetsevlies is zeer veel wild, dat goed gedijt. Deze antilopen, zebra's enz. wor-

den doorlopend door geïnfecteerde glossinen gestoken, zonder dat ze ziek worden. Zou hun z.g. „labiele immuniteit” hen slechts tegen variëteit A van trypanosomen bescherming geven, dan zouden ze met een andere variëteit B geïnfecteerd, ziek worden en nu opnieuw een immuniteit tegen B vormen, ze zouden eigenlijk hun geheele leven ziek zijn. Het zelfde is het geval met de piroplasmosen en hoogstwaarschijnlijk ook met de malaria van de menschen.

De proeven met gifvaste stammen van trypanosomen en spirochaeten van Gonder, Reichenow en Duke, betreffen streng gesproken iets anders, dan recidivestammen en hun vastheid tegen door het lichaam gevormde antistoffen, de gifvastheid is een in het normale verloop van de infectie niet voorkomende, een door menschen den parasiet opgedrongen eigenschap. De proeven over gifvastheid spreken elkaar onderling tegen, er kleven vele fouten aan, zoodat ze niet als bewijzend kunnen beschouwd worden. Op expeditie van Schilling en Schreck in Oost-Afrika (1914—1921) werden vele vragen in meerdere proeven opgelost. Oude laboratorium-bruceistam (Hamburg alt) sedert jaren in muizen en ratten, werd gepasseerd door *Glossina morsitans*. De stam bleek na de vliegenpassage (Hamburg recens) veel zwakker virulent voor muizen en ratten, hij was ongeveer even virulent als een stam uit een gnoe gewonnen en door vliegenpassages verder gekweekt. Een kalf vormde onder den antigenen invloed van stam „Hamburg alt” werkzame antilichamen tegen dezen stam, niet echter tegen dezen zelfden stam, die eenmaal door *Glossina* gegaan was „Hamburg recens”. Bij diverse andere proeven bleek onderscheid tusschen Hamburg alt en recens.

Sera, die op oude laboratoriumstammen niet werkten, deden dit wel op Hamburg recens, ook op den genoemden uit den gnoe gewonnen stam. Stam Hamburg recens gedraagt zich hier als een „genuine” „wilde” stam, die de primitieve eigenschappen teruggewonnen heeft.

Of hier een geslachtelijke kwestie, een bevruchting in de vlieg een rol speelt, is niet uitgemaakt.

De proeven zouden de hoop geven dat we tot een immuniseering tegen trypanosomeninfecties kunnen komen, want deze zou practisch ondoorvoerbaar zijn, als men tegen iederen mogelijken recidivestam moest immuniseeren. Ook voor het erfelijkheidsonderzoek zijn de gevonden feiten van beteekenis.

Samenvatting:

Volgens Schilling en Schreck is het experimenteele bewijs gebracht dat:

1) de passage door den natuurlijke overbrenger van trypan. brucei, de *glossina morsitans*, een in zijn antigene eigenschappen sterk veranderde oude laboratoriumstam wat betreft zijn gevoeligheid tegen immuunsera energisch beïnvloed. Daar deze gevoeligheid voor de antilichamen van

het serum juist het kenteeken der „uitgangs-“ en der „recidive“-stammen is, zoo is de slotsom geoorloofd, dat de passage door de glossina den veranderden „recidive“ stam in een „genuine“ stam teruggevormd heeft.

2) dat deze teruggevormde stam in zijn beïnvloedbaarheid door antilichamenhoudende sera met echte „genuine“ stammen overeenstemt.

Tenslotte mogen hier volgen eenige waarnemingen in de literatuur medegedeeld uit de practijk, die aangeven het al of niet waarschijnlijk zijn van het bestaan blijven van geneesmiddelvastheid na passage door de natuurlijke overbrengers. Zooals reeds in de inleiding werd gezegd, zijn weliswaar nog geen aanwijzingen beschikbaar, dat werkelijk in bepaalde streken, waar de bestrijding van surra met geneesmiddelen reeds een tiental jaren geschiedt, thans de resultaten minder zijn dan vroeger, maar wel bestaan dergelijke aanwijzingen uit de literatuur omtrent de bestrijding van de slaapziekte, van syphilis en van malaria. (R o d e n w a l d t).

R o d e n w a l d t vermeldt hieromtrent, wat betreft de bestrijding van malaria met chinine, dat men in landen als Albanië, Italië, vroeger met lage normale prophylactische en therapeutische doseeringen uitkwam, dat men later steeds hogere doseeringen moest toepassen, tot men gedwongen werd naar combinatie met andere hoewel gevaarlijker medicamenten over te gaan (salvarsan). In die landen wordt n.l. chinine gebruikt in te geringe hoeveelheden slechts zoolang als koorts bestaat, daarna wordt direct het gebruik gestopt. De bevolking is chronisch malariaziek, het tot standkomen van een immuniteit wordt ook verlangzaamd. In de tropen daarentegen wordt in het geheel geen chinine door de inheemschen gebruikt, door de infectie in de jeugd beschikken zij vaak over een immuniteit.

B a r l o v a t z vermeldt waargenomen gevallen van arseenresistentie van slaapziektetrypanosomen en trekt uit zijn waarnemingen uit de practijk, dus uit de epidemiologie, de conclusie dat de arseenresistente trypanosomen over te brengen zijn van mensch op mensch. In een dorp gelegen in een streek, waar geen slaapziekte voorkwam, waren na het zich komen vestigen van een patiënt met arseenresistente slaapziekte meerdere gevallen van slaapziekte voorgekomen, waarbij bij alle arseenresistentie bleek.

Aangenomen moest worden dat al die nieuwe gevallen met arseenresistente trypanosomen, afkomstig van den geïmporteerden patiënt, waren geïnficeerd.

B a r l o v a t z vermeldt verder dat in slaapziekestreken 1—5 % gevallen voorkwamen waarbij het arsenicum totaal onwerkzaam is.

e) Hoe is de werking van de chemotherapeutica?

Wat is vastheid van een trypanosoom en hoe is het ontstaan ervan te verklaren?

Hoe ontstaan geneesmiddelvaste stammen van trypanosomen?

Ten eerste dient de vraag gesteld te worden, als we het willen hebben over geneesmiddelvastheid: „Hoe is de werking van chemotherapeutica?”

Van Ehrlich stamt het idee van de „therapia sterilisans magna”. Hij stelde zich dus voor in vivo te bereiken, wat in vitro ook gebeurt, n.l. het absoluut doden van alle parasieten in een gastheer door een bepaalde dosis van een geneesmiddel toe te dienen, de „directe geneesmiddelwerking”.

Over de manier waarop de binding en hechting der medicamenten precies tot schaden of doden van de parasietencellen voert, weten we eigenlijk niets. Wel worden met behulp van de colloïdchemie hierover voorstellingen gevormd.

De gastheer zelf en zijn medewerking tot de genezing wordt hier dus buiten beschouwing gelaten. Dit begrip van werking van het geneesmiddel, als zoodanig direct op de parasieten, gaat geheel op bijv. voor naganol, wat in vitro evengoed doodend werkt als in vivo.

Hoewel andere onderzoekers o.a. Voeghtlin en medewerkers het bij de arsenicaliëngroep hebben over het feit dat eerst in het lichaam van den gastheer de parasiticide vorm n.l. het oxydatieproduct ontstaat, is dit toch strikt genomen ook weer onder te brengen onder het begrip directe geneesmiddelwerking, het omgezette product werkt dan direct doodend op de parasieten.

Kunnen we dit omgevormde product direct als zoodanig toedienen dan zouden we den gastheer wel veel in zijn strijd tegen de parasieten kunnen helpen. Atoxyl werkt in vitro niet doodend op de parasieten, in vivo wel.

Onder de eigenlijke „indirecte geneesmiddelwerking” wordt verstaan het begrip, dat de afweerkrachten van het lichaam gemobiliseerd worden door het chemotherapeuticum. Het geneesmiddel doodt een gedeelte van de trypanosomen, gevormde antigenen geven aan-

leiding tot verhoogde vorming van antilichamen, die de parasieten doden.

Een bewijs voor deze redeneering zouden we kunnen zien in de proeven van Schnitzer en Silberstein.

Muizen worden geïnfecteerd gelijktijdig met een vasten en een gevoeligen trypanosomenstam. Bij flink positief bloedsbeeld zijn nu die muizen te genezen door een dosis van geneesmiddel, waartegen de ingebrachte vaste trypanosomen alleen absoluut vast zouden zijn, dus muizen enkel en alleen geïnfecteerd met vasten stam zouden ondanks het toedienen van die dosis van het chemotherapeuticum sterven.

Dit wordt door hen verklaard volgens de bovengenoemde theorie over de werking van antilichamen, die dan de geneesmiddelvaste parasieten doden. Het gelukte slechts als de vaste en normale stam immunologisch identiek waren.

Wat is nu vastheid van een trypanosoom en hoe is het ontstaan ervan te verklaren?

Men spreekt van vastheid van parasieten tegen een geneesmiddel, als een hogere dosis dan normaal niet in staat is bij een bepaalden gastheer de parasieten te doden.

Maximale vastheid bestaat als de dosis maxima tolerata geen uitwerking op de parasieten heeft.

Ehrlich deed de eerste waarneming dat experimenteel bij trypanosomen een vastheid kon worden verwekt tegen diverse chemotherapeutica (1909). Reeds vroeger was gemerkt dat verschil in gevoeligheid van stammen van dezelfde micro-organismen tegenover een chemicalium bestond. Ehrlich was de eerste die het verschijnsel in de finesses bestudeerde en de waargenomen feiten ter verklaring ondergebracht heeft in een theorie. De reeds gefundeerde „receptorentheorie”, die ter verklaring van feiten op het gebied van de immuniteit diende, werd verder als „chemoreceptorentheorie” pasklaar gemaakt voor verklaring van het verschijnsel van geneesmiddelvastheid.

Het gif zou zich dus beginnen te binden aan de receptoren van de trypanosomen, deze reageeren daarop met een overproductie van

deze receptoren, die dan afgestooten worden en in het bloed overgaand, de rest van het gif onschadelijk maken.

Door dezen prikkel hebben de parasieten dus de eigenschap verkregen groote hoeveelheden van het gif te kunnen binden, ze zijn vast geworden. Ehrlich beschouwde de gifvastheid als streng specifiek. Zijn trypanosomenstammen dus vast tegen bepaalde geneesmiddelen, dan zijn ze dat niet tegen andere.

De vaste stammen vormen aldus een „cribrum therapeuticum”, een therapeutische zeef, een middel om vast te stellen, tot welke groep een of ander geneesmiddel behoort, bijv. arsenicaliën, antimoon-groep enz.

Duidelijk is later gebleken ook wel aan Ehrlich zelf, dat vastheid niet zoo streng specifiek is, een overgrijpen van de vastheid komt vaak voor, met Bayer 205 zou een soort „Panfestigheid” na korten tijd bereikt worden.

Volgens Ehrlich gaat het bij verkrijging van een geneesmiddel-vastheid om een vermindering van de aviditeit der betreffende chemoceptoren tot de medicamenten.

Deze hypothese maakte Neven plausibel door zijn proeven met gifvaste trypanosomenstammen, die hij in vitro door het betreffende middel nog wel beïnvloeden kon. Er waren echter voor het doden der parasieten dergelijke groote hoeveelheden noodig dat bij de dierproef de dosis tolerata ver overschreden zou worden. Bij maximaal gifvaste stammen is de aviditeit zoover verminderd dat de parasitotropie van het chemicalium in vergelijking met zijn organotropie nul geworden is.

Latere schrijvers o.a. Kolle (1914) vinden dat deze chemoceptorentheorie als grondprincipe niet zou behoeven te worden veranderd, alleen zouden ze de opvattingen van Ehrlich willen aanpassen aan de nieuwere colloidchemische voorstellingen.

Volgens Voeghtlin, Dyer en Miller zelf is de chemoceptorentheorie van Ehrlich veel te simpel om alle verschijnselen te verklaren en zij nemen als voorbeeld de werking van arsenicaliën om de opvattingen van Ehrlich te becritiseeren.

Zij vonden dat de werking van arsenicaliën afhankelijk is van de actieve deelname van den gastheer in de productie van de actieve parasiticide modificatie. Volgens hen schenkt Ehrlich te weinig

aandacht aan de veranderingen, die de geneesmiddelen in het lichaam van den gastheer ondergaan.

De trypanocide werking van arsenik hangt af van den staat van oxydatie van de arsenik. Het oxydatieproduct is de actieve vorm van het geneesmiddel.

De werking van arseenoxyde wordt volledig opgeheven door toevoeging van bepaalde sulphhydrylderivaten (glutathion, cysteine).

Deze zijn volgens Hopkins (1921) normale protoplasmabestanddeelen van alle cellen met een actief metabolisme en spelen een belangrijke rol in weefselademing.

De toxische werking van geoxydeerde arsenik is essentieel toe te schrijven aan een binding met de sulphhydrylderivaten van het protoplasma. Dit zou nadeelig beïnvloeden het systeem dat de cel-respiratie regelt, van welke de sulphhydrylverbindingen een integreerend gedeelte vormen. Als genoeg sulphhydryl onttrokken is door het arsenik is de cel geasphyxieerd en sterft.

Trypanosomen bezitten aanpassingsvermogen zooals andere organismen. Dit blijkt uit de overleving bij blootstelling aan subletale concentraties van arsenoxyde in vitro.

Of een trypanosoom zal overleven of sterven hangt af van het feit of het systeem van sulphhydryl een voldoende excès (boven het physiologische) heeft voor combinatie met arsenik.

Het is interessant de resultaten nog te noteeren van de recente proeven van Yorke, Murgatroyd en Hawking (1931).

Volgens Voegtlin's hypothese zou een vaste stam door zijn excès van sulphhydrylverbindingen meer van een arsenicalium kunnen absorbeeren dan een normaal gevoelige stam. Volgens Ehrlich's theorie zou resistentie berusten op een verminderde aviditeit van zijn chemoceptoren, de vaste stam zou dus minder absorbeeren dan de normale stam.

In een broedstoof bij 37° worden gezet in gelijke concentraties van gereduceerd tryparsamide een normale en een atoxylvaste stam van trypanosomen. Na eenigen tijd wordt de sterkte van de tryparsamideoplossingen gemeten.

Nu blijkt dat de normale trypanosomen veel van het middel hebben geabsorbeerd, de concentratie van de oplossing is sterk verminderd, terwijl de atoxylvaste stam bijna niets van het middel uit het medium heeft opgenomen.

Dit klopt dus met Ehrlich's theorie en eveneens met een bepaalde hypothese, die vastheid verklaart door verminderde doordringbaarheid van den parasiet voor het middel.

Het resultaat maakt dus de zoo juist genoemde theorie van Voeghtlin onwaarschijnlijk.

Hoe ontstaan geneesmiddelvaste stammen van trypanosomen?

Gif- en serumvaste stammen werden vroeger algemeen als „mutaties” opgevat. De erfelijkheidsleer verstaat onder mutaties veranderingen die op een beïnvloeding der erfactoren, de genen berusten, terwijl veranderingen die slechts den uiterlijken vorm der organismen betreffen, maar niet erfelijk zijn, als modificaties worden aangeduid. Het erfelijke karakter van een omvorming toont zich slechts daarin, dat ze een bevruchtigsactie over blijft bestaan. Zooals Jollos door zijn onderzoekingen bij infusoriën heeft aangetoond, kan een modificatie vele deelingen over behouden blijven. Zoo'n „Dauermodifikation”, zooals Jollos het genoemd heeft, kan dan tenslotte weer tot het normale terugkeeren wat vooral door een ernstige verandering van omstandigheden begunstigd wordt. Plotseling verdwijnt de eigenschap van vastheid door een conjugatie bij de Paramaeciën. Ook de gif- en serumvaste stammen deden zich in vele gevallen voor als Dauermodifikationen, doordat de veranderingen na langer bestaan weer verdwijnen konden. Bevruchtigsverschijnselen schijnen bij flagellaten te ontbreken, of zijn onbekend.

Prowazek zegt hierover o.a. dat de wereld staat onder de impressie van het werk van een experimentator als H. de Vries, en in deze mutatieperiode overal zoekt naar mutanten. Het is daarom niet verwonderlijk dat eenige biologen en zoölogen ook van mutaties der trypanosomen spreken. Men moet een „mitigatie” van een virus en zijn „mutatie” echter wel onderscheiden. Zoodra een trypanosoom in een anderen gastheer gebracht wordt, veranderen de eigenschappen, treedt echter nog geen mutatie op, want deze eigenschappen ontstaan niet plotseling en blijven niet constant. Ook het ontstaan van serum- en-atoxylvaste stammen in den zin van Ehrlich, Kleine, Mesnil is volgens Pro-

w a z e k niet als een mutatie van plotselingen aard, maar als een plotselinge aanpassing op te vatten.

Er bestaat een strijd tusschen de theorie van „selectie” of Auslese en het idee van aanpassen, „gewennen aan vergiften”. De theorie van selectie wordt aangevoerd o.a. door R o d e n w a l d t ter verklaring van het ontstaan van chininevaste malaria in streken van den Balkan, waar chinine wordt gebruikt in te kleine doseeringen, dus de zwakke parasieten worden gedood, de resistente blijven over en vormen geneesmiddelvaste stammen.

De theorie van aanpassing van de parasieten aan geneesmiddelen, o.a. door M o r g e n r o t h verdedigd, zegt dat de parasieten geleidelijk gewennen aan de vergiften. Deze beide opvattingen zouden dus kunnen worden gelijk gesteld met de begrippen resp. mutatie (sprongsgewijze selectie) en modificatie (geleidelijke aanpassing).

Verschillende voorbeelden uit de literatuur zijn aan te halen, welke bewijzen dat in iederen stam van protozoën of bacteriën primair vastere individuen voorkomen.

L. H. M a r k s ziet in zijn normalen stam bac. suipestifer bij isoleeren van één enkele bacterie koloniën ontstaan met verschillende resistentie tegenover arsenigzuren. Slechts door systematisch gewennen echter verkrijgt hij een maximale vastheid.

Zooals bij de meeste vraagstukken zullen deze uiterste meeningen m.i. geen van tweeën absoluut alleen juist zijn en zal de waarheid in het midden liggen.

J o l l o s vindt bij zijn proeven met *Paramaecium caudatum* en arsenigzuren, dat door de selectie van de uiterste varianten uit een massastam, wel snel de meest weerstandbiedende „reine Liniën” geïsoleerd kunnen worden, daarin echter bleek de herhaalde selectie niets uit te werken, zooals in de bekende proeven van J o h a n n s e n.

Ook R o b e r t s o n (1920) neemt aan dat er *primair vastere trypanosomenindividuen in iederen stam voorkomen, welke voortbestaan na iedere behandeling met geneesmiddel, in de diverse passages geleidelijk nog resistenter worden en aldus een maximaal vasten stam geven.*

Dat er primair vastere individuen bestaan, wordt door haar be-

wezen met proeven met *Bodo caudatus*, een flagellaat van niet pathogenen of facultatief parasietischen aard op plaatcultures met acriflavine.

Cultures gegroeid van een enkele *Bodo caudatus* geïsoleerd van den onbehandelden massastam, geven verschillende graden van natuurlijke resistentie tegen chemicaliën te zien. De onbehandelde massastam n.l. groeide nooit in platen, bevattende acriflavine 1/5000, wel in 1/10000 tot 1/50000 met moeite. De meest resistente culturen gegroeid van enkele isolaties, groeiden wel in 1/5000 maar niet in 1/2000.

Deze natuurlijke verscheidenheid in resistentie is van groot belang voor de verklaring van het verdere ontstaan van een maximaal vasten stam.

Stammen, die resistent gemaakt waren, konden leven in acriflavine 1/1500, geen ontwikkeling werd verkregen in 1/1000.

Door haar proeven is waarschijnlijk gemaakt dat geneesmiddelvastheid het gevolg is van een wisselwerking van selectieve overerving en de modificatie van de eigenschappen van de protozoo door ontwikkeling in chemicalium.

