De phagocytose-reactie bij Brucella-infecties

DE PHAGOCYTOSE-REACTIE BIJ BRUCELLA-INFECTIES

H. EZENDAM

DE PHAGOCYTOSE-REACTIE BIJ BRUCELLA-INFECTIES

Diss. Utrecht 1939

DE PHAGOCYTOSE-REACTIE BIJ BRUCELLA-INFECTIES

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS DR. TH. M. VAN LEEUWEN, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER GENEES-KUNDE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN OP DINSDAG 13 JUNI 1939, DES NAMIDDAGS 3 UUR

DOOR

HENDRIK EZENDAM

GEBOREN TE SCHIEDAM

1939

DRUKKERIJ Fa. SCHOTANUS & JENS — UTRECHT

Aan mijn Moeder.
Aan mijn Vrouw.

VOORWOORD.

De voltooiing van dit proefschrift biedt mij de gelegenheid U, Hoogleeraren, oud-Hoogleeraren en Docenten der Geneeskundige- en Philosophische faculteit der Utrechtsche Universiteit, dank te zeggen voor het van U genoten onderwijs.

Deze dank geldt in de eerste plaats U, Hooggeleerde de Langen, Hooggeachte Promotor. Door Uw veelzijdige kennis was de tijd, die ik onder Uw leiding werkzaam mocht zijn, uiterst leerzaam. Door Uw groote werkkracht en Uw stimuleerende invloed wist U steeds belangstelling voor nieuwe vraagstukken op te wekken. Voor Uw steun bij de bewerking van mijn proefschrift, ben ik U zeer dankbaar.

De wijze waarop U de belangen van Uw assistenten behartigt, heb ik in hooge mate gewaardeerd.

Hooggeleerde Hijmans van den Bergh, een groot voorrecht acht ik het, onder Uw leiding werkzaam te zijn geweest. Uw beschouwende en steeds kritische wijze van denken heeft altijd mijn groote bewondering gehad. De wijze, waarop U de geneeskunst beoefent en Uw opvatting van de taak van den geneesheer, zal ik mij steeds tot voorbeeld stellen.

Zeer ervaren Brester, het is mij aangenaam te kunnen zeggen, hoezeer ik hetgeen U tot mijn klinische opleiding hebt bijgedragen, waardeer.

U, Zeergeleerde Hulst, dank ik voor de aangename wijze waarop gij mij steeds met raad en daad terzijde hebt gestaan.

Zeergeleerde van der Hoeden, zeer dankbaar ben ik voor de onontbeerlijke hulp die U mij bij het bewerken van mijn proefschrift hebt verleend. Uw goede raadgevingen en Uw opbouwende kritiek heb ik zeer gewaardeerd. Aan de vele uren die ik in Uw laboratorium heb doorgebracht, zal ik de meest prettige herinnering behouden.

Voor den tijd, waarin ik op zoo aangename wijze onder Uw leiding heb gewerkt, ben ik ook U, Zeergeleerde de Waard, dankbaar.

Hooggeleerde van der Kaay en zeergeleerde Beijers, de steun die U mij hebt verleend, heb ik op hoogen prijs gesteld.

Dankbaar ben ik de assistenten met wie ik gedurende deze jaren op zoo prettige wijze heb samengewerkt.

Zeer erkentelijk ben ik voor de medewerking, die ik altijd van de verpleegsters der verschillende afdeelingen mocht ondervinden.

Geachte mejuffrouw van Arkel en geachte mejuffrouw Jansen, U dank ik voor de hulp, die U mij bij het werk in het laboratorium hebt verleend.

Ook U geachte mejuffrouw Schilt dank ik voor uw hulp bij het schrijven van mijn proefschrift.

Waarde Stekelenburg, en waarde Verhoef, mijn hartelijken dank voor het vervaardigen van de teekeningen en de fotographieën.

INHOUD.

INLEIDING.

De klinische diagnostiek van Brucella-infecties levert dikwijls moeilijkheden op. Het gevolg is, dat de serologische reacties hierbij een belangrijke plaats innemen. In de meeste gevallen kan men met de agglutinatiereactie volstaan. Toch doet zich nogal eens de behoefte voor om naast deze, nog een andere methode van onderzoek toe te passen. In zulke gevallen is men dan in de eerste plaats op de complementbindingsreactie aangewezen.

Zonder aan de verdiensten van deze reactie te kort te doen heeft zij het onmiskenbare bezwaar dat de uitvoering tijdroovend is en bijzondere ervaring vereischt.

Ook al zijn nu de uitkomsten van beide reacties bekend dan is de klinicus, zooals we later zullen zien, in sommige gevallen nog niet geholpen.

Een derde methode is het aanleggen van een bloedcultuur. De uitvoering hiervan is al evenmin eenvoudig, terwijl slechts een positieve uitkomst waarde heeft. Bovendien is de uitslag pas na acht à tien dagen of later bekend.

Er blijven dus omstandigheden bestaan, waarin men naast de drie genoemde methoden van onderzoek gaarne nog de beschikking over een andere zou willen hebben om grootere zekerheid te verkrijgen, of een ziekte al dan niet aan een infectie met Brucella moet worden toegeschreven.

Sinds enkele jaren past Huddleson bij Brucella-infecties de phagocytosereactie toe. Neemt men kennis van de resultaten die hij hiermede heeft verkregen en van de

beteekenis die hij aan de reactie hecht, dan krijgt men de indruk, dat deze methode van onderzoek juist die zou zijn, waaraan behoefte bestaat. Want naast de mogelijkheid om er een infectie mede aan te toonen, evenals met de agglutinatie- en complementbindingsreactie, kent Huddleson aan de phagocytosereactie nog een bijzondere waarde toe. Zij zou een inzicht geven over al of niet bestaan van immuniteit. Daarbij komt dat de reactie eenvoudig in uitvoering is en weinig tijd vergt, dus als routine-methode is te gebruiken.

De publicaties van Huddleson zijn aanleiding geweest een onderzoek in te stellen naar de bruikbaarheid van de phagocytosereactie voor de diagnostiek der Bang-infecties.