Een hoge resistentie eenmaal verkregen blijft behouden na doorgevoerd kweken in geneesmiddelvrij media. Een gradueel verlies treedt op, gedeeltelijk door als het ware een vermindering van de verkregen eigenschappen, gedeeltelijk door het overleven van varianten van mindere resistentie tegen acriflavine maar van hoogere vitaliteit in andere opzichten.

Het verlies van resistentie is zeer versneld in „ééncelculturen” („clonen”) geïsoleerd van de resistente stammen, maar tot nu heeft geen enkele behandelde stam geheel zijn vastheid verloren.

Aan dit gegeven is door mij het denkbeeld ontleend van de versnelling van verlies van resistentie van vaste trypanosomenstammen bij overbrenging van enkele trypanosomen, „imitatie natuurlijke overbrenging”.

Bodo caudatus is een organisme zonder conjugatie en daarom zonder biparentale erfelijkheid en mist dus het reorganiseerende effect van zulk een periodieke sluiting van den cyclus. Het is een voorbeeld van een labiel organisme, dat progressief kan worden veranderd binnen zekere limieten onder den invloed van de omgeving.

In strijd met een zuivere selectietheorie was dat een cultuur gepasseerd door 1/4000 acriflavine sterk resistenter daardoor was geworden en dezelfde cultuur gepasseerd door 1/200, overlevende met groote moeite, minder

resistent was dan in het eerste geval en zelfs minder dan de moeder-cultuur voor blootstelling aan het gif.

Hetzelfde verschijnsel zien we bij het vastmaken van trypanosomen tegen geneesmiddelen. Een kleine dosis geeft den trypanosomen een grooteren stoot in de richting van resistentie dan een groote dosis. Als we selectie aannamen als uitsluitende verklaring van het vastwordingsverschijnsel, zou echter toch een grootere dosis meer invloed moeten hebben, aangezien dan alle minder resistente parasieten worden gedood.

In de literatuur van chemotherapie en vastheid worden een massa interessante maar dikwijls elkaar tegensprekende resultaten van proeven vermeld.

Een stam van trypanosomen wordt te veel beschouwd als een eenheid van individuen met allemaal dezelfde eigenschappen en niet genoeg als een populatie van individuen, die onderling verschillend zijn.

Hiermee wordt bedoeld dat in een geneesmiddelvasten stam individuen voorkomen van maximale en andere van minimale resistentie, in een normalen stam exemplaren van trypanosomen met groote gevoeligheid en tevens resistentere individuen, met allerlei overgangen daar tusschen.

Verder is men te veel geneigd vastheid te beschouwen als een absoluut karakter van den stam en niet als een relatief iets.

De stam kan dus voortdurend worden gewijzigd in zijn uiterlijk waarneembare eigenschappen door allerlei invloeden en omstandigheden.

Zoo kon bijv. bij mijn proeven een trypanosomenstam vast zijn in de muis, dit niet of minder zijn tijdens en direct na zijn passage door cavia.

Tijdens het verblijf van den vasten stam in de muis overheerschten de maximaal vaste trypanosomen. In de cavia waren andere trypanosomen gaan overgroeien, beter aangepast aan de cavia en zeer wel levensvatbaar in alle mogelijke opzichten, maar minder geneesmiddelresistent.

Mesnil en Brimont (1908) hadden evenzoo een atoxyl-vasten stam in muizen, die tijdens passage in ratten gevoelig was.

Enkele van die in de muis geacclamatiseerde trypanosomen waren natuurlijk nog wel aanwezig en gingen daarna tijdens het opnieuw verblijven van den stam in de muis weer overgroeien. Dit weer terugkomen van de vastheid, zonder dat weer opnieuw aan geneesmiddelen wordt gewend, wordt een enkele maal in de literatuur beschreven, (V o e g h t l i n, D y e r en M i l l e r) is in mijn eigen proeven ook duidelijk aan het licht gekomen en beschreven in Hoofdstuk II.

Een naganastam, door Mesnil en Brimont vastgemaakt tegen arsacatin, bleek daardoor tevens een maximale antimoovastheid te bezitten.

Na het stopzetten der arsacatinbehandeling ging de antimoovastheid verloren, terwijl de arsacatinvastheid zich niet veranderde.

Door eenmalige behandeling met braakwijnsteen, niet echter door meerdere wekenlange behandeling met arsacatin, werd een antimoovastheid teruggewonnen. De arsacatinstam had, nadat hij onbehandeld 6 weken doorgevoerd was, zijn antimoovastheid verloren. Een antimoovastheid kon nu met één slag teruggewonnen worden. $\frac{3}{4}$ uur na de behandeling van een muis met tartarus stibiatus, toen de trypanosomen reeds van +++ op + waren gekomen, werd nl. overgespoten op een 2e muis, waarbij de stam weer antimoovast was. Dit nu kan wel slechts door het aannemen van een *zuiver selectie-proces* verklaard worden. In den stam moeten van den beginne af zoowel antimoovaste, als gevoelige individuen voorhanden zijn geweest. Ent men kort voor het microscopisch aanwijsbaar verdwijnen der trypanosomen over op een muis, dan bevinden zich onder de overgebrachte trypanosomen naar verhouding meer antimoovaste individuen, daar de niet vaste reeds voor het grootste gedeelte vernietigd geworden zijn. In de nieuwe muis ontwikkelen zich overwegend antimoovaste trypanosomen, die bij vernieuwde braakwijnsteenbehandeling door vervollediging van de selectie zich alleen vermeerderen. Bij de uitgangsmuis vinden we na de antimoovbehandeling in het bloed geen trypanosomen, omdat de enkele antimoovaste individuen bij het onderzoek tijdelijk over het hoofd worden gezien. Als echter bij deze muis na eenige dagen bij het inzetten van de recidive weer trypanosomen microscopisch aantoonbaar worden, dan bestaan die overwegend uit de nakomelingschap van antimoovaste individuen, de recidive reageert niet meer op de braakwijnsteenbehandeling, is vast geworden.

Voor de selectie, waaraan bij het ontstaan van vaste stammen te weinig wordt gedacht, geven deze gevallen een zeer goed voorbeeld.

HOOFDSTUK II.

EIGEN ONDERZOEK.

a) Inleiding.

Voor het onderzoek werd gebruikt de laboratoriumsurrastam „Buitenzorg P₄” die in Juni 1928 door Dr. O. Nieschulz uit een spontaan geïnfecteerd paard in West-Java geïsoleerd en einde 1928 naar Nederland medegenomen was.

De stam werd sindsdien in caviae aangehouden, maar werd verschillende keeren door runderen en paarden gepasseerd, om de oorspronkelijke biologische eigenschappen zoo mogelijk behouden te doen blijven. Voor het laatst werd hij door een paard gepasseerd in Januari 1931.

De stam kan, ook volgens mijn ervaringen bij de proeven opgedaan, als relatief arseen-resistent worden beschouwd. (Bij een normalen stam van nagana is volgens opgaven de minimale curatieve dosis of recidivedosis 50 mg per K.G. lichaamsgewicht muis, bij genoemden laboratoriumsurrastam is deze 200 mg).

De proefdieren, waarin de stam systematisch aan geneesmiddelen gewend werd, waren muizen.

De dosis van de toegepaste geneesmiddelen werd altijd uitgedrukt in milligrammen per K.G. lichaamsgewicht proefdieren.

Gerekend werd op een injectie subcutaan van een hoeveelheid oplossing van 0,4 cc per mus van 20 gram, dus kwam voor bijv. 1 mgr per K.G. muis, omgerekend de volgende standaardoplossing:

Dosis K.G.	Dosis muis van 20 gram	Standaardoplossing
1 mgr	0,02 mgr in 0,4 cc	20 mgr in 400 cc

Bij een gewicht van een muis van 20 gram kreeg deze dus altijd 0,4 cc van de voorgeschreven standaardoplossing. Had het dier een

gewicht van 30 gram, dan kreeg het 0,6 cc oplossing geïnjecteerd, enz.

De geneesmiddelen werden dagelijks versch bereid. 20 mgr was de geringste hoeveelheid, die voor elke doseering genomen werd om weegfouten te voorkomen.

b) Het verkrijgen van geneesmiddelvaste stammen.

Ehrlich en zijn medewerkers gebruikten voor het maken van geneesmiddelvaste stammen de volgende methode:

De geïnfecteerde proefdieren werden met een niet steriliserende, zgn. subtherapeutische dosis geneesmiddel behandeld, optredende recidiven werden telkens op nieuwe proefdieren geënt en door voortgezette behandeling werd door een regelmatige stijging der dosis een gewennen aan het geneesmiddel bereikt.

Het maken van de geneesmiddelvaste stammen geschiedde door mij volgens een methode, afwijkende in zooverre van de door Ehrlich gevolgde, dat niet gewacht werd op optredende recidive bij de proefdieren. De dieren werden bij flink positief bloedbeeld (5 à 10 trypanosomen per gezichtsveld in natiefpreparaat) ingespoten met het geneesmiddel; den volgenden dag, als de trypanosomen ondanks de injectie zich vermeerderd hadden, werd bloed overgespoten op nieuwe proefdieren, deze weer bij flink positief bloedbeeld behandeld met een iets hogere dosis geneesmiddel, enz. (1 reservemuis werd altijd ingespoten met bloed van de vorige serie van muizen op den dag voor de injectie van deze met geneesmiddelen, om bij een eventueel negatief worden van het bloed van die dieren toch nog den stam te behouden. Gebeurde dit niet, dan zou de kans bestaan dat weer van voren af moest worden begonnen, wat een enkele keer in het begin van het werk door intercurrent sterven van proefdieren wel is voorgekomen).

De proeven werden geadministreerd met behulp van een kaart-systeem. Over het geheele verloop van de proeven werd op de kaarten waarop de proefdieren werden geregistreerd, aangeteekend de graad van positief zijn van het bloedbeeld volgens den volgenden maatstaf:

— Geen trypanosomen in praeparaat. (Minstens werden altijd 25 gezichtsvelden doorzocht).

+ Na lang zoeken in ongeveer 25 gezichtsvelden een enkele trypanosoom gezien.

++ 1 trypanosoom per gezichtsveld.

+++ 5 à 10 trypanosomen per gezichtsveld.

++++ Zeer vele trypanosomen per gezichtsveld.

Alles bij vergrooting oc. 2, obj. 8, (Leitz) in natiefpraeparaten.

Het spreekt wel vanzelf, dat deze methode, waarbij niet op recidive behoefde gewacht te worden, een groote tijdsbesparing geeft. Deze methode werd aangegeven gevonden door Collier (1928). Als eenmaal een vastheid is gekweekt, dan blijft die eigenschap van den trypanosomenstam bestaan bij overspuiten van bloed van proefdier op proefdier, zonder verder in aanraking brengen met chemicaliën, dus bij „zonder behandeling” aanhouden van den stam.

Fr. Leupold bereikte een Bayer 205 vastheid na 50 passages waarbij recidivedosis is 25 mg per K.G. muis, uitgaande van een normaalstam waarbij deze dosis 1 mgr is (curatieve dosis 1,25 mgr.).

„Recidivedosis” = minimale effectieve dosis = Dosis juist voldoende om de trypanosomen uit de bloedsbaan te doen verdwijnen. Na eenigen tijd recidiveeren de trypanosomen, zijn opnieuw in het bloed aanwezig. „Curatieve dosis” is de dosis voldoende om de trypanosomen definitief uit de bloedsbaan te doen verdwijnen.

In de 100e passage had de stam een maximale vastheid bereikt, nl. 333 mgr was niet meer in staat het normale infectieverloop van den stam te verhinderen.

Als men bedenkt dat bij den normaal gevoeligen uitgangsstam de chemotherapeutische quotient: Dosis minimalis curativa: Dosis tolerata 1 : 333 bedroeg, dan was het aantal der passages dat noodig was om tot de verhouding 1 : 1 te geraken niet zeer groot.

Want bij vroegere vastmakingsproeven, bijv. met arsenicaliën, kon dikwijls eerst in 150—200 passages maximale vastheid bereikt worden, hoewel het hier dikwijls slechts om een overwinning van een verhouding van 1 : 5 hoogstens 1 : 10 ging.

Bij de proeven van Leupold zou dus bewezen zijn dat een vastheid van trypanosomen die oorspronkelijk tegen Bayer 205 zeer gevoelig waren, vrij gemakkelijk te verkrijgen is.

Bij proeven van Leupold bleek verder dat bij simultaan toepassen van Bayer 205 en arsacetin geen vastheid tegen Bayer 205

optrad. Hoewel arsacetin geen bijzondere waarde als geneesmiddel bij de surra schijnt te hebben, werden door mij combinatieproeven van Bayer 205 met arsacetin verricht, teneinde de resultaten verkregen hiermede door Leupold bij een nagana-stam, te vergelijken met die bij den surra-stam.

Waar in Ned.-Indië de combinatie naganol-atoxyl gebruikt wordt, werd tevens een proef ingezet met deze middelen in een simultane combinatieproef.

Het maken van den naganol-arsacetin vasten stam.

Aangevangen werd met de doses $\frac{1}{2}$ mg naganol plus 40 mgr arsacetin gecombineerd per K.G. lichaamsgewicht muis, zijnde beiden subtherapeutische doseeringen. ($\frac{1}{2}$ mgr Naganol was ook de toegepaste dosis bij de proeven van Leupold).

Voor den laboratorium-surrastam is de recidivedosis van naganol 1 mgr, (zooals bij genoemden Nagana-stam van Leupold), terwijl de recidivedosis van arsacetin 400 mgr is.

De laboratoriumstam is dus betrekkelijk sterk arseenvast van nature, want bij den naganastam van Leupold is de recidivedosis van arsacetin slechts 100 mgr.

De dosis naganol werd in de serie steeds gehouden op $\frac{1}{2}$ mgr per K.G. muis, de dosis arsacetin opgevoerd en wel tot 1000 mgr.

Resultaat:

De surrastam was na een twintigtal passages absoluut vast tegen $\frac{1}{2}$ mgr naganol plus 1000 mgr arsacetin gecombineerd per K.G. muis (dosis tolerata arsacetin 1250 mg).

Zooals reeds gezegd spreken we van „absolute vastheid” als de trypanosomen zich rechtstreeks in het bloed vermeederen ondanks het chemotherapeuticum. „Relatieve vastheid” bezitten ze als ze wel verdwijnen uit het bloed na injectie van het chemotherapeuticum, maar als dan toch later recidive optreedt.

Na 7 passages bleek bij een contrôle de stam absoluut vast tegen 1,5 mgr naganol plus 150 mgr arsacetin gecombineerd, d.w.z. de trypanosomen vermeederden zich ondanks deze doses, terwijl de recidive dosis van den uitgangsstam 1 mgr naganol was.

Een zekere mate van vastheid tegen naganol bleek dus te zijn opgetreden door het gewinnen van den stam aan subtherapeutische doses naganol en hogere dosis arsacetin.

Dit resultaat komt dus niet geheel overeen met dat van Leupold, die bij een gecombineerde behandeling van Bayer 205 gelijktijdig met arsacetin juist een overgevoeligheid van trypanosomen kreeg tegenover Bayer 205, zoodat betrekkelijk gereduceerde doseeringen nog een steriliseerende werking uitoefenden.

Het maken van den naganol-atoxyl vasten stam.

Begonnen werd met de dosis $\frac{1}{2}$ mgr naganol plus 5 mgr atoxyl gecombineerd per K.G. lichaamsgewicht muis. Voor den surrastam in ons laboratorium aangehouden, was de recidivedosis voor atoxyl 200 mgr per K.G. muis, zoodat wederom bleek dat de stam dus betrekkelijk sterk arseenvast van nature is, zooals vele oude laboratoriumstammen. (Bij den naganastam van Leupold is de recidivedosis voor atoxyl 50 mgr).

De dosis naganol werd in de serie steeds gehouden op $\frac{1}{2}$ mgr per K.G. muis, de dosis atoxyl opgevoerd en wel tot 500 mgr.

Resultaat:

De surrastam was na een dertiental passages absoluut vast tegen $\frac{1}{2}$ mgr naganol plus 500 mgr atoxyl gecombineerd (dosis tolerata atoxyl is 1000 mgr).

De stam behield daarna bij overspuiten in muizen zonder verdere behandeling met geneesmiddelen gedurende ruim 1 jaar, dus tot het beëindigen der proeven, denzelfden graad van vastheid tegen $\frac{1}{2}$ mgr naganol plus 500 mgr atoxyl gecombineerd. Later bleek na een veertigtal passages onbehandeld aanhouden in muizen zelfs een vastheid tegen 1000 mgr atoxyl te bestaan, dus een absolute maximale vastheid tegen atoxyl.

Maximale vastheid beteekent dat de trypanosomen zelfs niet ten gronde gaan door de dosis tolerata van het therapeuticum voor dien bepaalden gastheer.

Bij den normalen laboratoriumstam bedroeg de „chemotherapeutische quotient” voor atoxyl 1 : 5, het aantal passages dat noo-

dig was om tot de verhouding 1 : 2 en later ook tot 1 : 1 te geraken was dus niet zeer groot.

Bij een contrôle van den vasten stam in de 16e passage bleek een absolute vastheid tegen een dosis van 1,5 mgr naganol te bestaan. Hier moet tevens nog vermeld worden, dat bij een contrôle van dezen stam die steeds in muizen aangehouden was, tot October 1931, dus na 45 muizenpassages, resistentie bleek te bestaan tegen 5 mgr naganol en nog later ook tegen 10 mg en 15 mg naganol.

Deze stam, die dus was blootgesteld aan subtherapeutische doseringen naganol plus hoge dosis atoxyl, (*naganol*)-*atoxyl* vasten stam, had daardoor naast zijn *maximale atoxylvastheid* tevens een *hoge mate van naganolvastheid* verkregen.

Aangezien in deze serie dus vrij spoedig een hoogen graad van atoxyl-vastheid bereikt was, en op dat moment van werken in de naganolserie nog geen voldoende resistentie was bereikt, werd besloten met dezen naganol-atoxylvasten stam reeds vooraf een reeks proeven in te zetten, tot het nagaan van diverse principieele kwesties.

Deze proeven zijn vermeld onder IIc, IId, IIe en IIf.

Het betreft het passeeren van den vasten stam door een ander soort proefdieren dan de muis, het mengen van vasten en normalen stam in cavia, proeven van imitatie natuurlijke overbrenging en van overbrenging door middel van insecten, daarna het nagaan van den invloed daardoor op de resistentie uitgeoefend.

Ten slotte werd nog de (*naganol*)-*atoxyl* vaste stam die dus tegen 15 mg naganol vast was, en maximaal vast tegen atoxyl, gecontrôleerd tegen *andere medicamenten*. Hij bleek daarbij maximaal *vast tegen* tryptaflavin, neostibosan, tryparsamide, neosilbersalvarsan, kalium tantalicum, natriumarseniet.

Gevoelig bleek hij te zijn voor tartarus-emeticus, antimosan en, neoantimosan = fuadin, het nieuwste antimoonpraeparaat.

Hieruit blijkt duidelijk de wenschelijkheid van combineeren in de praktijk van naganol en atoxyl met antimoonpraeparaten en wel tartarus emeticus, antimosan of neoantimosan (fuadin).

Dezelfde resultaten kreeg ik ook met den naganolvasten stam. De naganol-atoxylvaste stam bleek voor tart.-emeticus toch wel

iets vaster dan de naganolvaste stam, echter is het verschil te klein om daarop conclusies te baseeren.

Arseenvastheid geeft dus ook min of meer een antimoonvastheid, zooals ook uit de literatuur over slaapziekte wel wordt aangegeven.

Het maken van den naganol-vasten stam.

Het maken van den naganol-vasten stam ondervond nogal moeilijkheden en was zeer tijdroovend, hoewel algemeen in de literatuur wordt aangegeven dat het vastmaken tegen een middel als het naganol, dat langzaam inwerkt en lang in het lichaam van den gastheer blijft circuleeren, gemakkelijker gaat dan tegen een middel, dat snel werkt en uitgescheiden wordt, zooals b.v. het atoxyl.

Bij deze serie proeven ter verkrijging van een naganol-vasten stam werden in den beginne dezelfde ervaringen opgedaan, die ook B a k k e r (1930) beschrijft. Na een tiental passages van gewennen aan het geneesmiddel was een „schijnbare vastheid” verkregen tegen 6 mgr naganol, d.w.z. de trypanosomen verdwenen langzaam uit het bloed na toediening van deze doseering naganol en waren dus niet absoluut vast daartegen. Een relatieve vastheid handhaafde zich soms één passage daarna, maar verdween dan weer.

Den dag na de behandeling werd telkens bloed van de behandelde muizen overgespoten op nieuwe muizen. Deze dieren vertoonden dan na langen incubatietijd (7 dagen) trypanosomen in het bloed, (gecontrôleerd op natiefpraeparaten). Een absolute vastheid van deze trypanosomen bleek dan zelfs nog niet te bestaan tegenover 2 mgr naganol. Muis 936 behandeld met 4 mgr kreeg recidive na 10 dagen, dus een relatieve vastheid tegen 4 mgr was aanwezig. Vermoed werd, dat de opklimming van de dosis naganol in den stam te vlug was gegaan.

Dat door het zich gewennen aan kleine dosis gif een grootere vastheid kan worden verkregen dan door te groote doseeringen toe te passen, is verder ook uit de literatuur bekend:

R o b e r t s o n vermeldt, dat een cultuur van *Bodo caudatus* gepasseerd door acriflavine 1 : 4000 sterk resistent daardoor was geworden, en dezelfde cultuur gepasseerd door acriflavine 1 : 200, daarin met groote moeite overlevende, minder resistent was dan in het eerste geval en zelfs minder dan de moedercultuur vòòr de blootstelling aan het gif.

Jollos vindt bij zijn proeven met *Paramaecium caudatum* en arsenig-zuren dat door het selecteeren door eenige uren laten inwerken van overdoodelijke dosis geen vastheid te bereiken is, wel door langdurig laten gewennen aan lagere doseeringen.

Bij het laten opklimmen van deze doses moet dus zeer langzaam en voorzichtig te werk worden gegaan.

Bij den normaal gevoeligen uitgangsstam bedraagt de minimale curatieve dosis van naganol 1 mgr per K.G. muis.

De dosis tolerata is 400 mgr, dus de chemotherapeutische quotiënt van naganol is 1 : 400.

De „stam” werd relatief vast tegen 4 mgr na 10 passages, en werd daarna „gedeponeerd in cavia's”.

Ter verklaring van deze uitdrukking het volgende: Zooals reeds werd medegedeeld, heeft de surra in de cavia een zeer chronisch verloop. De dieren blijven 1 à 2 maanden in leven.

De surrastam Buitenzorg P₄ wordt dan ook in cavia's op het laboratorium aangehouden. Een serie van 3 cavia's wordt subcutaan ingespoten met bloed verdund met physiolog. Na Cl. Bij sterven van 1 van de serie van 3 cavia's wordt van de andere 2 bloed overgespoten op een nieuwe serie van 3 cavia's, waarna men weer een maand den tijd heeft. Bij muizen is het ziekteverloop acuut, voor aanhouden in muizen moet om de paar dagen worden overgespoten.

Aangezien dus de relatief naganolvaste stam in verband met andere drukke bezigheden op een gemakkelijke manier, zonder veel werk, moest aangehouden kunnen worden, werd de stam gedeponeerd in cavia's.

Na 2 caviapassages werd de stam opnieuw in muizen teruggebracht, en gewend aan naganol. Opnieuw werd begonnen met de dosis van 1 mgr. Nu werd zeer geleidelijk de dosis verhoogd en telkens als de incubatietijd weer te lang begon te worden (meer dan 3—4 dagen), werd de dosis niet meer verhoogd, gedurende enkele passages gelijk gehouden of verminderd. Aldus werd na 10 passages in muizen een absolute vastheid bereikt van 3 mgr, een 8-tal passages later van 10 mgr, 7 passages daarna van 25 mgr, 3 passages daarna reeds van 40 mgr.

Resultaat:

Na totaal 28 passages in muizen, waartusschen 2 in 2 cavia's, werd dus een absolute vastheid bereikt, tegen 10 mgr — na 35 passages tegen 25 mgr — en na 38 passages tegen 40 mgr.

Hieruit zien we, dat toen eenmaal een zekere vastheid was bereikt, dit sterker resistent worden van den stam min of meer sprongsgewijze ging.

Dit beschrijft ook J o l l o s bij zijn proeven met *Paramecium* en arsenig-zuren, dat zoowel stijging als vermindering van gifvastheid niet geheel geleidelijk verloopt, maar met kleine sprongen tot stand komt.

Deze graad van vastheid n.l. tegen 40 mg naganol per K.G. muis behield de stam bij onbehandeld aanhouden in muizen gedurende enkele maanden. Daarna begon een kleine achteruitgang van de resistentie reeds op te treden, d.w.z. bestond daarna nog slechts tegen 30 mg.

Op het moment van vastheid tegen 40 mg werden met den naganolvasten stam enkele proeven gedaan, die bij den naganol-atoxylvasten stam ook waren verricht, n.l. een serie afgetakt, waarbij steeds met de „enkele trypanosomen overbrenging” werd gewerkt en een serie van overbrengingen door insecten, in dit geval *Stomoxys calcitrans*.

Verder werd caviapassage verricht en hondenpassage. Dit zijn dus enkele proeven uit de reeks die met den naganol-atoxylvasten stam waren verricht. (Zie IIc, IIe en IIf).

Deze *naganolvaste stam* bleek wederkeerig, zooals de atoxylvaste stam een zekere vastheid voor naganol bleek te hebben, ook vast tegen atoxyl, n.l. tegen 1000 mgr, dus *een maximale atoxylvastheid* te bezitten.

Verder werd gecontroleerd, het gedrag van den naganolvasten stam tegenover een aantal *andere geneesmiddelen* dan naganol en atoxyl. Zoo bleek de stam tevens maximaal *vast tegen* tryparsamide (arsenicalium), neosilbersalvarsan, neostibosan (stibiumpraeparaat), natriumarseniet.

Even *gevoelig* als een normale surrastam bleek de naganolvaste

stam voor tartarus emeticus, antimosan en het nieuwste antimoonpraeparaat, het Fuadin = Neo-antimosan.

Hieruit blijkt dus wel een zekere aanwijzing in de richting van wenschelijkheid der toepassing in de praktijk van combineeren van naganol met antimoonpraeparaten, tartarus emeticus, antimosan of neo-antimosan (Fuadin); echter boven werd reeds gezegd niet met neostibosan, een nieuw stibium praeparaat, minder toxisch dan tartarus emeticus, maar blijkbaar daardoor tevens minder trypanocid dan het oorspronkelijke tartarus emeticus.

Vastmaking van trypanosomen tegen naganol door per os toedienen van het middel aan proefdieren:

Behalve de beschreven naganol-vaste stam werd in den tijd toen het vastmaken tegen naganol nog niet vorderde, nog gezocht naar een andere methode van gewennen aan geneesmiddelen.

Door Ehrlich werd nog aangegeven gevonden als de snelste manier om gifvaste trypanosomen te verkrijgen, het „voederen van geneesmiddelen” aan de proefdieren. Zoo kreeg hij na 14 dagen trypanosomen atoxylvast in een muis.

Bij „mijn proeven” werden de muizen bepaalde doseeringen van „naganol per slokdarmsonde toegediend”, en wel in de incubatieperiode.

Een hoeveelheid berekend naar het lichaamsgewicht van de muis werd door middel van een dunne gummikatheter over het einde van een canule aan een injectiespuit geschoven, in de maag geïnjecteerd.

Begonnen werd met 3 mgr per K.G. muis en opgeklommen werd tot 100 mgr in een vijftal passages. Bij contrôle tegen naganol subcutaan toegediend bleek werkelijk vlug een zekere vastheid te zijn ontstaan, reeds na 1 passage tegen 1,5 mgr subcutaan. Na 5 passages ging de stam verloren door sterven van proefdieren.

Opnieuw werd een serieproef ingezet en begonnen met 10 mgr per os. Ook bij deze serie werd weer na een tiental passages opgeklommen tot 100 mgr per os, een zekere vastheid werd waargenomen, namelijk bleek bij een contrôle met 1,5 mgr subcutaan wel het bloedbeeld negatief te worden, na twee weken trad recidive op, een „relatieve” vastheid was dus ontstaan tegen 1,5 mgr subsutaan.

Aangezien dus de resultaten van deze werkwijze ook niet zoo overweldigend waren, als oorspronkelijk werd verwacht, werd deze serieproef niet verder doorgevoerd.

Vastmaking van trypanosomen tegen naganol in caviae.

De naganolstam was in muizen door subcutane toepassing van naganol schijnbaar vastgemaakt tegen 6 mgr, in werkelijkheid had hij een relatieve vastheid van 4 mgr, d.w.z. door 4 mgr verdwenen wel de trypanosomen uit het bloed, maar recidiveerden. Op dat moment werd de stam gedeponeerd in caviae, teneinde tijd beschikbaar te krijgen voor de diverse proeven met den naganol-atoxyl-vasten stam.

Na enkele cavia-passages werd begonnen met een gewinnen van den stam aan naganol in de caviae. Een cavia werd bij optreden van trypanosomen in het bloed subcutaan behandeld met telkens hogere doses, aldus bleken van recidive tot recidive de trypanosomen resistenter te worden tegen het geneesmiddel.

Na bijv. een maand werd van die cavia bloed overgespoten op nieuwe caviae en daarin werden opnieuw telkens bij optredende recidives opklimmende doseeringen naganol geïnjiceerd. Aldus werd een vastheid bereikt tegen 10 mgr naganol per K.G. cavia.

Ook deze serieproef werd niet verder voortgezet, omdat toen in de proef met muizen met meer succes werd gewerkt dan voorheen.

Vastmaking tegen atoxyl alleen.

Dan rest nog te vermelden dat ook werd opgezet een serieproef ter verkrijging van een stam enkel gewend aan atoxyl, in muizen.

Aangezien deze stam na een tiental passages slechts vast was tegen 400 mgr atoxyl per K.G. muis, werd deze serieproef niet verder meer aangehouden.

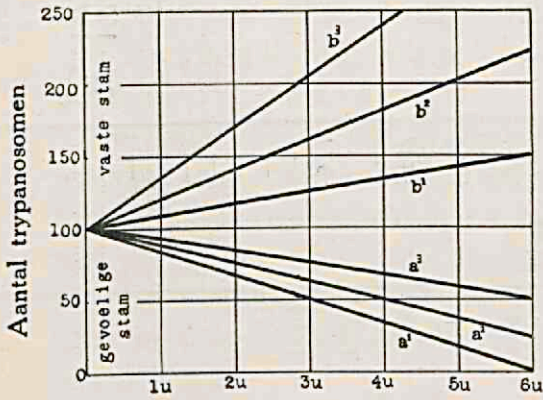
OVERZICHT VAN DE PROEVENINDEELING.
(De cijfers geven aan de nummers van de gecontroleerde proefmuizen).

(NAGANOL)-ATOXYL VASTE STAM.

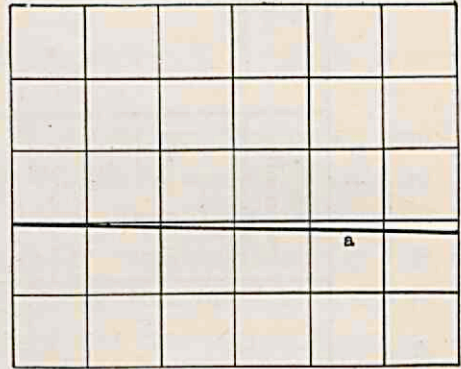
rund	hond hond	rat hond cavia konijn	konijn	cavia cavia cavia cavia	muizen	rat rat rat rat rat	Imitatie natuurlijke overbrenging	Stomoxys calcitrans- overbrenging
970	1063 — 1155 — 1113	1077 — — — — 1273	1096 — 1121 — — — 1225 1226	1133 — 1153 — — 1294	— — — 960 — — 1030 — — 1123 — 1555 1560	rat rat rat rat rat 1037 — — — — — 1147 — — 1203 1206 — 1220 1227 1275 1304	1020 1023 — — — — — 1181 — — — — 1281 1316 1347 — 1374	1574 1573 — — 1680 1699

CURVETABELLEN

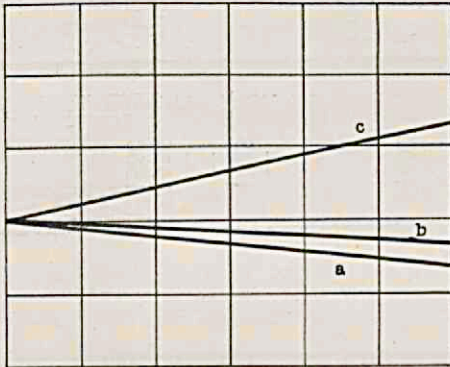
I. Vaste en gevoelige stam.



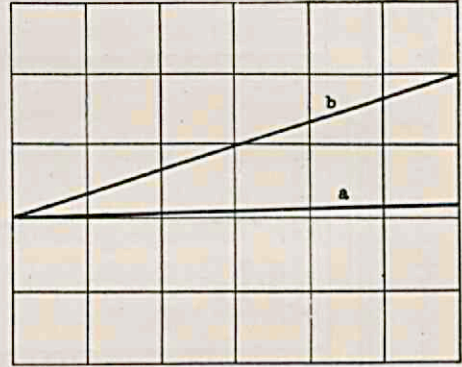
II. Vaste stam na runderpassage.



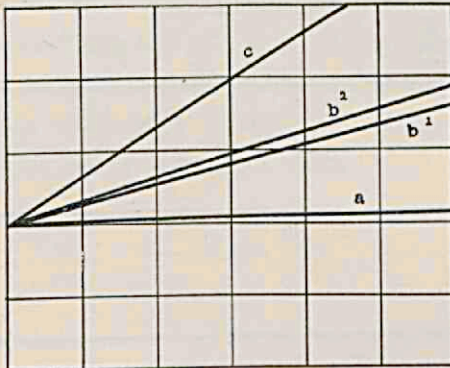
III. Vaste stam na hondenpassage.



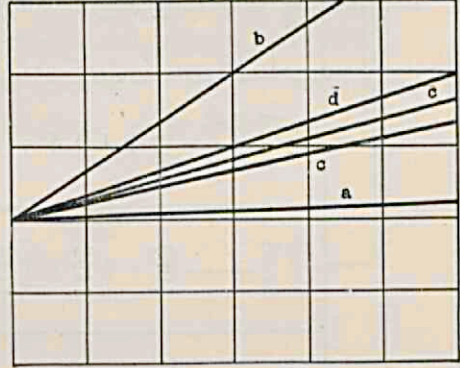
IV. Vaste stam na rat-hond-cavia-konijnpassage.



V. Vaste stam na 1e rattenpassage.



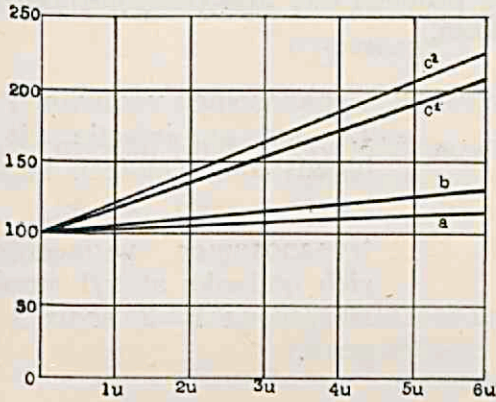
VI. Vaste stam na 2e rattenpassage.



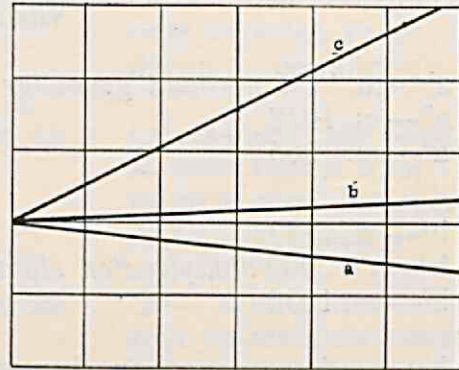
Tijdactiecurven (naganol) atoxylvasten stam aangevende het gedrag van trypanosomen (toe- of afname) in het bloed van muizen na intraveneuze injectie van 400 mg. atoxyl.

CURVETABELLEN

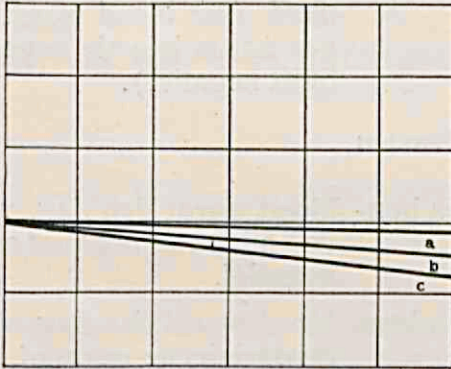
VII. Vaste stam na konijnenpassage.



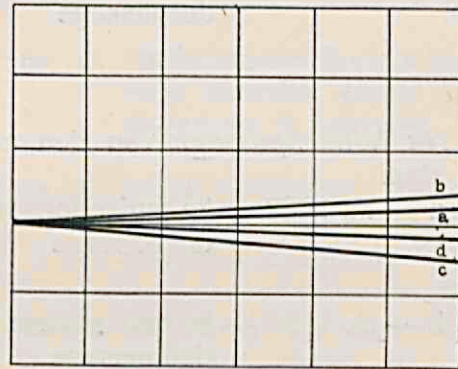
VIII. Vaste stam na caviapassage.



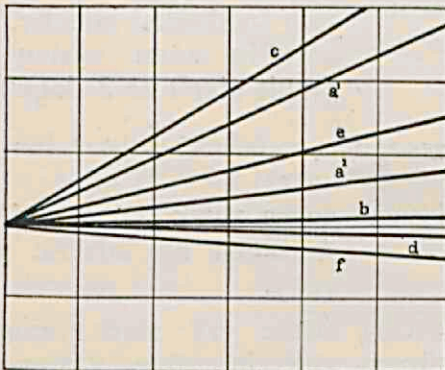
IX. Uit cavia geïnfecteerd met normalen en daarna met vasten stam.



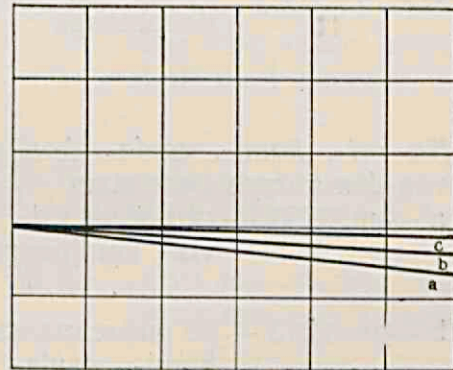
X. Uit cavia geïnfecteerd met vasten en daarna met normalen stam.



XI. Vaste stam na imitatie natuurlijke overbrenging.



XII. Vaste stam na passage door stomoxys calcitrans.



Tijdactiecurven (naganol) atoxylvasten stam aangevende het gedrag van trypanosomen (toe- of afname) in het bloed van muizen na intraveneuze injectie van 400 mg. atoxyl.

KORTE VERKLARING van de curven, aangevende het vermeerderen of verminderen van trypanosomen in het bloed na intraveneuze injectie van 400 mgr atoxyl bij muizen in diverse proeven met den (naganol-)atoxyl-vasten stam.