Dat cellen, micro-organismen in zich kunnen opnemen, phagocyteeren, is reeds langen tijd bekend. Hoewel daartoe meermalen pogingen zijn aangewend, was, in tegenstelling met de agglutinatie en complementfixatie, de phagocytose nog niet in de vorm eener gemakkelijk uitvoerbare reactie, dienstbaar gemaakt aan de diagnostiek. Een gevolg hiervan is, dat de klinicus zich in het algemeen weinig voor vraagstukken op het gebied van de phagocytose heeft geïnteresseerd.

Alvorens tot bespreking van de uitkomsten van het ingestelde onderzoek over te gaan is een overzicht der litteratuur gegeven. Dit overzicht is beperkt gebleven tot die onderzoekingen en opvattingen uit de zeer omvangrijke litteratuur op dit gebied, welke van directe beteekenis werden geacht voor het te behandelen onderwerp.

HOOFDSTUK I.

LITTERATUUROVERZICHT.

Phagocytose.

Metchnikoff heeft in 1884 waarnemingen gepubliceerd welke aanleiding hebben gegeven tot het verrichten van vele onderzoekingen naar de rol die de leucocyten vervullen, in den strijd van het dierlijk organisme tegen bacterieele infecties. Hij had gezien dat eenige van de in zijn aquarium aanwezige Daphniae een eigenaardig uiterlijk vertoonden. Deze Daphniae bleken gevuld te zijn met micro-organismen, die, wat uiterlijk betreft, op gist geleken en de eigenschap hadden sporen te kunnen vormen. Voorts viel het op, dat verschillende dezer sporen in bloedcellen waren ingesloten, gephagocyteerd. Deze waarnemingen deden Metchnikoff op het denkbeeld komen dat er in het lichaam van de Daphniae een strijd gevoerd werd tusschen de micro-organismen eenerzijds en deze bloedcellen anderzijds. Om dit te controleeren heeft hij een aantal onderzoekingen verricht.

Het was bekend, dat, wanneer stukjes orgaan van een tevoren met miltvuur geinfecteerde muis of cavia onder de huid van een kikvorsch werden gebracht, deze orgaandeeltjes van uiterlijk veranderden. Toen Metchnikoff deze proeven nawerkte, zag hij dat de onder de huid gebrachte orgaanstukjes bleeker werden en na eenigen tijd door een slijmig exsudaat met de huid van de kikvorsch verbonden waren. Bij microscopisch onderzoek van dit exsudaat bleken er cellen te zijn, waarin zich miltvuurbacillen bevonden. Voor

nader onderzoek deed hij een stukje van het ingebrachte orgaan in een druppeltje exsudaat op een voorwerpglas en sloot het praeparaat met paraffine van de lucht af. In het praeparaat waren zoowel leucocyten als miltvuurbacillen aanwezig. Volgde hij het lot van deze beide organismen, dan zag hij na korten tijd, dat de bacillen ingesloten werden door de leucocyten, op dezelfde wijze als waarop een amoebe een alg in zich opneemt.

In een latere publicatie deelde Metchnikoff mede, dat het hem was opgevallen dat er in het bloed van caviae of konijnen die aan miltvuur waren gestorven, leucocytose bestond. Vaak konden in dit bloed miltvuurbacillen aangetoond worden, slechts zelden werden echter leucocyten gevonden, die bacillen bevatten. Hij vroeg zich daarom af of hierin de oorzaak moest worden gezocht van de groote gevoeligheid die deze proefdieren voor miltvuur bezitten.

Vervolgens heeft hij verschillende proefdieren gevaccineerd, daarna geïnfecteerd en later onderzocht. Hij kreeg de indruk dat de phagocytose na de vaccinatie was toegenomen. De conclusie die Metchnikoff uit al deze waarnemingen heeft getrokken, is de volgende:

De phagocytose moet als een gevolg van de immunisatie gezien worden. Hierbij zou er iets aan de leucocyten veranderen, hetgeen zich uit door een grootere activiteit t.o.z. van de betreffende micro-organismen. De leucocyten nemen, zoo meende hij, de eerste plaats in bij de verdediging van het lichaam tegen micro-organismen.

Büchner vond echter dat ook serum, waarin geen cellen aanwezig zijn, een vernietigende invloed op bacteriën heeft, maar deze verliest na verwarming gedurende eenigen tijd op een temperatuur van 55° C. Pfeiffer zag cholera-vibrionen, die in de buikholte van proefdieren werden gebracht, zich tot bolletjes vervormen om daarna opgelost te worden (bacteriolyse).

Na het bekend worden van deze bactericide eigenschappen van serum van al of niet geïmmuniceerde proefdieren, werden

de opvattingen van Metchnikoff van verschillende zijden aangevallen. Zij, die aanhangers waren van de humoraal-pathologie gingen zelfs zoover, dat zij iedere functie van de leucocyten in het mechanisme van de immuniteit wilden ontkennen.

In 1894 verscheen van de hand van Metchnikoff een artikel, waarin hij de meening van zijn tegenstanders besprak. Hierbij legde hij de nadruk op de door Büchner opgeworpen theorie, dat de bactericide eigenschappen van het bloed afhankelijk zouden zijn van de leucocyten.

Deze zouden n.l. een stof afscheiden, alexine genaamd, die in staat zou zijn micro-organismen te vernietigen. In deze meening zag Metchnikoff een bevestiging van zijn opvatting, dat de leucocyten de voornaamste dragers der immuniteit zijn.