- I. a¹— m. 1172 *normaal gevoelige surrastam* trypanosomen verdwijnen 6—
a²— m. 1038 12 uur na injectie uit de
a³— m. 965 bloedsbaan, (muizen herstellen).
- b¹— m. 1123 trypanosomen vermeerderen
b²— m. 960 *atoxylvasten stam* zich ondanks atoxyl (muizen
b³— m. 1030 sterven na 1—2, soms 3 dagen).
- II. *Na runderpassage van den atoxylvasten stam*
a — m. 970 — 1e muizenpassage na runderpassage curve zwak naar beneden loopend, (het bloed wordt 4 dagen na de injectie negatief en blijft negatief).
- III. *Na hondenpassage van den atoxylvasten stam*
a — m. 1063 — 2e muizenpassage na hondenpassage bloed wordt den dag, volgende op injectie negatief en blijft negatief.
b — m. 1155 — 5e muizenpassage na hondenpassage bloed wordt den dag, volgende op injectie negatief. Na 18 dagen recidive.
c — m. 1113 — 7e muizenpassage na hondenpassage trypanosomen vermeerderen zich ondanks injectie, curve valt in zône vasten stam, (muis sterft na 3 dagen).
- IV. *Na rat-, hond-, cavia-, konijnenpassage van den atoxylvasten stam*
a — m. 1077 — direct na rat-, hond-, cavia-, konijnenpassage curve zwak oplopend (muis 4 dagen na injectie gestorven).
b — m. 1273 — 8e muizenpassage na rat-, hond-, cavia-, konijnenpassage curve vrij sterk oplopend, valt in zône vasten stam, (muis 4 dagen na injectie gestorven).

- V. *Na rattenpassage* van den atoxylvasten stam
- | | |
|---|---|
| a — m. 1037 — 3e muizenpassage na rattenpassage | curve vrijwel horizontaal, iets naar beneden (muis sterft 4 dagen na de injectie). |
| b ¹ — m. 1203 — 11e muizenpassage na rattenpassage | curves sterk oplopend, vallen in zône vasten stam (muizen sterven resp. 2 dagen en 1 dag na de injectie). |
| b ² — m. 1206 | |
| c — m. 1220 — 12e muizenpassage na rattenpassage | curve sterk oplopend, valt in zône vasten stam (muis sterft 3 dagen na de injectie). |
- VI. *Na 2e rattenpassage* van den atoxylvasten stam
- | | |
|---|--|
| a — m. 1147 — 1e muizenpassage na 2e rattenpassage | curve vrijwel horizontaal, iets naar beneden (muis sterft 4 dagen na de injectie). |
| b — m. 1227 — 5e muizenpassage na 2e rattenpassage | curve oplopend, vallende in zône van vasten stam (muis sterft na 2 dagen). |
| c ¹ — m. 1275 — 7e muizenpassage na 2e rattenpassage | curves oplopend, vallende in zône van vasten stam (muizen sterven na 3 dagen). |
| c ² — m. 1276 | |
| d — m. 1304 — 9e muizenpassage na 2e rattenpassage | curve oplopend, vallende in zône van vasten stam (muis sterft na 4 dagen). |
- VII. *Na konijnenpassage*
- | | |
|---|---|
| a — m. 1096 — 1e muizenpassage na konijnenpassage | curve zwak oplopend (muis sterft 5 dagen na de injectie). |
| b — m. 1121 — 2e muizenpassage na konijnenpassage | curve iets sterker oplopend (muis sterft na 3 dagen). |
| c ¹ — m. 1225 — muizenpassage na konijnenpassage | curve vallend in zône vasten stam (muis sterft na 1 dag). |
| c ² — m. 1226 | |

VIII. *Na caviapassage*

- a — m. 1133 — 1e muizenpassage na caviapassage curve flink naar beneden, vrijwel vallend in zône van gevoeligen stam, volgenden dag in bloed enkele trypanosomen, na 2 dagen in bloed geen trypanosomen, na 9 dagen recidive.
- b — m. 1153 — 2e muizenpassage na caviapassage curve zwak oplopend, (muis sterft na 4 dagen).
- c — m. 1294 — 6e muizenpassage na caviapassage curve vallend in zône vasten stam (muis na 2 dagen gestorven).

- IX. a — m. 1898 — 1e muizenpassage vanaf cavia geïnfecteerd eerst met normalen en 24 dagen daarna met vasten stam, 10 dagen daarna bloed op muizen gevoelig voor 400 mg atoxyl intraveneus, bloed volgenden dag negatief geworden en gebleven.

- b — m. 1909 — 2e muizenpassage idem idem.
- c — m. 1925 — 3e muizenpassage idem idem.

- X. a — m. 1835 — 1e muizenpassage vanaf cavia geïnfecteerd eerst met vasten en 10 dagen daarna met normalen stam, 17 dagen daarna bloed op muizen curve loopt iets op, (muis sterft 2 dagen na de injectie).

- b — m. 1842 — 2e muizenpassage idem curve oplopend, (muis sterft 4 dagen na de injectie).

- c — m. 1886 — 3e muizenpassage idem curve naar beneden loopend, (muis sterft 3 dagen na de injectie).

- d — m. 1875 — 1e muizenpassage vanaf dezelfde cavia als bovenstaande maar nu 24 dagen na normalen stam bloed op muizen curve naar beneden loopend, (muis sterft eerst na 4 dagen na de atoxylinjectie), dus bijna evenwicht tusschen geneesmiddel en parasiet.

- XI. a¹— m. 1020 — 1e passage *imitatie natuurlijke overbrenging* curve in vaste zône, (muis
vanaf den naganol-atoxyl-
vasten stam volgenden dag gestorven).
- a²— m. 1023 — 1e idem idem curve zwak oplopend, (muis
na 3 dagen gestorven).
- b — m. 1281 — 8e idem idem curve zwak omhooglopend,
bloedsbeeld na 2 dagen nega-
tief.
- c — m. 1316 — 9e idem idem curve valt in zône vasten stam,
(muis na 2 dagen gestorven).
- d — m. 1347 — 10e idem idem curve zwak naar beneden loo-
pend, na 3 dagen bloedsbeeld
negatief.
- e — m. 1374 — 12e idem idem curve valt in vaste zône, (muis
na 3 dagen gestorven).
- f — m. 1181 — 4e passage *imitatie natuurlijke overbrenging* curve loopt zeer zwak naar
vanaf 3e muizenpassage beneden, bloedsbeeld 3 dagen
na rattenpassage van den na injectie negatief, 7 dagen
naganol-atoxylvasten stam daarna recidive.
- XII. a — m. 1574 — 1e passage overbrenging door 400 mg atoxyl intrave-
door 10 stuks stomoxys neus bloed volgenden dag ne-
vanaf den atoxylvasten gatief geworden en gebleven.
stam in muizen, welke vast
vast was tegen 400 mg
atoxyl intraveneus
- b — m. 1680 — na 2 passages door sto- bloed volgenden dag negatief,
moxys vanaf vasten stam recidive na 10 dagen.
- c — m. 1699 — na 1 stomoxys passage bloed volgenden dag negatief,
vanaf vasten stam waarna recidive na 5 dagen.
2 passages door overspui-
ten

Toelichting omtrent de in de curven genoemde muizen, wat betreft het werkelijke aantal trypanosomen op het moment van injectie met 400 mgr atoxyl.

I.	a ¹ — m.	1172 op 100 had 100	trypanosomen op	14286	bloedlichaampjes.
	a ² — m.	1038—100 — 100	„ „	15000	„
	a ³ — m.	965—100 — 100	„ „	10000	„
	b ¹ — m.	1123—100 — 100	„ „	9000	„
	b ² — m.	960—100 — 100	„ „	1800	„
	b ³ — m.	1030—100 — 100	„ „	10000	„
II.	a — m.	970—100 — 100	„ „	9000	„
III.	a — m.	1063—100 — 100	„ „	10870	„
	b — m.	1155—100 — 100	„ „	5000	„
	c — m.	1113—100 — 100	„ „	2727	„
IV.	a — m.	1077—100 — 100	„ „	2000	„
	b — m.	1273—100 — 100	„ „	3000	„
V.	a — m.	1037—100 — 100	„ „	7500	„
	b ¹ — m.	1203—100 — 100	„ „	2308	„
	b ² — m.	1206—100 — 100	„ „	2308	„
	c — m.	1220—100 — 100	„ „	15000	„
VI.	a — m.	1147—100 — 100	„ „	7000	„
	b — m.	1227—100 — 100	„ „	7500	„
	c ¹ — m.	1275—100 — 100	„ „	2727	„
	c ² — m.	1276—100 — 100	„ „	3750	„
	d — m.	1304—100 — 100	„ „	1666	„
VII.	a — m.	1096—100 — 100	„ „	1945	„
	b — m.	1121—100 — 100	„ „	12500	„
	c ¹ — m.	1225—100 — 100	„ „	5000	„
	c ² — m.	1226—100 — 100	„ „	6000	„
VIII.	a — m.	1133—100 — 100	„ „	1000	„
	b — m.	1153—100 — 100	„ „	3750	„
	c — m.	1294—100 — 100	„ „	11538	„
IX.	a — m.	1898—100 — 100	„ „	2500	„
	b — m.	1909—100 — 100	„ „	3000	„
	c — m.	1925—100 — 100	„ „	2000	„

X.	a — m. 1835	op 100	had 100	trypanosomen	op	3000	bloedlichaampjes.
	b — m. 1842	— 100	— 100	„	„	3000	„
	c — m. 1886	— 100	— 100	„	„	3000	„
	d — m. 1875	— 100	— 100	„	„	3000	„
XI.	a ¹ — m. 1020	— 100	— 100	„	„	31250	„
	a ² — m. 1023	— 100	— 100	„	„	25000	„
	b — m. 1281	— 100	— 100	„	„	3333	„
	c — m. 1316	— 100	— 100	„	„	4500	„
	d — m. 1347	— 100	— 100	„	„	90000	„
	e — m. 1374	— 100	— 100	„	„	12500	„
	f — m. 1181	— 100	— 100	„	„	5000	„
XII.	a — m. 1574	— 100	— 100	„	„	2500	„
	b — m. 1680	— 100	— 100	„	„	2000	„
	c — m. 1699	— 100	— 100	„	„	1500	„

c) Passage van den geneesmiddelvasten stam door andere dieren.

De bedoeling van deze proeven was na te gaan de factoren, welke invloed uitoefenen op het eventueel verminderen of verdwijnen van de reeds ontstane geneesmiddelresistentie.

Blijft de geneesmiddelvastheid ook bestaan bij passages door dieren van een andere soort dan die waarin de vaste stam ontstaan is?

Geneesmiddelvaste stammen werden gemaakt in muizen; muizen hebben een acuut ziekteverloop, zooals de paarden. Passage door caviae imiteerde het verblijven van surra in karbouwen, caviae vertoonen een chronisch ziekteverloop, zooals de karbouwen, welke soms ook zuiver parasietendragers zijn.

Passage van den naganol-atoxylvasten stam door andere proefdieren.

Uitvoerig werd nagegaan de invloed van passages door andere proefdieren dan de muis waarin de vaste stam gevormd was. Dit bootst dus omstandigheden na zooals die in N.-I. bij de groote huisdieren bestaan. Bij het paard gevormde vaste stam moet om te blijven bestaan altijd passeeren door karbouwen.

Op het moment van het gebruiken van den stam voor diverse

proeven was de stam absoluut vast tegen een combinatie van $\frac{1}{2}$ mgr naganol plus 500 mgr atoxyl, d.w.z. na een subcutane injectie hiervan bij de muis persisteerden de trypanosomen in het periphere bloed en de muis stierf.

In den in muizen aangehouden stam verminderde deze vastheid niet, integendeel na een veertigtal passages in muizen bleek zelfs absolute maximale vastheid tegen 1000 mgr atoxyl te bestaan.

Voor den surrastam in ons laboratorium aangehouden, dus den normaal-gevoeligen stam, was de minimale effectieve dosis van atoxyl 200 mgr per K.G. muis en van naganol 1 mgr per K.G. muis.

De dosis naganol was dus bij het maken van den stam steeds subtherapeutisch gehouden, de dosis atoxyl echter verhoogd tot 500 mgr.

De vaste stam, welke gevormd was in de muis werd gepasseerd door diverse andere proefdieren, daarna weer terug in de muis gebracht, werd nagegaan de nog aanwezige graad van vastheid met behulp van de methode van het „**traceeren van de tijdactiecurve**” **aangevende het gedrag van de trypanosomen na de intraveneuze injectie van 400 mgr atoxyl** in de staartvene.

(De muizen werden ten behoeve van de intraveneuze injectie licht verdoofd met aether. Daarna werd de staart eventjes gedompeld in lauwwarm water, 45—50° C., om de aderen te laten oploopen en aldus duidelijk zichtbaar te maken. Bij een goed uitgevoerde injectie (iridiumcanule) zien we het wegschieten van bloed uit de ader, de staart zwelt niet op. Een controle voor goed uitgevoerde injectie door middel van enkele druppels bloed van een duif bij te voegen, waardoor we direct daarna in een praeparaat van oorvenebloed de kernhoudende roode vogelbloedlichaampjes zien, kan worden toegepast, maar bleek niet noodig).

Deze 400 mgr atoxyl deed de trypanosomen van den normaal-stam in 6—12 uur uit de bloedsbaan verdwijnen. Geen hogere dosis werd genomen om toxische werking te voorkomen.

De tijdcurve is bij het atoxyl duidelijk, omdat na de injectie van dit middel het aantal trypanosomen vlug afneemt en niet zoals bij naganol langzaam.

Deze methode gaf het voordeel dat gemakkelijk op ieder moment in de proevenreeks de graad van vastheid kon worden gecontro-

leerd. Zonder deze methode zouden voor contrôle telkens vanuit de proevenserie contrôlemuizen moeten worden geïnfecteerd en behandeld met diverse doseeringen van het geneesmiddel.

Gedacht werd aan deze methode van het bepalen van de tijd-actiecurve als fijne contrôle van arseenresistentie naar aanleiding van gegevens uit de literatuur (Morgenroth en Rosenthal) (1911) en (Voeghtlin, Dyer en Miller) (1924).

In mijn proeven geeft de ordinaat der curve aan het aantal trypanosomen, de abscis den tijd met het moment van injectie als nulpunt. De curve bereikt de abscis dan, als alle trypanosomen uit het bloed verdwenen zijn.

De recidivedosis is bij onzen laboratoriumstam „Buitenzorg P₄” 200 mgr atoxyl.

400 mgr atoxyl per K.G. muis is 2 maal de recidivedosis, doet de trypanosomen van **onzen normalen stam**, in 6—12 uur volledig uit de circulatie verdwijnen, dus de curven bereiken in 6—12 uur de abscis (zie **curvetabel I**).

400 mgr atoxyl intraveneus doet echter de trypanosomen **van den vasten stam** niet uit het bloed verdwijnen, ondanks de injectie van deze dosis vermeerderen de trypanosomen zich, de curves loopen vrij sterk omhoog (zie **curvetabel I**).

De curve werd vastgesteld door tellen van een aantal trypanosomen op een zeker aantal bloedlichaampjes in uitstrijkpraeparaten gemaakt direct vòòr, 3 uur en 6 uur na de injectie; minstens werd geteld het aantal trypanosomen op 5000 bloedlichaampjes.

Verder werd gelet op het verloop van de infectie, hoewel dit natuurlijk geen absoluut idee geeft van den graad van vastheid van de trypanosomen. Daarvoor spelen daarbij te veel factoren een rol, als individueel verschillend groote afweerkrachten van het lichaam, een dier kan reeds verzwakt zijn door invloed van trypanosomen gedurende meerdere dagen en nog eens een nadeeligen invloed ondergaan door toxische werking van het atoxyl.

Bij alle contrôles van atoxylresistentie werd steeds dezelfde dosis van 400 mgr atoxyl per K.G. muis intraveneus geïnjecteerd.

Aldus werd de helling der curve genomen als criterium voor den

graad van geneesmiddelresistentie. Zooveel mogelijk werden de muizen alle in hetzelfde ziektestadium geïnjecteerd. Getracht werd dus zooveel mogelijk alle muizen te behandelen op een moment dat ze ongeveer een zelfde aantal trypanosomen in hun bloed hadden.

In totaal werden van een tiental muizen, besmet met den normaal gevoeligen laboratoriumstam, de curven bepaald. Zij vielen alle in de zône in curvetabel I aangegeven voor den gevoeligen stam.

Voor den vasten stam werd in den loop der proeven een twintigtal curven bepaald. Zij vielen alle binnen de grenzen voor den vasten stam aangegeven in curvetabel I. Bij geen enkele muis besmet met den vasten stam werd dus na injectie van 400 mgr atoxyl intraveneus het bloedsbeeld negatief.

P a s s a g e d o o r h e t r u n d.

De naganol-atoxylvaste stam werd gepasseerd door het rund. In de vena jugularis werd bloed geïnjecteerd, wat verkregen was door hartpunctie van de muis. Het rund vertoonde geen ziekteverschijnselen, na twee weken werd bloed teruggespoten op muizen. Terug in de muis bleken de trypanosomen door een injectie van 400 mgr atoxyl in 4 dagen uit de bloedsbaan te verdwijnen. De curve a, muis 970, liep flauw naar beneden (**curvetabel II**).

R e s u l t a a t.

De eigenschap van vastheid tegen atoxyl van de trypanosomen bleek dus direct na de passage door het rund belangrijk verminderd te zijn. De serie werd na dit terugbrengen in muizen niet verder aangehouden.

P a s s a g e d o o r d e n h o n d.

De vaste stam werd achtereenvolgens gepasseerd door 2 honden. Honden werden geïnfecteerd door injectie van bloed in de vena saphena. Deze dieren vertoonden wel ziekteverschijnselen. Na 14 dagen werd van den eersten hond bloed overgespoten op een tweeden hond en van dezen na 18 dagen bloed teruggespoten op muizen.

Terug in de muis bleek in de tweede muizenpassage de vastheid vrijwel verdwenen, de curve a = m. 1063 liep flauw naar beneden (**curvetabel III**), de trypanosomen waren den dag na de intraveneuze injectie van 400 mgr. atoxyl uit het bloed verdwenen.

In de eerste muizenpassage, dus direct na de hondenpassage, waren helaas de intraveneuze injecties niet bijzonder goed gelukt, zoodat hier geen curven gemaakt en geen conclusies getrokken konden worden omtrent den graad van vastheid.

Ook door andere omstandigheden, bijv. het intercurrent sterven van proefdieren, was het niet altijd mogelijk in iedere passage goede curven te maken.

In de 5de muizenpassage (curve b = m. 1155) werd nog een naar beneden loopende curve geregistreerd met een negatief bloedbeeld van de muis op den dag na de injectie. De resistentie bleek dus ook toen nog vrijwel verdwenen te zijn.

De 7de muizenpassage gaf wederom een vrij sterk oplopende curve (c = m. 1113). In de 7de en verdere passages stierven de muizen ondanks een injectie van 400 mgr atoxyl enkele dagen daarna, evenals muizen van den vasten stam.

Resultaat.

De passage door den hond bleek dus een groote vermindering van vastheid te geven. Zonder opnieuw gewennen aan het geneesmiddel is de vrijwel verdwenen resistentie door het houden in muizen wederom teruggekomen.

Deze tak in de serie-experimenten werd daarom daarna niet verder aangehouden. In totaal werden in deze serie 8 curven getraceerd.

Passage door rat, hond, cavia, konijn.

De naganol-atoxylvaste stam werd gepasseerd door een serie van bovengenoemde proefdieren.

24-III-'31 werd rat geïnfecteerd.

27-III-'31 werd hond geïnfecteerd.

30-III-'31 werd cavia geïnfecteerd.

8-IV-'31 werd konijn geïnfecteerd.

7-V-'31 werd bloed terug gespoten op muizen.

Terug in de muis bleek direct na de seriepassage de vastheid wel verminderd te zijn, na intraveneuze injectie van 400 mgr atoxyl stierven de muizen eerst na 4 dagen, dus een langzaam vermeerderen van het aantal trypanosomen ondanks de injectie, een flauw oplopende curve. (a = m. 1077) (**curvetabel IV**).