Door Pfeiffer werd nu echter de meening uitgesproken dat de leucocyten wel bacteriën kunnen opnemen, maar dat deze eerst gedood, of althans gedeeltelijk verzwakt moeten zijn. Hiertegenover stelde Metchnikoff zijn waarneming, dat de door de leucocyten ingesloten micro-organismen altijd dezelfde vorm en dezelfde kleurbaarheid hadden als die, welke buiten de cellen werden aangetroffen. Hij trok hieruit de conclusie dat de opvatting van Pfeiffer onjuist moest zijn, daar uit bovenstaande waarneming zou blijken, dat de bacteriën wel degelijk levend ingesloten kunnen worden. Deze opvatting werd gesteund door Büchner, die meende, dat leucocyten zeer zeker virulente bacteriën kunnen insluiten. Wel achtte hij het onjuist aan te nemen, dat de phagocytose het eenige verdedigingsmiddel tegen een bacterieele invasie zou zijn.

Sterk kwam de opvatting van Metchnikoff in het gedrang toen de passieve immuniteit, die optreedt door inspuiten van een immuunserum, bekend werd. Ook deze vorm van immuniteit meende Metchnikoff echter op een cellulaire terug te kunnen brengen. Hij baseerde deze meening op het door hem waargenomen feit dat onder invloed van het

inspuiten van een immuunserum leucocytose, dus een reactie van de cellen, optreedt.

Gabritschewski stelde zich de werking van immuunsera anders voor. Hij meende de locale reactie bij diphtherie-infectie's, vooral de necrose, te moeten toeschrijven aan toxinen, die door de diphtheriebacillen uitgescheiden worden. Daarnaast zouden deze toxinen een belemmerende invloed op de phagocytose uitoefenen. Door een immuunserum nu, zouden de cellen minder gevoelig gemaakt worden voor de toxinen, en ook voor hun remmende werking op de phagocytose.

In een verhandeling over de phagocytose, door Bordet in 1895 gehouden, sprak deze de meening uit, dat de rol der leucocyten bij de immuniteit niet secundair is aan de bactericide eigenschappen van het serum. Hij zag de mogelijkheid onder het oog, dat de leucocyten stoffen vormen, die bactericide eigenschappen hebben. Tijdens het leven zouden deze stoffen in de cellen ingesloten blijven. Dit laatste nam hij aan, omdat hem gebleken was, dat de bactericide eigenschappen van het bloed in vivo veel geringer waren dan in vitro. Door vaccinatie echter zou de aanmaak van deze stoffen kunnen toenemen, tengevolge waarvan een uittreden uit de cel zou kunnen plaats vinden.

Belangrijk zijn de onderzoekingen, die Denijs en Leclef in dezen tijd hebben gedaan. Zij vonden, dat konijnenserum een uitstekende voedingsbodem voor de streptococcus pyogenes was, maar het serum van een gevaccineerd konijn bleek de groei dezer streptococcen te remmen. Op grond hiervan namen zij aan, dat het serum een rol speelt bij de immuniteit. Bij verder onderzoek bleek, dat serum waarin leucocyten gesuspendeerd waren, aanvankelijk de groei der streptococcen remde. Het aantal dezer cellen bleek van beteekenis te zijn, namelijk, hoe grooter dit was, des te sterker was de remming van de groei.

Wat betreft de meening van sommige auteurs, dat de leucocyten stoffen uitscheiden, die schadelijk voor de micro-

organismen zijn, deelen deze schrijvers mede, dat zij vonden, dat serum, waarin gedurende vier uur bij een temperatuur van 37° leucocyten gesuspendeerd waren, zich na verwijdering hiervan hetzelfde gedroeg als oorspronkelijk het geval was geweest. Zij trokken hieruit de conclusie, dat in een mengsel van serum en leucocyten de schadelijke werking niet gebonden kan zijn aan door de cellen gesecerneerde stoffen.

Dat de immuniteit niet een eigenschap is van de leucocyten, toonden zij aan door leucocyten van een onbehandeld konijn te suspendeeren in serum van een gevaccineerd konijn. Het bleek hun, dat de phagocytose in dit mengsel sterker was dan wanneer dezelfde cellen in een normaal serum worden gesuspendeerd.

Men was het er dus wel over eens, dat de leucocyten een rol spelen bij de immuniteit, maar dat daarnaast het serum zelf eigenschappen bezit, die de micro-organismen in hun groei belemmeren of hen zelfs dooden. Het belangrijke verschil in de heerschende opvattingen was echter, waar men het zwaartepunt van de immuniteit moest leggen. Metchnikoff en zijn medewerkers meenden dit in de leucocyten te moeten leggen, anderen in het serum. Onder deze laatsten bevonden zich Denijs en Leclef, die zooals we zagen sterke argumenten voor hun opvatting naar voren brachten.

Tot nu toe was de techniek van de verschillende onderzoekers in principe ongeveer hetzelfde geweest. De leucocyten werden verkregen door injectie van bouillon of een andere vloeistof in de peritoneaalholte van een proefdier. Wanneer tengevolge hiervan leucocytose in de buikholte was opgetreden, werd deze gepuncteerd, of wel werd het proefdier opgeofferd. De leucocytenhoudende vloeistof uit de buikholte werd gecentrifugeerd, de bovenstaande vloeistof afgegoten, waarna de leucocyten gewasschen en opnieuw gesuspendeerd werden in serum.

Leishman gaf in 1902 een methode aan om de phago-

cytose in het totale bloed te onderzoeken. Hij mengde een geringe hoeveelheid bloed met eenzelfde hoeveelheid bacteriesuspensie en enkele druppels physiologische zoutoplossing op een voorwerpglas. Dit mengsel werd met een dekglas bedekt en gedurende 30 minuten op een temperatuur van 37° gebracht. Vervolgens werd het dekglas verwijderd, zoonoodig werden een paar druppels physiologische zoutoplossing toegevoegd en er werd een uitstrijk-praeparaat gemaakt, dat gefixeerd en gekleurd werd. Leishman telde het aantal gephagocyteerde micro-organismen in de leucocyten. Een bepaald aantal cellen werd onderzocht en het gemiddelde der per cel gephagocyteerde micro-organismen berekend. Op deze manier vergeleek hij de mate van phagocytose op verschillende tijdstippen en bij verschillende individuën.

Ongeveer terzelfder tijd verschenen publicaties van Wright en zijn medewerkers. Dezen zijn het, die de fundamenten hebben gelegd waar vele van de thans nog geldende theorieën op gebouwd zijn.