Na diverse muizenpassages beginnen de curven geleidelijk iets steiler op te lopen.

Na 8 muizenpassages blijkt uit de curven, ($b = m. 1273$) dat de vastheid weer aan het terugkomen is, ze gaan nl. weer vrij sterk oplopen.

Resultaat.

De vastheid van de trypanosomen bleek dus wel te zijn verminderd na deze seriepassage, na meerdere muizenpassages kwam de vastheid weer geheel terug.

In totaal werden in deze serie 5 curven getraceerd.

P a s s a g e d o o r d e r a t.

De naganol-atoxylvaste stam werd gepasseerd door ratten, en wel achtereenvolgens door 5 stuks. De stam verbleef aldus gedurende 26 dagen in de ratten.

Terug in de muis bleek de vastheid wel verminderd te zijn (**curvetabel V**), curve a liep vrijwel horizontaal = $m. 1037 = 3de$ muizenpassage na de rattenpassage, de muis stierf 4 dagen na de injectie.

Reeds na 4 muizenpassages werden wederom vrij sterk oplopende curven geregistreerd. Alleen aan de curven beoordeeld was de vastheid toen reeds vrijwel weer terug, de muizen stierven 2 en 3 dagen na de injectie van 400 mgr atoxyl. De serie werd vervolgd tot 16 passages na de rattenpassage, de vastheid was toen volgens de curven en volgens het aantal dagen dat de proefdieren na de injectie stierven, geheel terug. De muizen stierven nl. ondanks de injectie van atoxyl 1—2, hoogstens 3 dagen na de injectie, terwijl ze kort na de rattenpassage, eerst na 4 soms 5 dagen na de injectie stierven.

In totaal werden in deze serie 12 curven getraceerd, nooit kreeg een muis na de injectie van 400 mgr atoxyl een negatief bloedbeeld.

Resultaat.

Door deze eerste rattenpassage bleek de vastheid wel een flink verlies geleden te hebben, na wederom aanhouden van den stam in muizen, kwam de resistentie spoedig terug.

2de passage door de rat.

Vanaf 5de muizenpassage na de eerste rattenpassage, toen dus de resistentie nog niet weer geheel teruggekomen was, werd opnieuw gepasseerd door 3 ratten. De stam verbleef aldus gedurende 13 dagen in ratten. Direct na het terugzijn in de muis na deze 2de rattenpassage bleek de vastheid weer sterk verminderd te zijn.

In **curvetabel VI** zien we curve a = m. 1147, d.i. direct na de 2de rattenpassage bijna horizontaal lopen zooals na de eerste rattenpassage. De muis stierf ook hier weer 4 dagen na de injectie. De vastheid bleek na opnieuw aanhouden in muizen na enkele passages vrijwel weer teruggekomen te zijn, nl.

Curve b = m. 1227 = 5de muizenpassage na 2de rattenpassage,

Curve c₁ = m. 1275 = 7de " " " "

Curve c₂ = m. 1276 = 7de " " " "

vielen alle in de zône van den vasten stam.

Mogelijk echter dat toch na 9 muizenpassages de vastheid nog niet geheel weer teruggekomen was.

Curve d = m. 1304, viel weliswaar in de zône van den vasten stam, de muis stierf echter eerst 4 dagen na de injectie.

In totaal werden in deze serie 5 curven getraceerd, nooit werd een negatief worden van het bloedsbeeld na intraveneuze injectie van 400 mgr atoxyl gezien.

Resultaat.

Na deze 2de rattenpassage bleek de vastheid wel opnieuw verminderd te zijn en wel in ongeveer dezelfde mate als na de eerste rattenpassage, hoewel bij de 2de rattenpassage het verblijf in de rat maar 13 dagen duurde, tegen 26 dagen bij de eerste rattenpassage, echter komt mogelijk de vastheid niet zoo vlug weer op zijn oude peil terug door het aanhouden in muizen als na de eerste rattenpassage.

Door de rat werd geen zoo sterke invloed op de geneesmiddelresistentie uitgeoefend als door rund, hond en cavia.

P a s s a g e d o o r h e t k o n i j n.

De naganol-atoxylvaste stam werd gepasseerd door een konijn. De stam verbleef in het konijn gedurende 45 dagen. Terug in de muis bleek ook hier wel de resistentie van de trypanosomen verminderd te zijn.

Direct na de konijnenpassage werd een zeer flauw oplopende curve $a = m. 1096$ geregistreerd (**curvetabel VII**), de muis stierf na 5 dagen.

In de 2de muizenpassage liep curve $b = m. 1121$ iets sterker op, de muis stierf na 3 dagen.

Aangehouden in muizen kwamen na 7 passages weer de sprekende sterk oplopende curven $c_1 = m. 1225$ en $c_2 = m. 1226$. De dieren stierven op den dag volgende op dien van de injectie. De serie werd daarna niet verder meer aangehouden, aangezien blijkbaar de vastheid weer geheel teruggekomen was.

In totaal werden in deze serie 7 curven getraceerd, nooit werd een verdwijnen van de trypanosomen uit de bloedsbaan na injectie van 400 mgr atoxyl waargenomen.

Resultaat.

Door de passage door het konijn werd de vastheid wel vermindert, ze kwam echter spoedig terug bij het opnieuw aanhouden in muizen.

P a s s a g e d o o r d e c a v i a.

De naganol-atoxylvaste stam werd gepasseerd door achtereenvolgens 4 cavia's. In de cavia verloopt de surra chronisch, de dieren hebben niet constant een positief bloedsbeeld, ze sterven na een ziekteverloop van ongeveer $1\frac{1}{2}$ maand. Aldus verbleef de stam 62 dagen in de cavia. Terug in de muis bleek hier de vastheid bijna verdwenen, direct na de caviapassage had een muis na 400 mgr atoxyl intraveneus den volgenden dag bijna, den 2den dag een geheel negatief bloedsbeeld.

De curve $a = m. 1133$, liep flink naar beneden, (**curvetabel VIII**).

De 2de muizenpassage gaf een flauw oplopende curve $b = m. 1153$, de muis stierf 4 dagen na de injectie.

De 6de muizenpassage gaf een flink oplopende curve $c = m. 1294$, de muis stierf 2 dagen na de injectie.

In totaal werden in deze serie 5 curven getraceerd.

Resultaat.

De geneesmiddelresistentie welke direct na de caviapassage bijna verdwenen was, bleek dus ook hier, zooals bij alle tevoren genoemde dierpassages, na eenigen tijd weer aanhouden in muizen, dus in

proefdieren, waarin de stam vastgemaakt en dus aangepast was, geleidelijk vanzelf weer terug te komen, zonder dat de trypanosomen door het toedienen van geneesmiddelen hieraan opnieuw werden gewend.

Opmerkingen:

Enkele malen werden gevallen waargenomen, waarbij het curveverloop niet klopte met het ziekteverloop der proefdieren. Zoo stierven in de 8ste muizenpassage na rat, hond, cavia, konijn, de muizen pas 3 à 4 dagen na de injectie, waaruit dus een slechts langzaam vermeederen van het aantal trypanosomen zou moeten worden geconcludeerd, terwijl toch de curven sterk opliepen.

Ook is in de 8ste muizenpassage een geval (m. 1274) waarin het bloed na 3 dagen negatief wordt, de muis krijgt 8 dagen daarna opnieuw trypanosomen in het bloed, dus recidive en sterft. De curve van dit dier loopt toch flink naar boven. Mogelijk zijn de trypanosomen wel vast, de curve loopt direct na de atoxylinjectie nog op, maar berust het negatief worden van het bloed op individueel groote afweerkrachten van het muizenlichaam, de vorming van veel antilichamen, waarvoor de stoot gegeven werd door het atoxyl, zooals trouwens de genezing van trypanosomenziekten wordt opgevat.

Een dergelijk geval zou ons de vraag kunnen doen stellen of het traceeren van curven als criterium van een bestaanden graad van vastheid wel absoluut betrouwbaar is. Dit geval was echter uitzondering.

Proeven met den naganolvasten stam.

De naganolvaste stam werd evenals de naganol-atoxylvaste stam gepasseerd door andere proefdieren dan de muis.

I. Vóór de passage door 2 honden was de naganolstam vast tegen 20 mgr, ná de passage bleek nog dezelfde vastheid overgebleven. Mogelijk is hier wel vermindering opgetreden, maar had de toen sterker naganolvast wordende stam reeds een hogere potentie in zich, dan vast te zijn tegen 20 mgr.

II. Door de caviapassage ondervond de naganolvaste stam een vermindering van resistentie en wel van 40 mgr tot 30 mgr.

Of de vastheid in muizen daarna weer terugkwam, is daarna niet

nagegaan om niet al te veel proefdieren te gebruiken, en bovendien kan dit resultaat analoog aan de resultaten van den naganol-atoxyl-vasten stam worden verwacht.

Bespreking.

Het is door mij reeds naar voren gebracht, dat het niet gemakkelijk zal zijn, scherp geformuleerde conclusies voor den toestand in Indië te trekken uit de resultaten van bovenstaande beschreven proeven.

Daarom zal daarvan worden afgezien en zullen beschouwingen voor Indië worden gegeven, gebaseerd óp of gesteund dóór de resultaten van de beschreven proeven.

Zooals reeds eerder vermeld moet een geneesmiddelvaste stam worden opgevat als te bestaan uit individuen van maximale, zulke met minimale resistentie en overgangen daartusschen.

Tijdens het verblijf in de muis overheerschen de geneesmiddelvaste in den stam. Die vaste zijn aangepast, geacclimatiseerd aan de muis.

In rund, hond, cavia enz. overgroeien in den stam andere individuen, minder geneesmiddelvast, maar vitaal in alle andere opzichten.

Enkele maximaal vaste, die zijn overgebleven, gaan dan na terugbrengen in de muis weer geleidelijk overgroeien en geven den stam geleidelijk weer een „vaster aanzien”.

Deze voorstelling van variatie in de samenstelling van den stam door overgroeiing van die trypanosomen, die zich onder de gegeven omstandigheden het beste thuisvoelen, verklaart het waargenomene wel uitstekend, zoo ook het feit dat bij een terugkomen van de vastheid deze opnieuw sterk verminderd kan worden door opnieuw passeeren door een ander soort gastheer, wat door de tweede rattenpassage bewezen is.

Het is ook mogelijk dat het verdwijnen der resistentie op een grootere gevoeligheid der trypanosomen in het algemeen bij overgang in een nieuwen gastheer berust, zooals ook bij normaalgevoelige trypanosomen het geval is.

Als een normaalgevoelige stam n.l. wordt gepasseerd door een

anderen gastheer, neemt zijn geneesmiddelgevoeligheid ook toe.

Hoe grooter aantal passages door andere proefdieren, des te meer invloed zal worden uitgeoefend op de vastheid.

Verder zal de duur van verblijf in een ander soort proefdier ook invloed hebben. Hoe langer verblijf, hoe meer vermindering van resistentie. Bij de passage door 4 cavia's duurde het verblijf in cavia 62 dagen. Hierdoor werd een bijna verdwijnen van vastheid waargenomen. Na de passage door ratten, waarin het verblijf slechts kort kon zijn (26 dagen), wegens het acute verloop van de surra bij de rat, was minder achteruitgang van vastheid waar te nemen.

Mogelijk dat verder van invloed is of het andere proefdier als diersoort al of niet verwant is aan datgene, waarin de vaste stam is gevormd.

In het geval van mijn proeven was de vaste stam gemaakt in de muis.

Rattenpassage had geen geweldig verlies van vastheid tengevolge, de rat staat als diersoort dicht bij de muis.

Passage door rund, hond, cavia, gaf een flink verlies van vastheid. De resistentie was hier bijna verdwenen. Deze diersoorten staan verder af van de muis als de rat.

Tegen deze beschouwingen zouden spreken de resultaten van passage door konijn en door rat, hond, cavia, konijn, die buiten verwachting niet zooveel verlies van de vastheid veroorzaakten.

De passages door karbouwen van bij het paard gevormde vaste stammen zouden een grooten invloed in de richting van verlies van vastheid moeten hebben, aangezien de stammen gedurende meerdere passages en geruimen tijd in een diersoort, absoluut vérafstaand van het paard, verblijven.

Alleen in zeer dicht met paarden bezette streken in N.-I. zou deze overbrenging van paard op paard geruimen tijd kunnen doorgaan en zouden daar dus diverse gevallen van surra met minder succes kunnen worden genezen.

Bij de tegenwoordige organisatie van den B.V.D. in Ned.-Indië zal een seriepassage in paarden zelden meer plaats vinden. Practisch in alle streken moeten de karbouwen de dragers, onderhouders van de surra zijn.

Door de karbouwenpassage zou een bij het paard gevormde vaste stam veel gevoeliger worden. Worden vanaf karbouwen rechtstreeks dus paarden geïnfecteerd, dan zouden die gevallen dus met meer kans op succes te genezen zijn.

Inderdaad meen ik meerdere malen te hebben opgemerkt, dat vrijwel alle gevallen van surra bij paarden, waarin de afkomst van karbouwen rechtstreeks moest worden aangenomen (geen andere paarden in den wijden omtrek) met succes werden behandeld met de gebruikelijke chemotherapeutica naganol-atoxyl, terwijl in paardenstreken meerdere gevallen van niet-herstel of recidive voorkwamen. Mogelijk echter kan dit afgezien van het geheele probleem van vastheid ook wel een gevolg zijn van het bekende feit, dat bij andere infectieziekten ook wordt waargenomen, dat de parasiet voor een bepaalde diersoort virulenter wordt na een aantal passages door die diersoort.

Onder de Tryp. evansi zouden diverse variëteiten kunnen voorkomen, de eene meer aangepast aan karbouwen, de andere meer aan paarden, echter zouden de varianten wel in elkaar kunnen overgaan.

In dit verband kan worden genoemd het opmerkelijke feit, dat in de residentie Tapanoeli in het Noordelijk gedeelte, den veeartsenijkundigen ambtskring Balige, veel karbouwensurra voorkomt en slechts heel sporadisch gevallen van surra bij paarden, terwijl in het Zuiden van deze residentie, den veeartsenijkundigen ambtskring Sibolga, veel paardensurra voorkomt, en zich weliswaar onder de karbouwen trypanosomendragers bevinden, maar zelden onder de buffels sterfte optreedt, door surra veroorzaakt.

In ieder geval blijkt wel uit deze proeven dat door diverse invloeden vastheid een vermindering kan ondergaan.

Ondanks deze invloeden blijkt de geneesmiddelresistentie een zeer hardnekkige eigenschap te zijn en zal men bij het behandelen van paarden, maar nog meer van karbouwen, zeer voorzichtig moeten te werk gaan.

Om zoo weinig mogelijk gevaar te loopen een geneesmiddelvastheid te verwekken zal men goed doen altijd hoge doses van chemotherapeutica ineens toe te dienen.

d) Menging van een vasten en een normalen stam in de cavia.

Verder werd nog als vraag gesteld, wat het eindresultaat zal zijn van het voortleven van diverse, wat eigenschappen van geneesmiddelresistentie betreft, verschillende, stammen van trypanosomen in karbouwen.

Karbouwen toch zullen als dragers van trypanosomen, depôts, zeer varierende stammen herbergen. Zij zullen herhaaldelijk gesuperinfecteerd worden met trypanosomen, geneesmiddelgevoelige en resistente willekeurig door elkaar. Tegenover herhaaldelijke infecties met normaalgevoelige trypanosomen zal staan een enkele infectie met een resistenten trypanosomenstam, zooals we ons thans indenken gevormd bij het paard, maar toch mogelijk ook gevormd bij den buffel of het rund.

Wat zal nu het eindresultaat zijn van deze menging van trypanosomenstammen, een overgroeiing van de vaste trypanosomen over de gevoelige of omgekeerd, of een verdunning (wat aantal betreft) van vaste door de vele normaalgevoelige trypanosomen.

Volgens Oehler (1914) krijgen we dat de gevoelige individuen overgroeien in den stam, ook zelfs wanneer die gevoelige aanvankelijk in de minderheid waren.

Ritz (1914) zegt dat bij mengrassen (recidiverassen) van trypanosomen de oorspronkelijke individuen het kleinste aantal vormen.

Volgens Reichenbach is wat betreft de weerstand van diverse individuen van een cultuur tegen giften, het aantal individuen van minimale resistentie het grootst. In een populatie bestaan slechts zeer weinig individuen van een maximale resistentie.

Ook door de proeven van Schnabel wordt dit waarschijnlijk gemaakt. Door hem werden mengsels van vaste bacteriën en normale in verschillende verhoudingen bij elkaar gebracht en na 24 uur uitgroeien op hun gevoeligheid onderzocht.

De resulterende gevoeligheid werd grooter met de afname van de hoeveelheid bijgevoegde vaste kiemen.

Mogelijk zijn volgens mijn meening de geneesmiddelvaste trypanosomen van een biologisch standpunt gezien minderwaardig geworden, mogelijk nemen allerlei vitale eigenschappen af bij het toenemen der geneesmiddelvastheid.

Waar immers wordt aangenomen dat, in een groot gedeelte van de gevallen, geneesmiddelvastheid berust op het vormen van een meer ondoordringbare omhullende laag om de trypanosomen, wordt de celademing enz. misschien daardoor minder intensief.

Zoo kregen we ook bij het begin der proeven van het maken van vastheid tegen naganol een slechter aanslaan der infectie, langere incubatietijd. Mogelijk is dat door de zoo juist genoemde theorie te verklaren.

Getracht werd na te gaan, wat de resultante zal zijn van het mengen van vaste en normale trypanosomen in de cavia.

Om de omstandigheden van den karkbouw na te bootsen werd de normale surrastam, met den naganol-atoxylvasten stam „gemengd” in caviae. 2 caviae werden geïnfecteerd eerst met normalen surrastam (uit muizen), 24 dagen erna met vasten stam (ook uit muizen) en 10 dagen daarna het bloed van één der caviae op muizen overgespoten. In de muizen werd nagegaan welke graad van atoxylvastheid resulteerde en wel met behulp weer van bepaling van de „tijdactie” curve aangevende de toe- of afname van het aantal trypanosomen na injectie van 400 mg atoxyl intraveneus.

De resultaten zijn gedeeltelijk neergelegd in **curvetabel IX** welke grootendeels voor zichzelf spreekt.

Behalve de in de tabel geregistreeerde curven werden nog meerdere gemaakt. Alle muizen in deze serie vertoonden den dag volgende op dien van de injectie van 400 mg atoxyl een negatief bloedsbeeld, de curven liepen alle naar beneden, vielen echter nog niet heelemaal in de zone voor den gevoeligen stam. De muizen herstelden definitief, kregen geen recidive.

Het eindresultaat van het mengen van een gevoeligen en een vasten stam in de cavia is dus hier blijkbaar geweest dat de gevoelige trypanosomen in de meerderheid zijn gebleven en dat de later geïnjecteerde vaste stam niet de overhand heeft kunnen krijgen.

Een tweetal andere caviae werden eerst met vasten stam geïnfecteerd, 10 dagen erna met normalen stam (beide uit muizen geïsoleerd); 17 dagen daarna werd bloed op muizen overgespoten en wederom met behulp van de tijdactie curve de resulterende toestand nagegaan.

Curvetabel X moge ook grootendeels voor zichzelf spreken en met de korte verklaring van de curven worden volstaan.

In het algemeen bleek hier de vaste stam, zijnde het eerst in de cavia aanwezig, meer zijn invloed te hebben doen gelden dan in de proeven in curvetabel IX aangegeven.

De muizen kregen n.l. na 400 mg atoxyl geen negatief bloedbeeld, herstelden niet, maar stierven 2, 3 tot 4 dagen na de injectie. Enkele van de curven liepen zwak naar boven, andere zwak naar beneden.