In 1903 deelde Wright mede, dat er zijns inziens nog geen zekerheid bestond of het serum eenige rol speelt bij de phagocytose. De feiten, die bekend waren, achtte hij onvoldoende om een goed inzicht hieromtrent te verkrijgen.

Teneinde dit nader te bestudeeren heeft Wright de methode van Leishman gemodificeerd en wel in dien zin, dat hij het proces niet op een voorwerpglas liet plaats vinden, maar in een capillaire buis, speciaal voor dit doel gemaakt. Om het bloed vloeibaar te houden, gebruikte hij natriumcitraat. Het bleek, dat de phagocytose geheel geremd werd, als de concentratie van het citraat in het milieu, waarin de phagocytose moest plaats vinden, 3 % bedroeg. Was deze 1½ % of minder, dan zag hij de phagocytose goed optreden.

Hij ging als volgt te werk. Een hoeveelheid van een 1 % natriumcitraatoplossing in physiologisch water werd tot een aangebracht deelstreepje in een capillaire pipet opgezogen. Daarna werd een geringe hoeveelheid lucht ingezogen en

vervolgens een volume bloed, gelijk aan dat van het citraat, voorts weer een luchtbelletje en tenslotte een gelijk volume bacterie-suspensie. Vervolgens werd de inhoud van de capillair op een voorwerpglas uitgeblazen en gemengd, om daarna weer opgezogen te worden. De capillaire buis werd in de vlam dichtgesmolten en gedurende 15 minuten op een temperatuur van 37° gebracht. Hierna opende hij de pipet en maakte van een gedeelte van de inhoud een uitstrijkpraeparaat, dat gefixeerd en gekleurd werd.

Door middel van centrifugeeren was het mogelijk van het in citraat opgevangen bloed de cellen en het plasma te scheiden en hiermede afzonderlijk te experimenteeren. Ook kon op deze wijze serum voor het onderzoek gebruikt worden. Er werd aangetoond, dat de uitkomsten hetzelfde waren, ongeacht of citraatplasma of citraatserum gebruikt werd.

In een volgende serie proeven vergeleek hij de phagocytose van twee mengsels, waarin slechts één der bestanddeelen verschilde. In het ééne werd namelijk versch serum toegevoegd, in het andere verhit serum. Het bleek, dat de phagocytose in het mengsel, waaraan verhit serum was toegevoegd, zeer sterk was gereduceerd. Hieruit werd de conclusie getrokken, dat het serum een belangrijke rol moet spelen bij de phagocytose.

Nu dit aangetoond was, drong zich de vraag op, of de invloed, die het serum heeft, zich op de cellen of op de bacteriën doet gelden, of dat er mogelijk nog een ander aangrijpingspunt bestaat. Om op deze vraag een antwoord te vinden werden de volgende proeven gedaan. Bij geïnactiveerd serum werd een staphylococcensuspensie gevoegd, waarna dit mengsel gedurende 15 minuten op een temperatuur van 37° werd gebracht. Vervolgens werd hetzelfde mengsel wederom gedurende 15 minuten verwarmd, maar nu op een temperatuur van 60°. Dan werden leucocyten toegevoegd en de mate van phagocytose nagegaan (gemiddelde aantal micro-organismen per cel). Een suspensie van dezelfde staphylococcen werd bij hetzelfde serum, maar thans in niet geïnactiveerde toestand, gebracht en wederom gedurende 15

minuten op een temperatuur van 37° verwarmd, en daarna nogmaals 15 minuten op 60 graden. Dan werden weer leucocyten toegevoegd. Het bleek nu, dat de phagocytose in het laatste geval negenmaal zoo groot was als in het eerste. Wright besloot hieruit, dat het serum de bacteriën voorbereidt om gephagocyteerd te kunnen worden.

Het bestanddeel van het serum, dat laatstgenoemde invloed uitoefent, noemde Wright *opsonine*.

Thans bleef nog de vraag open of een versch serum naast de eigenschap bacteriën tot phagocytose te kunnen voorbereiden, ook nog eigenschappen bezit, die de phagocytose direct stimuleeren. Teneinde dit vraagstuk te bestudeeren heeft Wright verschillende proeven genomen doch tot een goede oplossing is hij niet kunnen komen.

Immuniteit door injecties met staphylococcen verkregen, deed de phagocytose aanmerkelijk toenemen. Wright vond verdubbeling van de waarden. In verband hiermede publiceerden Wright en zijn medewerkers in 1904 een aantal waarnemingen, die zij bij een patiënt, lijdende aan acne, hadden gedaan. Het was namelijk gebleken, dat het bloed van deze patiënt geen phagocyteerend vermogen bezat ten opzichte van staphylococcus pyogenes aureus. De acne genazen nadat de patiënt gevaccineerd was met een gedoode staphylococcensuspensie. Gelijktijdig met de genezing bleek het phagocyteerend vermogen van het bloed ten opzichte van staphylococcus pyogenes aureus toe te nemen. Ook bij andere patiënten werden soortgelijke uitkomsten verkregen. Wright meende uit deze waarnemingen de conclusie te kunnen trekken, dat een succesvolle immunisatie tegen staphylococcen, afhankelijk is van vermeerdering der opsoninen in het bloed. Tevens meende hij, dat de phagocytoseproef goede diensten kan bewijzen bij de contrôle van het succes van therapeutische sera.

Het bleek dat de door vaccinatie verkregen immuniteit niet afhankelijk was van eigenschappen der witte bloedlichaampjes, maar van het optreden van opsoninen in het bloed. Hij be-

paalde de mate van phagocytose ten opzichte van staphylococcen in serum en gewasschen cellen van een patiënt en in serum en gewasschen cellen van een gezonde persoon. Vervolgens maakte hij van deze sera en cellen verschillende combinaties, b.v. cellen van de patiënt werden in serum van de normale persoon gesuspendeerd en omgekeerd. De mate, waarin gephagocyteerd werd, was afhankelijk van het gebruikte serum en niet van de gebruikte cellen. In hetzelfde artikel werden wederom een reeks waarnemingen beschreven, waaruit bleek, dat bij verhitting van het serum de phagocytose sterk afneemt.

De vraag, die Wright zich gesteld had, of de sera invloed op de micro-organismen uitoefenen, heeft hij door middel van de genomen proeven bevestigend kunnen beantwoorden.

In 1902 had Savtchenko ook reeds aandacht geschonken aan de vraag, welke invloed het serum op de micro-organismen zou kunnen hebben. Doordat de micro-organismen bij de proeven een uiterst variabele factor vormen, deden zich bij het experimenteeren om uit te maken of het serum zijn invloed op de leucocyten dan wel op de bacteriën uitoefent, moeilijkheden voor, die niet altijd overkomenlijk waren. Om deze te ontwijken heeft hij bij zijn onderzoek de micro-organismen door erythrocyten vervangen.

Savtchenko bracht een leucocytose in de peritoneaalholte van het proefdier te weeg. Bracht hij daarna soortvreemde erythrocyten in, dan trad geen phagocytose op. Spoot hij vervolgens een kleine hoeveelheid serum in van een met dezelfde erythrocyten voorbehandeld proefdier, dan zag hij, dat de erythrocyten door de aanwezige witte cellen werden gephagocyteerd. Spoot hij de erythrocyten en het serum gelijktijdig in, dan werd een gedeelte van de roode cellen gephagocyteerd en een ander gedeelte werd opgelost. Deze uitkomsten waren identiek aan die, welke vroeger door Pfeiffer bij het experimenteeren met choleravibrionen

waren verkregen. Savtchenko meende hiermede aangetoond te hebben, dat de tusschenkomst van een specifieke amboceptor het phenomeen van de phagocytose beheerscht. De vraag op welke der cellen deze amboceptor gefixeerd werd, was hiermede echter niet opgelost.

Bij nader onderzoek bleek evenwel, dat wanneer de erythrocyten eenigen tijd bij een temperatuur van 37° met de amboceptor in aanraking waren geweest, vervolgens gewasschen waren en gesuspendeerd in een neutrale vloeistof, er eveneens phagocytose optrad, als men deze cellen in de buikholte van een proefdier bracht. Ook in vitro kon op deze wijze geëxperimenteerd worden. Wel trad in dit geval telkens agglutinatie van de roode cellen op, doch door minder serum toe te voegen, bleef de agglutinatie achterwege, terwijl toch zeer duidelijk phagocytose plaats vond. De leucocyten waren bij het nemen van deze laatste proeven niet met de amboceptor in aanraking geweest.

Bracht hij nu de leucocyten eenigen tijd met de amboceptor in aanraking en werden daarna gelijksoortige proeven genomen, waarbij zorg gedragen werd, dat de erythrocyten niet met de amboceptor in aanraking kwamen, dan zag Savtchenko eveneens phagocytose optreden, hoewel in veel geringere mate dan in de vorige gevallen. Ook bleek het hem, dat het serum, waarin de leucocyten „gesensibiliseerd" waren, minder haemolytisch ten opzichte van de erythrocyten was geworden. De conclusie, die uit deze proeven werd getrokken, was:

de phagocytose wordt in de eerste plaats teweeg gebracht doordat de in het serum aanwezige amboceptor op de erythrocyten gefixeerd wordt en in de tweede plaats, doordat de amboceptor door het protoplasma van de leucocyten wordt geadsorbeerd.

Veronderstelt men dat, zooals ook uit de feiten bleek, het haemolytische serum zich gelijk gedraagt ten opzichte van erythrocyten als immuunserum ten opzichte van de microorganismen, dan zou men mogen aannemen dat de invloed

van het immuunserum zich op de micro-organismen doet gelden. Langs een geheel andere weg kwam Savtchenko dus tot dezelfde opvatting als Wright.

Zeer belangrijk zijn de onderzoekingen van Neufeld en Rimpau. In de eerste plaats beschreven zij proeven die zij met serum, van met streptococcen geïmmuniseerde konijnen, verrichtten. Dit serum had geen oplossende of doodende invloed op streptococcen. Werden er echter leucocyten in gesuspendeerd, dan zagen zij na verloop van een half uur een uitermate levendige phagocytose optreden. Met normaal serum, dat als contrôle gebruikt werd, vonden zij geen phagocytose van de streptococcen.

Ook zij hebben proeven verricht om uit te maken of het serum de leucocyten of de micro-organismen beïnvloed. Daar bij maakten zij gebruik van de adsorptiemethode volgens Ehrlich—Morgenroth. Zij suspendeerden streptococcen in een immuunserum en plaatsten deze suspensie gedurende twintig minuten bij een temperatuur van 37°. Daarna werd gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof werd verwijderd en de micro-organismen werden in een van te voren gecontroleerd serum gesuspendeerd waaraan leucocyten waren toegevoegd. Het bleek, dat een levendige phagocytose plaats vond. Liet men de leucocyten de behandeling ondergaan, die in bovenstaande proef op de streptococcen is toegepast, dan trad geen phagocytose op.

Wat Savtchenko in zijn proeven met erythrocyten deed, deden Neufeld en Rimpau met micro-organismen. De conclusie, waartoe laatstgenoemden kwamen was, dat het serum een directe werking op de bacteriën uitoefent. Van een stimuleerende werking op de leucocyten zagen zij niets.

Deze oplossing van het probleem is volgens Neufeld en Rimpau volkomen in overeenstemming met de opvattingen van Ehrlich over de immunisatie. Volgens laatstgenoemde kan men, wanneer men een dier immuniseert met bacteriën, als reactieproduct slechts stoffen verwachten, die op deze bacteriën inwerken.