Hier werd a.h.w. de toestand geschapen van een evenwicht van trypanosomen en chemotherapeuticum. Opmerkelijk was dat hoe verder in muizenpassages of we in deze serie kwamen, des te meer de vastheid afnam, de muizen stierven, eerst 2, later 3, later eerst 4 dagen na de injectie, de gifgevoelige trypanosomen begonnen dus de vaste te overgroeien. Muizen geïnfecteerd vanaf cavia 24 dagen na menging met normalen stam, stierven pas na 4 dagen na de injectie van atoxyl en de curven liepen sterker naar beneden.

Dit wijst ook weer op een op den duur gaan overheerschen van de gevoelige trypanosomen in het mengsel in de cavia.

Eindresultaat.

Wij krijgen dus bij beide proeven een verdunning a.h.w. van den vasten stam door den gevoeligen, hoewel in de eerstgenoemde proef de normale trypanosomen meer overheerschten dan in de tweede.

Hierover zou gezegd kunnen worden, dat mogelijk door het vooraf injiceeren van den gevoeligen stam een zekere immuniteit is ontstaan, die de vaste trypanosomen in hun ontwikkeling hebben tegengewerkt.

Hetzij de eerste of de tweede opvatting wordt gehuldigd, zou dus in analogie uit de resultaten van deze proeven kunnen worden afgeleid, dat in een karbouw een enkele vaste trypanosomenstam tusschen meerdere gevoelige niet veel kans zal hebben te gaan overheerschen.

e) Proeven met de methode van imitatie van de natuurlijke overbrenging.

Gedacht werd aan de mogelijkheid van invloed op de genees-

middelvastheid uitgeoefend door de natuurlijke overbrengers, de Tabaniden.

Onder I d zijn reeds de uiteenlopende resultaten vermeld van de onderzoeken van Duke, Gonder, Reichenow en Regendanz, Shilling en Schreck. Deze hebben alle op het oog den invloed uitgeoefend op de geneesmiddelvastheid door een ander medium, waarin de trypanosomen zich tijdelijk bevinden.

Afgezien van den invloed, uitgeoefend door een ander milieu werd nog gedacht aan een anderen factor, die bij de insectenoverbrenging in het spel zou kunnen zijn. Volgens mededeelingen in de meer recente literatuur vooral ook herhaaldelijk gedaan zou een geneesmiddelvast stam niet als een geheel van individuen met precies dezelfde eigenschappen mogen beschouwd worden. Robertson (1929) ziet bijv. dat verschillende culturen elk gegroeid uit een enkele *bodo-caudatus*, geïsoleerd uit den onbehandelden massastam, verschillende graden van natuurlijke resistentie tegen chemicaliën bezitten.

Bij de overbrenging van surra van dier op dier worden door een tabanus slechts enkele exemplaren van trypanosomen, die in en aan den steeksnuut blijven hangen, overgebracht. De overbrenging is een zuiver mechanische, de steeksnuut fungeert dus als entnaald. Een tabanus zuigt bloed op een surra-ziek dier, wordt verjaagd en gaat zoo mogelijk direct met zuigen door op een ander dier. Deze snelle overbrenging, dus met zoo kort mogelijk interval, biedt de meeste kansen voor aanslaan van de infectie.

Het is in te denken dat een dergelijk kort verblijf van de trypanosomen in het overbrengend insect als vreemd medium weinig invloed op de vastheid zal kunnen uitoefenen.

Met één tabanus die op een ziek dier had gezogen, kon Nieschulz 3—4 gezonde dieren achtereenvolgens infecteeren, door middel van een onderbreken van het zuigen en een overzetten op een volgend dier. Aan den steeksnuut van een tabanus blijft een klein aantal trypanosomen achter, de infectie van het dier geschiedt dan dus door slechts één of enkele trypanosomen. Voorop gesteld zij dus, dat de overbrenging van surra door insecten plaats vindt,

doordat slechts één of enkele exemplaren van trypanosomen met den steeksnuit worden geënt. Verder zij als vaststaand aangenomen, dat in den geneesmiddelvasten stam tusschen de diverse individuen variaties voorkomen, wat betreft den graad van resistentie. Bij deze natuurlijke overbrenging van de surra door één of enkele trypanosomen, zou door selectie benevens een bestaande natuurlijke neiging van teruggang tot het normale, géén neiging tot vorming van hogere geneesmiddelvastheid, het mogelijk zijn dat een vermindering of verlies van resistentie sneller zou gaan bij selecteeren van trypanosomen, dan bij overspuiten van bloed van dier op dier, waarbij dan telkens een geheele populatie van trypanosomen, dus ook maximaal vaste worden overgeënt.

Robertson (1929) The loss of resistance is greatly accelerated in single cell cultures, (clones) isolated from the resistant strains.

Een maximaal artsenijvaste surrastam zal nu als geheel op een meer resistente basis staan dan een gevoelige stam, maar zal in zich toch bevatten maximaal vaste en min of meer gevoelige, of minimaal vaste trypanosomen, met allerlei overgangen daar tusschen. Worden nu zooals bij de natuurlijke transmissie willekeurig een paar trypanosomen geselecteerd, dan is het in te denken, dat bij een aantal passages wel eens een keer alleen een paar op de grens van gevoeligheid staande trypanosomen zullen worden geselecteerd. De kans hiertoe moet zeer groot zijn, daar in een populatie slechts zeer weinig individuen van maximale resistentie bestaan, wat waarschijnlijk gemaakt wordt door de proeven van Reichenbach en ook van Schnabel, zooals die reeds (op pag. 65) vermeld werden.

Groeit nu uit zoo'n op de grens van gevoeligheid staande trypanosoom een populatie met als gemiddelde resistentie die van de trypanosoom van uitgang, of groeit hieruit een populatie met als maximale resistentie die van de trypanosoom van uitgang.

Het laatste geval is het meest waarschijnlijk (natuurlijke neiging van teruggang tot het normale). In het laatste geval zal na enkele passages door het willekeurig selecteeren van één of enkele trypanosomen de daaruit gegroeide populatie reeds op een veel minder

resistent niveau komen en zou de geneesmiddelvastheid na een aantal passages geheel verdwenen kunnen zijn.

Getracht moest dus worden uitgaande van den naganol-atoxyl-vasten stam muizen te infecteeren, van die muizen weer nieuwe, enz., volgens een methode waarbij een zeer klein aantal trypanosomen wordt overgebracht, dus een soort „imitatie natuurlijke overbrenging”.

Aan K r i j g s m a n n gelukte het met één trypanosoom een muis te infecteeren. Hij gebruikte den micromanipulator van J a n s e en P e t e r f i. Aan een vastgezette recordspuit zat een lange zeer dunne canule, die in het gezichtsveld kon worden gebracht. Druppeltjes bloed verdund met paardenserum bevatten soms maar één trypanosoom. De druppel werd met de canule weggezogen en een muis intraperitoniaal geïnjecteerd.

De door mij toegepaste methoden om de natuurlijke overbrenging te imiteeren zijn de volgende:

De methode door O e h l e r gevonden is, dat enkele druppels bloed van een surraziek proefdier werden vermengd met zooveel physiologische NaCl-oplossing, beter nog met normaal bloedserum, (de trypanosomen blijven hierin beter bewegelijk) dat bij het microscopisch onderzoek van het mengsel op één gezichtsveld slechts 2 trypanosomen worden gezien (1 druppel bloed op 1 tot 3 cc oplossing of serum).

Een $\frac{1}{2}$ mm tot $1\frac{1}{2}$ mm dunne capillaire buis werd in dit mengsel gehouden, dat wordt opgezogen door capillaire werking en daarna het buisje op een voorwerpglas verdeeld in $\frac{1}{2}$ cm lange stukjes. Onder den microscoop worden nu stukjes capillair uitgezocht, welke het gewenschte aantal trypanosomen bevatten. Uit de canule van een injectiespuit gevuld met een physiologische NaCl-oplossing of serum wordt een druppeltje gedrukt, wat in aanraking gebracht wordt met het stukje capillair, zoodat dit door de oppervlaktespanning naar binnen wordt getrokken. Met de physiologische NaCl of serum in de injectiespuit wordt het buisje met trypanosomen uit de canule gespoeld bij de subcutane injectie van het proefdier. O e h l e r spuit ook subcutaan in, meestal echter intraveneus in de staartvene.

Een andere methode werd gevonden in een artikel van N e u m a n n.

Hiervoor is een instrument, een laten wij het noemen „uitblazer” noodig. Het bestaat uit een glazen buis op afstanden van ongeveer 10 cM., aan de einden knievormig gebogen. Het middenstuk wordt in een statief vastgeklemd. Aan het eene einde van de glazen buis komt een gummislang van 1,20 M. lengte met ballon, aan het andere einde een 40 cM. lang gummi buisje voorzien van een tot capillair uitgetrokken glazen buisje. Het statief zet men voor den microscoop, de gummiballon komt op den vloer.

Een voorwerpglas wordt aan den onderkant beplakt met zwart papier, waarin 10 evengroote ronde gaten gesneden zijn. Op het voorwerpglas wordt een spoor vaseline uitgewreven, ten einde mooie ronde begrensde druppels van door serum verdund trypanosomenbloed te verkrijgen. De 1 à 2 gezichtsvelden groote druppels worden voor het gemakkelijk opzoeken op de centra van de door de gaten in het papier doorzichtbare plekken gebracht. Een druppeltje met 2 of 3 trypanosomen wordt uitgezocht, opgezogen in capillair, wat serum nagezogen. De capillair wordt bij het proefdier ingestoken onder de huid, na tevoren met een injectienaald een gang te hebben gemaakt, zoodat het inbrengen gemakkelijk kan geschieden. Door met den voet een druk uit te oefenen op den gummiballon worden de trypanosomen met serum uitgeblazen onder de huid van het te infecteeren dier. Het leegblazen van de capillair met den mond is niet geschikt, daar de aldus uitgeoefende druk niet groot genoeg is.

Door middel van deze „blaasmethode” van overbrenging van enkele exemplaren van trypanosomen werd later alleen gewerkt. Vanaf den naganol-atoxyl-vasten stam werd een serie van 5 muizen geïnfecteerd. De incubatietijd van 10 dagen was een bewijs voor een goed uitgevoerde manipulatie. Geen te groot aantal trypanosomen was dan genomen. Eigenlijk bestaat volgens K r i j g s m a n n geen incubatietijd, trypanosomen zijn direct aanwezig in het periphere bloed, alleen worden ze practisch bij het doorzoeken van een praeparaat niet gevonden, omdat ze in zoo'n klein aantal in het bloed aanwezig zijn. Hoe kleiner aantal begintrypanosomen voor de infectie wordt gebezigd, hoe langer incubatie.

Van één dier 5 muizen werden volgens deze methode opnieuw 5

muisen geïnfecteerd enz. Met deze methode van imitatie-natuurlijke overbrenging sloeg altijd de infectie bij minstens 1 van de 5 muisen aan.

De graad van geneesmiddelvastheid bij iedere passage werd nagegaan door de tijdactiecurve van het verdwijnen der trypanosomen uit de bloedsbaan na intraveneuze injectie van 400 mgr atoxyl, welke ook gebruikt werd bij alle contrôles aangaande den naganol-atoxylvasten stam.

Uit de **curvetabel XI** blijkt dat direct in de eerste passage imitatie-natuurlijke overbrenging, interessante verschillen bestaan wat betreft de geneesmiddelresistentie.

Curves a^1 en a^2 , muis 1020 en muis 1023 lopen zeer verschillend op. a^1 valt in de vaste zône, a^2 loopt slechts flauw op, muis 1020 sterft den dag volgende op dien der injectie, muis 1023 sterft 3 dagen na de injectie.

Blijkbaar zijn dus de trypanosomen bij muis 1020 gegroeid uit maximaalvaste exemplaren en zijn de trypanosomen van muis 1023 gegroeid uit minder vaste individuen.

Uit curvetabel XI blijkt verder dat muis 1281 van de 8ste passage van deze manier van overbrenging na 2 dagen een negatief bloedsbeeld krijgt, de curve b loopt zeer zwak omhoog in de eerste 6 uren na de intraveneuze injectie.

Eigenaardig is dat nu enkele trypanosomen van muis 1281 in de volgende passage een populatie geven welke volgens de curve weer resistenter is, de curve van muis 1316, curve c, loopt steil omhoog, valt in de zône van den vasten stam, de muis sterft na 2 dagen ondanks injectie atoxyl.

Echter komt in de 10de passage muis 1347 voor, welke 3 dagen na de intraveneuze injectie een negatief bloedsbeeld krijgt, na 4 dagen toch sterft, de curve valt bijna in de zône van den gevoeligen stam.

Dit sterven is mogelijk verklaarbaar doordat de muis te veel verzwakt is door het gedurende langeren „incubatietijd” aanwezig zijn van een klein aantal van trypanosomen in het bloed.

Curve e — m. 1374 in de 12de passage valt wederom in de vaste zône.

Zoolang deze serie doorgevoerd is, d.i. tot in de 18de passage, krijgen we steeds zwak oplopende curves, de muizen sterven 2—3 dagen na de injectie.

Dit negatief worden van het bloedbeeld door een intraveneuze injectie van 400 mgr atoxyl, kwam bij den naganol-atoxylvasten stam, aangehouden door overspuiten van muis op muis nooit voor.

In totaal werden bij een 20-tal muizen van de serie van deze methode imitatie-natuurlijke overbrenging de curven bepaald. Slechts enkelen hiervan (4 stuks) vallen in de zône van den vasten stam.

Er komen echter 2 gevallen voor, dat het bloedsbeeld na intraveneuze injectie van 400 mgr atoxyl, negatief wordt. Hiermee is dus wel waarschijnlijk gemaakt *dat het verlies van resistentie versneld wordt door selectie van een klein aantal trypanosomen.*

Verder werd een aftakking gemaakt door de imitatie natuurlijke overbrenging vanaf de 3de muizenpassage na rattenpassage van den naganol-atoxylvasten stam, op het moment dus waar de geneesmiddelresistentie door de passage door ratten een flink verlies had ondergaan en zich nog niet weer door aanhouden in muizen hersteld had (zie m. — 1037 in curvetabel V). Uit curvetabel No. XI blijkt dat reeds na 4 passages imitatie-natuurlijke overbrenging, muis 1181, 3 dagen na de injectie een negatief bloedbeeld krijgt, curve f zwak naar beneden verloopt, na 7 dagen recidiveeren de trypanosomen.

Deze serie werd daarna niet verder aangehouden.

Door de imitatie-natuurlijke overbrenging werd dus vlugger een verlies van de resistentie bewerkt, wanneer uitgegaan werd op een moment dat die resistentie door de rattenpassage al reeds een flink verlies van vastheid had ondergaan, dan wanneer uitgegaan werd rechtstreeks van den ongedeerden naganol-atoxylvasten stam, want daar werd eerst na 8 passages een geval geboekt van het verdwijnen van trypanosomen door injectie van 400 mgr atoxyl.

Een dergelijk geval van vermindering van resistentie werd na 4 passages waargenomen. In den stam na rattenpassage in muizen aangehouden, door overspuiting, kwam dat nooit voor, geen enkele muis kreeg daarin een negatief bloedsbeeld door injectie van 400 mgr atoxyl.

Proeven met den naganolvasten stam.

Ook vanaf den naganolstam (vast tegen 40 mg) werd een serie muizen geïnfecteerd met „enkele trypanosomenoverbrenging”.

Een drietal passages werd aldus verricht. Een teruggang, van de naganolvastheid van 40 mg tot 30 mg werd door deze imitatie-natuurlijke overbrenging veroorzaakt, terwijl de naganolstam, door overspuiten aangehouden, vast bleef tegen 40 mg naganol.

De snellere vermindering van vastheid door selectie van een klein aantal trypanosomen werd dus als resultaat analoog aan dat bij de tevoren beschreven proeven met den naganol-atoxylvasten stam verkregen.

Zou dus bijv. in Indië een geneesmiddelvaste surrastam gevormd worden bij een paard, dan zou de natuurlijke overbrenging kunnen bewerken dat na enkele passages van paard op paard de geneesmiddelresistentie sterk verminderd was. Nooit zou de resistentie geheel verdwenen zijn.

De natuurlijke overbrenging zooals reeds gezegd, zal dit bewerken door de steeds plaats hebbende selectie van een klein aantal trypanosomen.

Is de eventueel bij paarden gevormde geneesmiddelvaste stam gepasseerd door den karbouw, wat altijd moet geschieden, dan zal de resistentie daardoor reeds een sterke vermindering ondergaan hebbend, na enkele passages natuurlijke overbrenging nog verder achteruit gaan in resistentie.

f) Invloed op den vasten stam uitgeoefend door overbrenging met insecten.

Dat de surratrypanosomen bij kleine proefdieren (muizen, caviae) is over te brengen door Tabaniden, en Stomoxys calcitrans is uit de literatuur voldoende bekend.

O.a. Nieschulz, Dieben verkregen positieve resultaten met overbrengingsproeven.

Waar het bij mijn proeven niet zoozeer ging om het overbrengen te bestudeeren, dan wel om na te gaan den invloed door de overbrenging uitgeoefend op de vastheid, wordt dit kortheidshalve alleen

maar medegedeeld zonder uitvoerige beschrijvingen omtrent techniek enz.

Over de kwestie of geneesmiddelvastheid van trypanosomen ook blijft bestaan na passage door de overbrengende insecten, is veel geschreven en vele proeven zijn op dit gebied genomen.

In hoofdstuk I werden de diverse proeven en beschouwingen uit de literatuur gegeven. Bij de proeven zijn vele fouten gemaakt en de verkregen resultaten van de diverse onderzoekers zijn met elkaar in strijd.

Aansluitend aan de in den winter verrichte imitatie natuurlijke overbrenging, werd door mij in den zomer gewerkt aan proeven met de natuurlijke overbrengers van de surra, de „*Tabaniden*”.

In de maanden Juli en Augustus werden op enkele warme namiddagen in de omgeving van Bilthoven, Bunnik enz. enkele Haematopota- en Tabanus-soorten gevangen op paarden v.n.l. maar ook wel op runderen.

Tabanussoorten waren al heel zeldzaam. De Haematopotasooten vertoonden zich echter, door den niet warmen zomer, ook niet in grooten getale.

Meerdere overbrengingsproeven met Tabaniden werden verricht.

Deze proeven eischen veel geduld en vergen zeer veel tijd van den onderzoeker.

Bij de overbrengingsproeven van surra moet niet met een interval worden gewerkt, om zooveel mogelijk kansen van aanslaan van de infectie te krijgen.

Door de proeven van Nieschulz in Ned.-Indië verricht is aangetoond, dat hoe korter het interval van het steken, op een ziek en daarna op een gezond dier is, hoe grooter de kans van overbrenging.

Na een interval van 24 uur maximaal kon nog een heel enkele maal surra worden overgebracht. In de natuur zal de meeste kans op een overbrenging van de ziekte bestaan, als een bloedzuigende Tabanide wordt verjaagd en met waren bloeddorst onmiddellijk daarna op een ander dier steekt en zijn bloedmaaltijd voortzet. Bij proeven op Sumatra in samenwerking met Nieschulz gedaan, werden tabaniden tijdens het zuigen aan de vleugels afgenomen, op

een ander dier overgezet en ze begonnen onmiddellijk weer met bloedzuigen, dachten niet aan wegvliegen.

Deze gegevens werden benut bij onze proeven in het laboratorium met kleine proefdieren. De surrazieke muis werd aan nekvel en staart vastgehouden, het insect werd in een glazen buisje op den buik van de muis gezet. Bij werkelijk hongerig zijn van de Tabanide volgde dan wel een enkele maal een steken en bloedzuigen, blijkbaar werd de natuurlijke afkeer voor den muizengeur dan overwonnen. Het is bekend, dat Tabaniden zeer kieskeurig zijn in de keuze van gastheer, in de natuur worden sommige soorten vrijwel alleen op paarden, andere bijna uitsluitend op runderen, andere weer op karbouwen aangetroffen.