Neufeld en zijn medewerker hebben nog een onderzoek ingesteld of deze substantie met het complement overeenkomt. Veranderden zij de bovenbeschreven proeven in dien zin, dat zij het immuunserum gedurende een half uur bij een temperatuur van 56° inactiveerden en de leucocyten òf in geïnactiveerd normaal serum, òf in physiologische keukenzoutoplossing suspendeerden, dan ging de phagocytose ongehinderd haar gang. Hieruit volgt, meende Neufeld, dat de bacteriën uit het immuunserum geen complement, maar uitsluitend een relatief thermostabiele stof adsorbeeren, die wel als analoog aan de immuunstoffen van Pfeiffer beschouwd kan worden. Deze stof noemden zij *tropine*. Indien voor het sensibiliseeren van de micro-organismen een immuunserum gebruikt werd, trad dus zonder dat complement aanwezig was, phagocytose op.

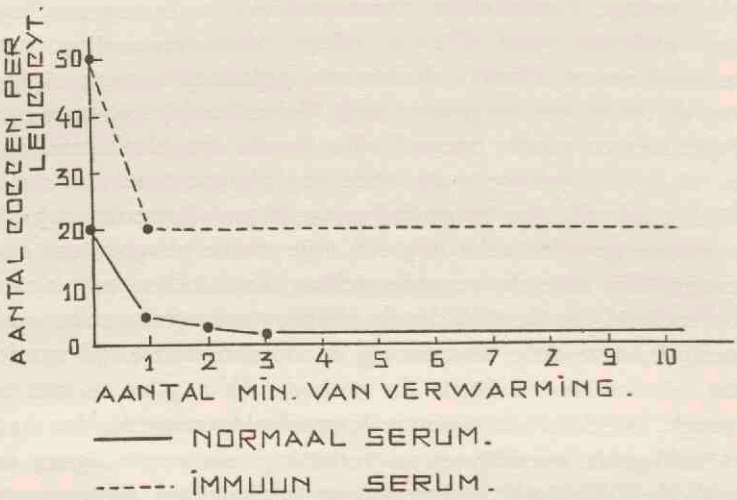
Dat de bacteriën alvorens gephagocyteerd te kunnen worden, gedood moeten zijn, zooals vroeger was beweerd, bleek onjuist te zijn. Indien de streptococcen op voorzichtige wijze gedood werden en daarna in een normaalserum of in een physiologische zout-oplossing gebracht, waarin leucocyten waren gesuspendeerd, dan trad geen phagocytose op. Na toevoegen van immuunserum, was dit wel het geval. Hieruit concludeerden Neufeld en Rimpau, dat één of andere beschadiging van de micro-organismen niet in staat is, om hen voor phagocytose geschikt te maken, maar dat zij hiertoe op een specifieke wijze door binding van immuunlichamen moeten beïnvloed zijn.

In 1905 bevestigden verschillende onderzoekers, zooals Daen, Hektoen en Ruediger, Bulloch en Atkin de resultaten, die Wright met zijn proeven had verkregen. Zij konden bevestigen, dat de opsoninen, die in normaal bloed voorkomen, thermolabiel zijn en dat zij de micro-organismen en niet de leucocyten beïnvloeden. Ook vonden zij bij aanwezigheid van een immuunserum sterker phagocytose, dan bij aanwezigheid van een normaal serum.

Daen, Bulloch en Atkin bevestigden eveneens de meening van Neufeld en Rimpau, dat de stoffen in een immuunserum, die de micro-organismen voor de phagocytose voorbereiden, thermostabiel zijn. In tegenstelling met anderen vond Daen echter, dat verwarming van normaal serum dikwijls slechts een gedeeltelijke vernietiging van de opsoninen tengevolge had. Gebruikte hij b.v. voor zijn experimenten groote hoeveelheden serum, dan bleek hem, dat er, zij het in geringe mate, toch nog phagocytose voorkomt. Bij het gebruik van verwarmd normaal paardenserum zag hij in enkele gevallen zelfs nog een vrije sterke phagocytose optreden. Hij uitte de veronderstelling, dat, indien een kleine hoeveelheid van de stof, die de phagocytose veroorzaakt, aanwezig is, deze door verwarming in zooverre vernietigd wordt, dat zij niet meer volgens de methode Wright is aan te toonen. Is echter een grootere hoeveelheid aanwezig, dan kan er voldoende overblijven na verhitting, om nog volgens de methode Wright aantoonbare phagocytose teweeg te brengen. Hij achtte laatstgenoemde methode dan ook niet zeer gevoelig, vooral in verband met de geringe tijd, die men den opsoninen geeft om hun activiteit te ontwikkelen en maakte een vergelijking met het tot stand komen van de agglutinatie, wat ook langeren tijd vereischt.

Voorts toonde Daen aan dat, ook indien immuunserum verhit werd op een temperatuur van 60°, er na de eerste twee minuten een daling van het aantal gephagocyteerde micro-organismen was waar te nemen.

De curve, waarmede de uitkomsten van dit onderzoek werden weergegeven, zag er als volgt uit:



Hij achtte het moeilijk om vast te stellen, of het complement bij de phagocytose een rol speelt. De sterke daling van de „opsonische kracht" van de sera, indien zij verwarmd worden, zooals deze in bovenstaande curve tot uiting komt, doet echter wel degelijk de vraag rijzen of zij niet van de vernietiging van het complement afhankelijk gesteld moet worden.

De mogelijkheid, dat verwarming van serum het ontstaan van voor de phagocytose schadelijke stoffen tengevolge zou hebben, is door Bulloch en Atkin onder het oog gezien. Zij kwamen tot de conclusie, dat dit niet het geval zou zijn.

In 1906 deelden Wright en Reid een andere methode mede om de mate, waarin de phagocytose heeft plaats gevonden, uit te drukken. Zij bepaalden het gemiddelde aantal micro-organismen, dat per leucocyt gephagocyteerd werd, indien zij gebruik maakten van een z.g. „pooled serum". Dit

pooled serum bestond uit een mengsel van eenige normale sera. De hiermede verkregen uitkomsten stelden zij als norm. Nu werden de proeven met het te onderzoeken serum gedaan en het gemiddelde aantal per leucocyt gephagocyteerde bacteriën berekend. De verkregen uitkomst hiervan werd gedeeld door die, welke met het pooled serum was gevonden. Was de eerstgenoemde b.v. tweemaal zoo groot dan was de „opsonische index" van het onderzochte serum 2.