Voor het gemakkelijker laten overwinnen van den afkeer voor den muizenreuk, bleek het wel dienstig den buik van de muis met een watje met wat suikerwater licht te bevochtigen. Tabaniden zuigen zich in 5 à 6 minuten vol, dus werd na 1 minuut zuigen op het zieke dier de Tabanide afgenomen en op een gezond dier overgezet. Heel vaak wilde dan de vlieg ook niet doorgaan met zuigen op het gezonde dier, was te veel verschrikt of anderszins. Na afloop van het volzuigen werd de vlieg gedood met een aetherwatje en werd het bloed in het achterlijf aanwezig, onderzocht op trypanosomen om te zien of het insect werkelijk ook bij het zieke dier bloed had opgenomen. In den steeksnuut werden 2 of 3 trypanosomen aangetroffen.

Hoewel veel tijd aan het vangen en aan de overbrengingsproeven met Tabaniden besteed is, is het niet mogen gelukken positieve resultaten te verkrijgen, bij geen der proefmuizen is de surra-infectie aangeslagen.

Na het eindigen van den zomer, toen geen Tabaniden meer in de natuur voorkwamen, (de insecten lang in leven te houden of te kweken was mij niet gelukt) werden diverse proeven voor overbrenging met *Stomoxys calcitrans* verricht. Door een groot aantal proeven te nemen (in totaal werd getracht 20 muizen te infecteeren met een totaal van 200 van deze *Stomoxys*vliegen) konden we met deze insecten een 3-tal positieve overbrengingsproeven bewerkstelligen.

De incubatietijd bedroeg aldus bij infectie door 5—10 vliegen 10—15 dagen.

Deze muizen, waarbij de infectie was aangeslagen waren alle geïnficeerd met trypanosomen van den naganol-atoxylvasten stam. Bij flink positief bloedsbeeld werden de muizen intraveneus geïnjecteerd met 400 mg atoxyl, per K.G. muis uitgedrukt, zooals gewoonlijk en de tijdactiecurven, aangevende het gedragen van de trypanosomen, werden getraceerd zooals bij alle proeven met den naganol-atoxylvasten stam te voren beschreven. De curves zijn opgenomen in **curvetabel XII**.

De curven a, b, c, en d aangevende het gedrag van de trypanosomen van resp. muizen 1574, 1680 en 1699 liepen alle zwak naar beneden.

De nummers van deze muizen zijn ook opgenomen in het overzicht van de proevenindeeling op pag. 60 en 61 waarbij  aangeeft het overbrengen door stomoxys.

Zooals in deze indeeling is aangegeven, is het slechts éénmaal mogen gelukken van deze muizen wederom door *Stomoxys surra* te laten aanslaan op muizen.

De curven geven dus aan den toestand van den stam wat betreft zijn gedrag tegenover atoxyl na 1 en 2 passages door *Stomoxys*.

Het bloedsbeeld van m. 1574 (curve a) was den dag volgende op dien van de intraveneuze injectie van 400 mg atoxyl, negatief en bleef negatief, de trypanosomen van den vasten stam bleken dus door 1 passage door *Stomoxys* nu gevoelig te zijn geworden voor 400 mg atoxyl. M. 1680 werd geïnficeerd met trypanosomen die 2 maal door *Stomoxys* gepasseerd waren. Het bloedsbeeld van m. 1680 (curve b) was eveneens den dag na injectie negatief, de trypanosomen recidiveerden na 10 dagen, dus 400 mg atoxyl was niet in staat het proefdier blijvend te steriliseeren.

Bij m. 1699 (curve c) na 1 stomoxyspassage waren ook de trypanosomen den dag na de injectie verdwenen uit het periphere bloed, maar traden na 5 dagen wederom daarin op.

Als resultaat van deze weinige gelukte overbrengingsproeven kan dus worden vermeld dat door 1 of 2 passages door stomoxys van

een vasten stam resulteert een stam gevoelig voor of relatief vast tegen 400 mgr atoxyl.

De duur van het verblijf in den steeksnuut van het overbrengend insect is zeer kort. Dat het verblijven van den trypanosomenstam in een ander milieu, een stam verandert, is aangetoond in de proeven van passage door andere diersoorten dan de muis, onder IIc beschreven.

Waarschijnlijk speelt hier echter de groote rol het overbrengen van slechts een klein aantal van trypanosomen, dus selectie, zooals bij de imitatie-natuurlijke overbrenging onder IIe beschreven.

Proeven met den naganolvasten stam.

Vanaf den naganolstam werd getracht een zestal muizen te infecteeren met een totaal van 65 *Stomoxys calcitrans*. Bij geen der 6 muizen is de surra-infectie aangeslagen.

Tenslotte zij nog medegedeeld dat getracht werd een proefpaard te infecteeren met een 40-tal *Stomoxys*-exemplaren, die direct tevoren op muizen hadden gestoken. Het paard is niet ziek geworden, heeft nooit trypanosomen in het periphere bloed vertoond.

SAMENVATTING EN CONCLUSIES.

- I. Dat de verwekker van de surra (*Trypanosoma evansi*) in kleine proefdieren, in casu muizen, een groote *vastheid* kan verkrijgen tegen *naganol*, is door mijn proeven bewezen.

Verder kan de surratrypanosoom in muizen maximaal vast worden tegen *atoxyl* en een zekere vastheid verkrijgen tegen *naganol*, als deze middelen *gecombineerd* simultaan worden toegediend.

- II. In *Ned.-Indië* zouden door het toepassen van *naganol* bij karbouwen en runderen en *naganol-atoxyl* simultaan bij paarden, zooals dat tot heden in de praktijk geschiedt, naganolvaste en naganol-atoxylvaste stammen kunnen worden gevormd. Gemakkelijk zou vastheid kunnen ontstaan bij het toedienen van subtherapeutische doseeringen van geneesmiddelen. In de beginjaren der surrabestrijding in het groot in *Ned.-Indië* werden paarden z.g. prophylactisch behandeld met 1 g. *naganol* per dier, wat bleek een paard minstens één maand tegen de infectie

te beschermen, dus de dosis was op zichzelf beschouwd hoog genoeg. Dat echter bij het voorafgaande massabloedonderzoek van natiefpraeparaten van enkele honderden paarden licht een enkele trypanosoom in het praeparaat over het hoofd kon gezien worden of een enkele reeds in het bloed aanwezige toevallig niet in het praeparaat kon worden getroffen, is duidelijk. Dergelijke paarden krijgen een te geringe dosis en hun trypanosomen worden daardoor vast. Thans is dat gevaar van te kleine dosis bezworen door alle paarden als prophylaxis de curatieve doseering (3,5 g. naganol + 3,5 g. atoxyl per paard) toe te dienen.

Een ander gevaar vormen natuurlijk altijd de recidive gevallen bij paarden, waarbij de recidive-trypanosomen geneesmiddelvast zijn geworden.

Dat in surrastreken in N.-I., waar reeds veel met naganol is gewerkt, de behandeling met geneesmiddelen werkelijk minder succes heeft dan vroeger, is nog niet klaar aan het licht gekomen.

Wel is opvallend dat op Java, waar meer herhaaldelijk paarden behandeld zijn, dan op de buitenbezittingen, curatieve behandeling van paarden meestal minder succes schijnt te hebben dan op Sumatra, waar ik zag dat diverse zwaardere klinische gevallen nog wel te genezen waren met naganol-atoxyl.

Zeër wel mogelijk is ook, dat er nog meer kans bestaat in diverse streken, dat naganolvaste trypanosomen bij runderen en buffels worden gevormd dan bij paarden, aangezien deze dieren slechts uitsluitend met naganol worden ingespoten, en vaak met te lage z.g. prophylactische doseeringen (3 g. per karbouw van 750 K.G. lichaamsgewicht). Dit is een te lage dosis op zichzelf beschouwd maar ook te laag om het feit, dat we bij karbouwen met chronisch ziekteverloop (dragere zijn) ook tijdens een trypanosomenvrije periode niet kunnen spreken van „prophylactische behandeling”.

Karbouwen en runderen moeten dan ook altijd met hoge doseeringen van medicamenten worden behandeld.

III. Wat verder zal gebeuren met een vasten trypanosomenstam,

als hij eenmaal is ontstaan, werd in de conclusie van de diverse hoofdstukken reeds vermeld.

Bij de slaapziekte in Afrika blijft waarschijnlijk de Tryp. gambiense steeds in denzelfden vertebratengastheer, den mensch. In Ned.-Indië wordt de surra onderhouden door *buffels*, die als *passagedieren* een grooten invloed kunnen hebben op de geneesmiddelvastheid van bij het paard ontstane vaste stammen, in den zin van *vermindering van de vastheid*.

In mijn proeven komt uit, dat de bij muizen gevormde vastheid vermindert door passage door de cavia, de vastheid komt echter in muizen later weer terug.

De bij buffels ontstane vastheid zal behouden blijven omdat de trypanosomen daarna ook steeds in buffels voortleven. Bij het inspuiten van buffels, dienen we dus nog voorzichtiger te werk te gaan, dan bij paarden, omdat zoo'n éénmaal in de karbouw gevormde vaste stam geen verzwakking door gastheerwisseling zal ondergaan.

- IV. Bij *menging* in caviae van *vaste* en *gevoelige surrastammen* (van den muis afkomstig) resulteerde bij mijn proeven als eindtoestand een gevoelige surrastam, een verdunning van den vasten door den gevoeligen stam.

De gifgevoelige trypanosomen zullen aldus door re-infectie wellicht ook in den karbouw de overhand krijgen op de geneesmiddelvaste.

- V. Verder zal de *overbrenging door vliegen*, Tabaniden, Stomoxys, door selectie van een klein aantal van trypanosomen van een geneesmiddelvasten stam wederom *een vrij wat gevoeliger stam* terugvormen.

Resumeerende zou ik tot de conclusie willen komen dat men bij de surrabestrijding voor het ontstaan van vaste stammen bij paarden, minder beducht behoeft te zijn dan bij karbouwen en eventueel runderen.

Ook voor bij paarden gevormde gifvaste stammen is het gevaar van voortleven als zoodanig echter niet uitgesloten. De vastheid blijkt ondanks allerlei beïnvloeding een zeer hardnekkige verkregen eigenschap van de trypanosomen te zijn.

VI. Bij contrôles van de stammen bleek de naganolvaste stam tevens een maximale atoxylvastheid te bezitten.

Naganol en (naganol) atoxylvaste stam bleken tevens vast te zijn tegen diverse andere chemotherapeutica waarvan de voornaamsten zijn tryparsamide en salvarsan.

Wel bleken de vaste stammen nog even gevoelig voor antimoonpraeparaten (tartarus emeticus, antimosan, neoantimosan-Fuadin) als de normale gevoelige surrastam.

Een uitzondering hierop vormt neostibosan, waartegen beide stammen vast bleken.

Tot op heden worden karbouwen en runderen behandeld uitsluitend met naganol, en paarden met naganol-atoxyl simultaan.

De resultaten van mijn proeven wijzen op de *wenschelijkheid* bij paarden *behalve naganol-atoxyl ook tartarus emeticus* in de combinatie op te nemen en zeker karbouwen en runderen niet uitsluitend met naganol maar met naganol-atoxyl en beter nog tevens met tartarus emeticus gecombineerd simultaan te behandelen.

Tot nu toe behandelde men karbouwen enkel met naganol; bij paarden kwam men er niet met naganol alleen, maar gaf atoxyl erbij. Bij paarden zou slechts een kleine dosis tartarus emeticus moeten worden bijgevoegd (toxische werking). Daarom alleen al kan niet geheel het atoxyl door antimoon worden vervangen, beter is het bij naganol een dosis atoxyl te geven gecombineerd met een kleine dosis antimoon. In plaats van tartarus emeticus zouden ook de minder toxisch werkende antimoon-paerparaten (Antimosan en Neoantimosan = Fuadin) kunnen worden gebruikt, tenzij deze voor de praktijk te kostbaar zullen blijken te zijn. In ieder geval zal, steunende op de resultaten van mijn proeven, Neostibosan niet kunnen worden aanbevolen.

Een combinatie naganol-atoxyl-tartarus emeticus simultaan gegeven zal de verkieslijkste methode van behandelen zijn.

LITERATUUR.

- Adant, M., (Brussel). Au sujet de l'arsénorésistance des trypanosomes.
C. R. Soc. Biol. 106, 57—58 (1931).
- Akazawa, (Fusan). Studies on the drug-fastness of ratbite fever spirochete *Spir. morsus muris*. Bismuth fastness.
J. Jap. Soc. vet. Sc. pp. 95—118.
- Arnaud, Au sujet de l'arséno-résistance de la trypanosomiase humaine.
Bull. Soc. path. exot. 1930, No. 5.
- Baerman, G., Die Behandlung der Surra mit „Bayer 205”.
Beiheft Arch. f. Schiffs u. Trop. Hyg. 1922, 6, pp. 73.
- Bakker, S., Een en ander over surra in den amtskring Padang Sidempoean.
N.-I. Bl. v. Diergenk. en Dierenteelt 1925, 37, pp. 153.
- Barlovatz, A., Le liquide céphalo-rachidien chez quelques trypanosés devenus arsénorésistants pendant le traitement.
Ann. Soc. Belge de Med. Trop. (1930) Dec. Vol. 10 no. 4 pp. 415—421.
- Barlovatz, A., La trypanosomiase arsénorésistante est elle transmissible d'homme à homme?
Bull. Soc. Path. exot. 23, pp. 499 (1930).
- Barlovatz, A., l'Arsénorésistance dans le traitement de la trypanose humaine par le trypanarsyl (tryparsamide Belge).
Bull. Soc. Path. exot. (1929) 22, pp. 201.
- Berg, H., Die Eignung von „Bayer 205” zur Bekämpfung der Afrikanischen Haustiertrypanosomen.
D. M. W. 1925, 33 Jahrg. No. 34 pp. 561.
- Branden, F. v. d., L'action du Naganol „Bayer 205” vétérinaire sur les infections à Tryp. congolense et à Tryp. dimorphon.
Ann. Soc. Belge med. trop. 1926, 6, pp. 207.

- Branden, F. v. d., Au sujet de l'arsénorésistance dans le traitement de la trypanose humaine par le trypanarsyl.
Bull. Soc. Path. exot. 1929, 22 pp. 540.
- Brandt, R., Zur Frage der indirekten Salvarsanwirkung.
W. Kl. W. 1931 No. 2, 1225.
- BremI, A. und Nierenstein, M., Weitere Beobachtungen über atoxylfestigkeit der Trypanosomen.
D. M. W. 1908, 34 pp. 1181.
- Browningen Gulbransen, Interference phenomenon in the action of chemotherapeutic agents in trypanosome infection.
J. of Path. a. Bact. 1927, 30 pp. 513.
- Brussin, A. M. en Kalajew, A. W. (Moskou). Die Bedeutung des Komplements und der Blutplättchen für die Feststellung der Thrombocyto-barine. XII Mitteilung.
Zschr. f. Immun. Forsch. 70, pp. 497—521 (1931).
- Brussin, H. H. u. Beletzky, Rieckenbergs Phänomen und dessen Anwendung in bezug auf Immunitätsvorgänge.
Zbl. f. Bakt. Orig. 1925, 96 pp. 32.
- Citron, H., Über die Beseitigung der Arsenresistenz von Trypanosomen.
Zbl. f. Bakt. Dec. 1930 100 Band No. 11/12 Ref.
- Citron, H., Versuche über die Beeinflussung der Salvarsanfestigkeit.
Zschr. f. Imm. Forsch. 1931 Vol. 69 No. 5/6 pp. 464—472.
- Collier, W. A., Untersuchungen über die Festigung von tsetse-trypanosomen gegen Bayer 205 und Arsenikaliën.
Arb. Staatinst. ex. Ther. 1924, 17 pp. 26.
- Dolfein, Lehrbuch der Protozoënkunde (1927).
- Douwes, J. B., Trypanosomen bij het schaap.
Tijdschr. v. Diergeneesk. 1920, 47—14.
- Duke, H. L., Trypanosoma gambiense in Monkeys and Ruminants. Prolonged infection, Immunity and Superinfection.
Parasitology 1931 July Vol. 23 No. 3 pp. 235—345.
- Duke, H. L., Experiments on the cyclical transmission by Glos-

- sina palpalis of arsenic-fast strains of polymorphic Trypanosomes.
- Report of the Intern. Comm. of the Leagues of Nations for the study of Human Trypanosomiasis, 25, 1927.
- Edwards, J. F., The chemotherapy of Surra (*Trypanosoma evansi* infections) of horses and cattle in India.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg. 1926, 20, pp. 10.
- Ehrlich, Chemotherapie von Infektionskrankheiten.
Zt. f. ärztl. Fortbild. (1909) pp. 721.
- Ehrlich, Über den jetzigen Stand der Chemotherapie.
Bericht der chemischen Ges. (1909) 42 Jahr. pp. 17.
- Ehrlich, Chemotherap. Trypanosomen Studien.
Berliner Klin. Wochenschr. No. 9, 12. (1907).
- Ehrlich, Über die neuesten Ergebnissen auf dem Gebiete der Trypanosomenforschung.
Arch. f. Schiff. u. Trop. Hyg. 13, 91, (1909).
- Ehrlich, Experimentelle Untersuchungen über Immunität. I. Über Ricin.
D. M. W. 1891, No. 32.
- Pfeiler, W., Kasuitische Mitteilungen über ein anscheinendes Versagen der „Bayer 205“ Behandlung bei an natürliche Beschälseuche leidende Pferden.
Zbl. f. Bakt. Orig. 1922, 88 pp. 48.
- Freund, R., Über die antimutative Wirkung der „Bayer 205“.
Zschr. f. Immunitätsf. 43, pp. 253. (1925).
- Gonder, Untersuchungen über arzneifeste Mikroorganismen I Tryp. lewisi.
Zbl. f. Bakt. I 1912, Orig. 61 pp. 102.
- Halberstädter, L., Untersuchungen bei experimentellen Trypanosomenerkrankungen.
Zbl. f. Bakt. Orig. 1905 38 pp. 525.
- Hooft, v., Action du Bayer 205 sur les trypanosomiasis animales.
Ann. Soc. Belge Med. Trop. 1924 Nov. 4 No. 2 pp. 255—256.
- Jacoby, M., Über die Herstellung von serumfeste Trypanosomenstämme.
Med. Klin. 1909 pp. 252.

- J a c o b y, M. en H e i d e l b e r g e r, M., Chemotherapy of Trypanosome and spirochete infections, Chemical series. N. Phenyl-glycine amide-p. arsomiacid.
J. of exp. med. 1919. 30, pp. 411.
- J a n c s o v., II Photodynamisches therapeutisches Interferenzphänomen bei den experimentellen Naganainfektion.
Zbl. Bakt. I. Orig. 122 393—400.
- J a n c s o, v., Pharmakologische Beeinflussung des Reticuloendothels.
Kl. W. 1931 No. 12.
- J a n c s o, v., Photobiologische Studien in der Chemotherapie I Lichtempfindliche Trypanosomen in trypaflavin behandelten Tieren.
Zbl. Bakt. I Orig. 122 388—392 (1930).
- J o l l o s, V. (1921), Experimentelle Protistenstudien I. Untersuchungen über Variabilität und Vererbung bei Infusoriën.
Arch. f. Protistenk. 43, 1.
- J o l l o s, V. (1921), Variabilität und Vererbung bei Protistenk.
Centralbl. f. Bakt. Orig. 93, 22. (Beiheft).
- J u n g b l u t e n M c. G i n n, The rôle of the reticulo-endothelial-system in immunity.
J. of exper. Med. 1930 51 pp. 5.
- K a p u s s t o, Ml., Zur Frage der Bedeutung der Immunkörpers für den chemotherapeutischen Effect.
Zbl. Bakter. I. Orig. 122 380—388 (1931).
- K a z a n s k y, J., Sur la résistance du Tryp. equiperdum vis à vis du „Bayer 205” (Naganol).
Bull. Soc. path. exot. 1927, 20, S. 413.
- K i k u t h & R e g e n d a n z, Z., Über die Beziehungen der chemotherapeutischen Mittel zum „Retikuloendothel”.
Imm. Forsch. g. 1929 61 422.
- K l i g l e r, Sensibilité et résistance aux infections à trypanosomes. La durée, la spécificité et la transmission héréditaire de la résistance conférée par le traitement avec le Bayer 205 (Germanine ou Moranyl).
Les Cahiers de Medecine veterinaire.