Met deze methode hebben zij een onderzoek ingesteld naar de phagocytose van tuberkelbacillen in het bloed van lijders aan tuberculose. Het bleek hun, dat de index varieerde. In de loop van een paar maanden werden bij eenzelfde lijder uitkomsten van 0.98 en 1.73 verkregen. Deze schommelingen meenden zij aan veranderingen in de algemeene toestand, waarin de patiënt zich bevond, te moeten toeschrijven. Bij gezonde personen werd de opsonische index voor tuberkelbacillen constant gevonden.

Uit deze en andere onderzoekingen werd geconcludeerd dat, indien men bij een patiënt duidelijke variaties in de opsonische index vindt, men daaruit de aanwezigheid van een actief tuberculeus proces zou kunnen afleiden. Vindt men daarentegen de opsonische index constant, dan zou de diagnose tuberculose met eenige waarschijnlijkheid uitgesloten kunnen worden. Hoewel deze uitspraak voor de diagnostiek van de tuberculose van zeer groot belang is, wordt de methode, voorzoover ons bekend, niet toegepast. Het is de vraag welke waarde er aan gehecht mag worden.

Deden zij een onderzoek met verwarmde sera van gezonden en tuberculose-lijders, dan vonden zij in het verwarmde serum van de gezonde menschen practisch geen phagocytose meer. Bij aanwezigheid van verwarmd serum van tuberculoselijders werd wel phagocytose gezien, hoewel in mindere mate dan wanneer het serum in onverwarmde toestand gebruikt werd.

In een ander artikel wezen Wright en Reid erop, dat bij het bepalen van de opsonische index fouten gemaakt

kunnen worden door het serum niet gedurende gelijke tijden en niet op gelijke temperatuur te verwarmen. Zij rieden derhalve aan er goed op te letten deze factoren bij het nemen van proeven zooveel mogelijk gelijk te maken.

Ook zij vonden, dat het element in het immuunserum, dat de phagocytose veroorzaakte, door hen „the incitor element" genoemd, volkomen uit het serum verwijderd kon worden door dit gedurende een half uur bij een temperatuur van 37° met een voldoende hoeveelheid tuberkelbacillen in aanraking te brengen. Hieruit concludeeren zij, dat het incitor element een opsonine is en zij spraken de meening uit, dat er, behalve het verschil in thermostabiliteit tusschen de opsoninen, die in een immuunserum en die, welke in een normaalserum voorkomen, geen verschil bestaat.

Bulloch en Western deden in 1906 proeven om de specificiteit van de opsoninen in immuunsera na te gaan. Langs twee wegen gelukte het hen deze aan te toonen. Allereerst deden zij proeven bij lupuslijders. Zij spoten deze patiënten in met tuberculine of met een staphylococcenvaccin. De tuberculine-injecties deden de opsonische activiteit ten opzichte van tuberkelbacillen toenemen, terwijl deze ten opzichte van staphylococcen onveranderd bleef. Bij de menschen, die met staphylococcen geïmmuniseerd waren, bleek juist de opsonische activiteit van het serum ten opzichte van de staphylococcen toegenomen te zijn, terwijl deze voor tuberkelbacillen gelijk was gebleven.

Voorts bleek bij adsorbtie-proeven, dat uit serum van een persoon die met staphylococcen was geïmmuniseerd, de opsoninen t.o.z. van deze micro-organismen, niet door een suspensie van tuberkelbacillen konden worden verwijderd, maar wel door een staphylococcen-suspensie.

Muir en Martin verkregen met adsorbtie-proeven gelijkwaardige resultaten.

In 1907 heeft Daen aangetoond dat de dikte van de suspensie, die men bij het nemen van de proeven gebruikt,

van belang is. Hij vond bij een geringe dichtheid van de suspensie een geringere phagocytose dan wanneer hij de suspensies dikker maakte. Ook de invloed van verdunning van het serum heeft hij nagegaan. Hij vond, dat een verdunning van 1 op 8 weinig of geen invloed had. Bij voortzetting van de verdunning zag hij het aantal gephagocyteerde microorganismen verminderen.

In 1908 heeft Mac Leod Veitch een nieuwe methode beschreven om de phagocytose in het bloed te bepalen. In wezen verschilt deze methode echter niet van die welke door Wright uitgewerkt was. Hij deed proeven met citraatbloed, dat op verschillende tijden, nadat het van het individu afgenomen was, werd verwerkt.

Uit de medegedeelde getallen is te zien, dat de phagocytose één uur nadat het serum afgenomen was, reeds aanmerkelijk was verminderd, n.l. met ± 40 %. Hier staan de mededeelingen van Wright tegenover, die na de eerste twee uren geen vermindering van beteekenis vond. Pas na 5 dagen was de werking van een serum tot op de helft verminderd.

Wel bleek het, dat de index onveranderd bleef wanneer het te onderzoeken- en het contrôleserum steeds eenzelfde tijd nadat het bloed was afgenomen, werden onderzocht.

Bij een aantal lijders aan infectieziekten heeft Mc Leod Veitch de phagocytose onderzocht. Gedeeltelijk in overeenstemming met Wright vond hij bij lijders aan tuberculose in den regel een lage index. Het bestaan van leucocytose in het onderzochte bloed bleek hem niet van beteekenis te zijn. Een constante verhouding tusschen het aantal leucocyten en de gevonden phagocytaire index was niet aan te toonen.