- Kligler en Weitzman, Susceptibility and Resistance to Trypanosome Infections I Attempts at immunisations with dead and attenuated Trypanosomes.
Ann. Trop. Med. et Paras. 1926 Juni 14 Vol. 20 No. 2 pp. 147—160.
- Kligler en Weitzman, The mode of action of Bayer 205 on trypanosomes.
Ann. of trop. med. and parasit. 1925, 19, 235.
- Kolle, Über den Chemotherapeutischen Wirkungsvorgang und die Arzneifestigkeit bei Bayer 205 und anderen chemischen Stoffen.
Arb. a. d. Staatsinst. f. Exp. Therapie u. d. Georg. Speyer-Hause 1928. H. 21.
- Kroo, H. en Mano, J., Über die Bedingungen optimaler chemotherapeutischer Wirkung.
D. M. W., 1927, 603.
- Kroo, H. en Schulze, F. O., Über die Bedingungen optimales chemotherapeutischer Wirkung. Ergebnisse an Menschen.
D. M. W. 1927, 1759.
- Kroo & Jancso, Die Bedeutung des Reticuloendothels für die Immunität und Chemotherapie.
Z. Hyg. 1931. 112. 544.
- Kritschewsky, J. L. & Kaganova, S. S., Zur Frage der antimutativen Wirkung der Germanins.
Ztschr. f. Immunitätsf. u. Experim. Therap. 1929. Vol. 61 No. 5/6 pp. 478—485.
- Kritschewsky, J. L. en Brussin, A. M., Von der Wirkung hypertoxischer Dosen Salvarsan auf salvarsanfeste Trypanosomenrassen u.s.w.
Ztschr. f. Imm. Forsch. 1924. 39. 513.
- Kritschewsky J. L. en Demidowa, L. W., Das Natriumthiosulfatphänomen. Die Verwandlung der salvarsanfesten Spirochäten zu salvarsanempfindlichen.
Zschr. f. imm. forsch. 73 Band. 3/4 1932 pp. 303—311.
- Kritschewsky, I. L. en Tscharikower, R. S.,

- (1925). Über Antikörper, die Mikroorganismen mit Blutplättchen beladen. Thrombozytobaringen.
Ztschr. f. Imm. f. 53, 506.
- Kudicke and Collier, W. A., 1925. Intrakutane Superinfektionsversuche an Tsetzekranken Kaninchen mit Trypanosomen gleicher Art.
Arch. f. Schiffs. u. Tropenhyg. 29. 407.
- Lannoy, L., Nicolle, P. et Prieur, M., Des actions synerigiques du Bayer 205, 309 Fourneau et de quelques composés organiques d'arsenic, sur l'infection expérimentale à Trypanosoma congolense de la souris.
C. R. Soc. Biol. 107, 1498—1501 (1931).
- Lannoy, L. et Prieur, M., Résistance de Trypanosoma brucei au 205 Bayer 309 Fourneau chez le lapin et avirulence pour la souris.
C. R. Soc. Biol. 103, 48—483.
- Leupold, F., Gewinnung und Eigenschaften von „Bayer 205“-festen Trypanosomenstämmen.
Arbeiten aus dem Staatsinstitut für experimentelle Therapie und dem Georg Speyer-Hause zu Frankfurt A.M. 1924. Heft 17, pp. 19.
- Leupold, F., Die Verhütung einer Bayer 205 Festigkeit im Simultanen Kombinationsversuch.
Arb. a. d. Staatsinst. f. exp. Therapie u. d. Georg Speyer-Hause 1928. Heft 21, pp. 110.
- Leupold, F., Untersuchungen über Recidivestämme bei Trypanosomen mit Hilfe des Rieckenberg's Phänomens.
Zschr. f. Hyg. 1928, 109, 144.
- Leupold, F., Die Bedeutung der Blepharoplasten als Angriffspunkt chemotherapeutischer Substanzen.
Zschr. f. Hyg. (1925). 104. pp. 641.
- Mayer, M., Bemerkungen zu der Arbeit: Ein Fall einer Gewisse 205 Festigkeit bei einer beschälseuchekranke Stute von W. Walter u. W. Pfeiler in No. 14 dieser Zeitschrift.
D. tierärztliche W. (1921) 29, pp. 287.

- Mayer, M., Über intralumbale Behandlung mit „Bayer 205“ bei Trypanosomenkrankheiten.
Arch. f. Schiffs. u. Tropenhyg. 1921. 25 pp. 259.
- Mayer, M., Über Resorption und Wirkung der Trypanosomenheilmittels Bayer 205 bei innerlicher Behandlung.
Arch. f. Schiffs. u. Trop. Hyg. 1922. 26. 237.
- Marks, Über einen arsenfesten Bakteriënstam.
Zt. f. Imm. 1910. Orig. 6. pp. 293.
- Mesnil, F. & Brimont, E., Sur les propriétés des races de trypanosomes résistantes à l'atoxyl et aux serums.
C. R. Soc. Biol. 1908, 64, pp. 637.
- Mesnil, F. & Blanchard, M., Sensibilité au sérum humain normal de trypanosomes d'origine humain.
Bull. Soc. Path. Exot. 9. 81 (1916).
- Morgenroth, G., Die Bedeutung der Variabilität der Mikroorganismen für die Therapie.
Zentr.bl. f. Bakt. Bt. I. Orig. 93, 94 Beiheft (1924).
- Morgenroth en Rosenthal, Experimentell therapeutische Studien bei Trypanosomeninfektionen I Mitteilung.
Zschr. f. Hyg. 68. 418.
- Morgenroth en Freund, R., (1924). Über die Wirkungsweise von „Bayer 205“ bei der experimentellen Trypanosomeninfektion der Maus.
Klin. Wochenschr. 3e Jhg. nr. 2, pp. 53.
- Morgenroth en Halberstädter, (1911). Zur Kenntnis der Arzneifestigkeit der Trypanosomen.
Arch. f. Schiffs u. Tropenhyg. 15. 237.
- Moschkowski, Sch., Zur Frage des Wirkungsmechanismus von Germanin (Bayer 205) auf Trypanosomes.
A. f. Schiffs u. Trop. Hyg. 1927, 31, pp. 541.
- Mouattia, A., Le surra à l'île Maurice et son principal vecteur *Stomoxys nigra*.
(Bull. of Agr. Dep. Mauricius).
- Munter, Fr., Die klinischen Bewertung der trypanoziden. Funktionen des Lebers.
Klin. W. 1925. 1967.

Nieschulz, O., Über das Vorkommen von Trypanosomen bei unseren heimischen Wirbeltieren und etwas über ihre kultur auf künstlichen Nährboden.

Naturwiss. w. neue Folge 1922, 21, No. 12.

Nieschulz, O., Veeartsenijkundige Mededeeling No. 75. Surra-übertragungsversuche auf Java und Sumatra.

Neuman, C., Die Isolierung und die Entwicklung von Anärobier-sporen.

Zentr.bl. f. Bakt. Paras. u. Inf.krankh. 1930, pp. 100.

Oehler, R., Über die Gewinnung reiner Trypanosomenstämme durch Einzelzellenübertragung.

Zentr.bl. f. Bakt. Orig. 1922, 88, pp. 48.

Prigge, R., Experimentelle Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen chemotherapeutischer Wirkung und retikuloendotheliale System.

Med. Klin. 1931 No. 27, pp. 1000.

Prowazek, Arch. f. Schiffs u. Tropenhyg. 1909 Band 13.

Regendanz, P. en Kikuth, W., Über die Bedeutung der Milz für die Bildung des vermehrungshindernden Reaktionsproduktes (Taliaferro) und dessen Wirkung auf der Infektionsverlauf der Rattentrypanosomiasis.

Zentr.bl. f. Bakt. Deel I Orig. 103, 271, (1927).

Regendanz, P. en Kikuth, W., Über Aktivierung labieler Infektionen durch Entmilzung (*Piroplasma canis* Nutallia brasiliensis Bartonella Opossum, spirochaeta didephydis).

Arch. f. Schiffs u. Trop. Hyg. 32, 587, (1928).

Reichenow, E. & Regendanz, P., Über Flohpassage normaler und mit Arsenophenylglycin vorbehandelter Rattentrypanosomen.

Abhandlungen aus dem Gebiet der Auslandskunde.

Bd. 26 „Festschrift Nocht“ pp. 446 (1927).

Reiner, L. u. Köveskuty Jr., Über den Wirkungsmechanismus von „Bayer 205“.

D. M. W. 1927 pp. 1988.

Riekenberg, P., Eine neue Immunitätsreaktion bei experimenteller Trypanosomeninfektion: die Blutplättchenprobe.

Zeitschr. f. Immunitätsf. 26. 53 (1917).

- Ritz, H., Über Rezidive bei experimenteller Trypanosomiasis.
D. med. Wochenschr. 40, 1355.
- Ritz, H., Über Rezidive bei experimenteller Trypanosomiasis.
Arch. f. Schiffs u. Trop. Hyg., 20, 397. (1916).
- Ritz, H., Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd. 9 1911, Heft 1. pp. 333.
- Robertson, M., The action of acriflavine upon *Bodo caudatus*.
Parasitology Vol. XXI No. 4, 30 Nov. 1929.
- Rodenwald, E. en Douwes, J. B., Die Anwendungen von „Bayer 205“ bei der surra des Pferdes in Niederländisch-Ostindien.
Arch. f. Schiffs u. Trop. Hyg. 1923 27, pp. 305.
- Rodenwaldt en Douwes, J. B., Over de toepassing van „Bayer 205“ bij surra van het paard in Ned. Indië.
N.-I. Bl. v. Dierg. en Dierenteelt 1922, 33, pp. 1—79.
- Rodenwaldt, E., Zur Frage der Chininresistenz der Plasmodien der menschlichen Malaria.
Arch. f. Schiffs. u. Trop. Hyg. Bd. 23, pp. 555, 1919.
- Rosenthal, Beiträge zur Immunität bei Trypanosomen infektionen. Über die mechanismus der chemotherapeutische Heilung.
Zschr. f. Immunitätsf. 1918, 27, 287.
- Roubaud, E., 1910 C. R. Ac. sl. CL 3 Dec. pp. 1156.
- Schereschewsky, J., Chininfestigkeit der Syphilisspirochaeten (Nichols stammen).
D. M. W. 1 No. 22, Jhrg. 56, 1930, pp. 921—922.
- Schmidt, F., Virulenzänderung des *Tryp. equinum* nach Behandlung mit „Bayer 205“.
Arch. f. Schiffs. u. Trop. Hyg. 1924, 28, pp. 397.
- Schmidt, Hans, Über Fuadin (Neo-Antimosan).
Arch. f. Schiffs u. Trop. Hyg. 35, Beiheft, No. 2, 70—79 (1930).
- Schnitzer, R., Chemotherapie.
Dtsch. med. Wochenschr. 1926, No. 2. 6. 7.
- Schnitzer, R., Übersichten Chemotherapie III Germanin: Verschiedenes Theoretische Untersuchungen.
D. M. W. 58 Jhrg. No. 7. pp. 254.

- Sch n i t z e r u. S i l b e r s t e i n, Zum mechanismus der chemotherapeutische Heilungsvorganges. Über die experimentelle Trennung der Kombination. Chemische Wirkung Ictus immunisatorius.
Zeitschr. f. Immunitätsf. 58, 159.
- S e e g e r t, J o a c h i m, Gunstige werking van gecombineerde behandeling van naganol en antimoon bij Mal de Cadeiras.
Arch. Schiffs u. Trop. hyg. 1930, 99—123.
- S e i, S., Über den nachweis von „Bayer 205“ in den Organen behandelter Tiere.
Arch. f. Schiffs u. Trop. Hyg. 1923, 27, pp. 257.
- S e y f f e r t, Einfluss des retikulo-endothelialen Systems auf den Ablauf der Infektion, die Entstehung des Immunität und den Chemotherapeutischen Effekt.
Z.bl. Bakt. 1929, 110, 232.
- S h a t t u c k, G. C., Further use of antimon-thioglycolamide in bilharziasis and trypanosomiasis.
J. trop. Med. 33 (1930).
- S h i g a, Über die Gewöhnung der Bakterien an Farbstoffe.
Zt. f. imm. 1913. Orig. 18, pp. 65.
- S c h i l l i n g, C. (Berlin), Der gegenwärtige Stand der Chemotherapie besonders der Tropenkrankheiten.
D. M. W. 1930. (955—958).
- S c h i l l i n g, C., Ein neues Immunisierungsverfahren gegen Trypanosomenkrankheiten.
D. M. W. 1912 1 pp. 13.
- S c h i l l i n g, C., Adrenalininjektion zur Provokation bei Trypanosomeinfektionen.
Arch. f. Schiffs. u. Trop. Hyg. 1919, 23, pp. 347.
- S c h i l l i n g, C., Spontaneous and Experimental Infection.
Jl. Trop. Med. and Hyg. 1930. Nov. 15, Vol. 23, No. 22, pp. 334—336.
- S c h i l l i n g, C. und S c h r e c k, H., Bleiben erworbene biologische Eigenschaften pathogener Protozoen bei der Passage durch die natürlichen Überträger erhalten.
D. M. W. 1930, II. 1163.

- Schilling, C. u. Jaffee, J., Weitere chemotherapeutische Versuche bei Trypanosomenkrankheiten.
Arch. f. Schiffs. u. Trop. Hyg. 1909, 13, pp. 585.
- Shintake, F., Über die Beeinflussung der Vermehrung der Trypanosomen durch „Bayer 205“.
Arch. f. Schiffs u. Trop. hyg. 1923, 27, pp. 433.
- Sice, Remarques sur les conceptions actuelles du traitement de la trypanosomiase humaine.
Bull. Soc. Path. exot. 1930, No. 7.
- Sonderkamp, J., Chemotherapeutische Versuche mit Bayer 1037.
Inaugural-Dissertation 1926.
- Steffan, P., Morphologische Untersuchungen über die Wirkung verschiedene Heilmittel auf Trypanosomen.
Ztsch. f. Hyg. 96, pp. 263.
- Trommsdorff, („Methodiek intraveneuze injectie muizen“).
Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt. Bd. 32 1909, Heft 2, pp. 568.
- Tsin Sung Kiang, Über die Bildung spezifischer Antikörper durch die Behandlung mit „Bayer 205“.
Arch. f. Schiffs u. Trop. Hyg. Bd. 29, 1925, pp. 572.
- Tsuzuki, M., Die Kombinationstherapie der Trypanosomeninfektion.
Zschr. f. Hyg. 1911, 68, pp. 364.
- Uhlenhuth, Kuhn u. Schmidt, Über ein neues trypanozides Antimonkomplexsalz (Heyden 661).
Arch. f. Schiffs. u. Trop. Hyg. 1925 (3).
- Uhlenhuth, Kuhn u. Schmidt, Über ein neues trypanozides Antimonkomplexal. (Heyden 661).
D. M. W. 1924, No. 38.
- Uhlenhuth, Kuhn u. Schmidt, Chemotherapeutische Antimonstudien.
Arch. f. Schiffs u. Trop. Hyg. 1925, Bd. 29, pp. 623.
- Uhlenhuth, P. u. Seiffert, W., Entwicklung und praktische Ergebnisse der modernen Antimoontherapie bei Infektionskrankheiten.
Zbl. Bakt. 1 Orig. 122, 51—53 (1931).

- Uhlenhuth, P. u. Seiffert, W., Neue Ergebnisse der experimentellen Antimontherapie mit besonderer Berücksichtigung der Arseno-Stibio-Verbindungen.
Klin. W.schr. 1931, 1751—1755.
- Vaucel, M. en Boisseau, R., L'action du moranyl dans l'arsénorésistance de la trypanosomiase humaine.
Bull. Soc. Path. exot. 1931, Mei 13 Vol. 24 No. 5 pp. 374—378.
- Voeghtlin, C. M., Dyer, A. and Miller, D. M., On drug resistance of Trypanosomes with particular reference to arsenic.
J. of pharm. a. exp. ther. 1924, 23, pp. 55.
- Voeghtlin, C. M., Dyer, A. and Miller, D. M.,
J. of pharm. a. exp. ther. 1920, 15, pp. 453—475.
- Voeghtlin, C. M., Dyer, A. and Miller, D. M.,
J. of pharm. a. exp. ther. 1920, 16, pp. 199 en 449.
- Walther en Pfeiler, Ein Fall einer gewissen „205 Festigkeit“ bei einer beschälseuchekranke Stute.
D. M. W. 1921, No. 14, pp. 173.
- Weduwen, J. der, Bijdrage tot de kennis van de beschutende werking van het reticulo-endotheliale stelsel.
Proefschrift Utrecht, 1931.
- Wester, J. J., Trypanosomen bij onze koeien.
Tijdschr. v. Dierg. 1920, 47, pp. 14.
- Wenyon, C. M., Trans. Roy. Soc. trop. Med. 22, 85 (1928).
- Yorke, Murgatroyd en Hawking, Studies in Chemotherapy IV. The action in vivo of certain arsenical and antimonial compounds and of Bayer 205 on *T. rhodesiense* and on atoxyl- and acriflavine-resistant strains of this parasite.
Ann. Trop. Med. and Parasit. 1931. Aug. 13, Vol. 25 No. 2, pp. 313—349.
- Yorke, Murgatroyd en Hawking, Studies in Chemotherapy V. Preliminary contribution on the nature of drug resistance.

- Ann. Trop. Med. and Parasit. 1931. Aug. 13, No. 2, pp. 351 tot 358.
- Yorke, Warrington en Murgatroyd, F., Studies in Chemotherapy III. The action in Vitro of certain Arsenical and Antimonial Compounds on *T. rhodesiense* and on Atoxyl and Acriflavine Resistant Strains of this Parasite. Ann. Trop. Med. and Parasit. 1930. Oct. 22. Vol. 24, No. 3. pp. 449—476 (26 refr.).
- Ziemann, Hans, Neuere aus dem Gebiete der Infektionskrankheiten, der Parasitologie und der exotische Pathologie. Med. klin. 1930, 286 en 321.
- Zwick en Knuth, Handbuch der Pathogenen Mikroorganismen.
- Zijp, P., Iets over de epidemiologie van de surra.
- N.-I. Bl. Diergen. en Dierenteelt 1922, Dl. 33, afl. 3, pp. 42.
-

STELLINGEN.

1. De Kupfersche stercellen in de lever zijn niet als een zelfstandig onveranderlijk celsysteem op te vatten.
 2. Bij de bestrijding van miltvuur in Ned. Indië, blijkt dat er verschillende stammen voorkomen, waarbij met de bereiding van sera en vaccins rekening moet worden gehouden.
 3. De indeeling van Piroplasmen volgens Reichenow berust op onjuiste gronden.
 4. In verband met het veelvuldig voorkomen in Indië van leptospirosen bij Inlanders is het gewenscht dat ook de dierenarts zijn aandacht wijdt aan de verbreiding der leptospireninfecties bij den hond.
 5. Het bepalen van de constitutie van een individu is niet mogelijk alleen door chemisch en physisch-chemisch bloedonderzoek.
 6. Het toepassen van sacraal anaesthesie bij propalsus uteri is niet in alle gevallen onverdeeld gunstig.
 7. Voor de z.g. open castratie van het mannelijke groote huisdier, ongeacht de methode, welke daarbij in toepassing wordt gebracht, verdient de locale anaesthesie de voorkeur boven de narcose.
-