In hetzelfde jaar gaf Sleeswijk, in zijn proefschrift, een uitvoerig overzicht van de bestaande litteratuur. Bij zijn onderzoek maakte hij gebruik van de techniek van Wright, waarin een kleine modificatie werd aangebracht. Nadat bloed, citraat en suspensie gemengd waren, bracht hij dit mengsel niet meer in een capillair terug, maar gebruikte een uitgehold

voorwerpglas, waaroverheen een dekglas werd gelegd, terwijl de holte met paraffine, luchtdicht werd afgesloten. In deze ruimte liet hij de phagocytose plaats vinden. Volgens Sleeswijk is het overbodig het mengsel, waarmee de proef gedaan wordt, op 37° te verwarmen. Het bleek hem, dat zoowel de phagocytose als de fixatie van de opsoninen op de microben bij kamertemperatuur even goed tot stand komen als bij broedstooftemperatuur. Zelfs de snelheid, waarmee de reactie's tot stand kwamen, scheen in beide gevallen nauwelijks te verschillen. Wel beval hij aan om, indien men vergelijkende bepalingen doet, ervoor zorg te dragen, de uitwendige omstandigheden, zooals de duur van het contact en de temperatuur, waarbij het proces plaats vindt, zooveel mogelijk gelijk te maken.

In tegenstelling met hetgeen door de meeste onderzoekers gevonden werd, schreven Wigodtchikoff en Mme Manouillova in 1930, dat het hun gebleken is, dat de phagocyten van geïmmuniseerde dieren de aanwezigheid van een immuunserum niet noodig hadden om te kunnen phagocyteeren. Hun proeven zijn onvolledig beschreven, zoodat het moeilijk is deze op juiste waarde te schatten. In een tweede publicatie deelden dezelfde schrijvers zelfs mede, dat de phagocyten van een geïmmuniseerd dier niet alleen de microorganismen, waartegen zij geïmmuniseerd zijn, in sterker mate phagocyteeren dan die van niet geïmmuniseerde dieren, maar ook andere bacteriesoorten.

In 1934 deden Robertson en Sia onderzoekingen omtrent de rol, welke de phagocytose vervult bij de destructie van pneumococcen, in het bloed. Zij maakten gebruik van mengsels van serum, pneumococcen en leucocyten. De methode, die zij gebruikten, was een geheel nieuwe. Zij trachtten zooveel mogelijk de natuurlijke omstandigheden na te bootsen. De te onderzoeken sera en leucocyten werden tezamen met een bacteriesuspensie in buisjes gedaan, die

steriel afgesloten werden. Deze buisjes werden in een door hen geconstrueerd toestel in een constante beweging gehouden. De hoeveelheid coccen, die zij toevoegden, was tevoren bepaald. Door middel van uitzaaien op voedingsbodems uit de proefbuisjes, werd vastgesteld hoeveel levende micro-organismen er nog over waren, waarna kon worden berekend, hoeveel er door het mengsel gedood waren. Zij vonden dat de groei van pneumococcen, die een geringe virulentie hadden voor katten, duidelijk werd geremd door serum en leucocyten dezer dieren. Wanneer groote hoeveelheden pneumococcen werden toegevoegd bleek er in vele gevallen na 24 uur geen groei meer te bestaan. Serum en leucocytenmengsels van dieren, die gevoelig waren voor pneumococcen, bleken niet in staat te zijn deze te dooden. Uit proeven met sera, waar geen leucocyten aan toegevoegd waren en sera, waar wel leucocyten in waren gesuspendeerd, bleek hun vervolgens, dat een deel der vernietiging van de pneumococcen op rekening der leucocyten gebracht moest worden. Met de gebruikte techniek was niet uit te maken, of de pneumococcen in de leucocyten ingesloten werden. In hoeverre de invloed van de leucocyten aan phagocytose moet worden toegeschreven is in deze gevallen dus niet bekend. Dat het serum een rol speelde bleek uit de waarneming, dat een mengsel van geïnactiveerd serum en leucocyten een aantal pneumococcen in leven liet, wat niet het geval was, indien men versch serum gebruikte.

In de voorafgaande bladzijden zijn enkele der belangrijkste onderzoekingen en heerschende opvattingen over de voorwaarden waarbij phagocytose tot stand kan komen, naar voren gebracht. Dat het proces wordt beheerscht door een in het serum voorkomende substantie, door Wright opsonine genoemd, is wel gebleken. Deze opsoninen komen in elk serum voor. Men is het er over eens, dat de opsoninen, in normale sera, thermolabiel zijn en niet specifiek.

In immuunsera worden daarentegen opsoninen aangetroffen, die relatief thermostabiel zijn, en die specifieke eigenschappen bezitten. Door Neufeld en Rimpau werden zij tropinen genoemd.

In het algemeen is men het er over eens, dat de rol, die de leucocyten in het proces spelen, secundair aan die van het serum moet worden geacht.

Genoemde feiten zijn bij ons eigen onderzoek eenige malen als uitgangspunt genomen.

Alvorens echter tot de mededeeling hiervan over te gaan, zijn er nog enkele vraagstukken die wij naar voren zouden willen brengen, omdat zij eenigermate met ons onderzoek in verband staan. Het leek het meest doelmatig daartoe de opvattingen van enkele toonaangevende schrijvers in het kort te vermelden.

Complement en opsoninen.

Zooals reeds is medegedeeld hebben verschillende onderzoekers zich met de vraag beziggehouden, welke relatie er bestaat tusschen complement en opsoninen. Het was opgevallen, dat de temperatuur waarop een serum verwarmd moest worden, teneinde de opsoninen te vernietigen, dezelfde was, als die, waarbij het complement ten gronde gaat. Een reeks onderzoekingen is verricht om dit vraagstuk op te lossen.

Löhlein sprak naar aanleiding van zijn waarnemingen de meening uit, dat de opsoninen noch met normale amboceptoren, noch met bacteriolysinen, complement of agglutininen identiek konden zijn.

Levaditi en Inmann vonden dat, indien microorganismen, in casu bac. dysenteriae en staph. aureus, gedurende eenigen tijd in een serum gesuspendeerd waren geweest, niet alleen de opsoninen voor genoemde bacteriën uit het serum verdwenen waren, maar ook die voor alle andere micro-organismen. Eveneens bleek hen, dat orgaanemulsies de opsoninen konden adsorbeeren. Beide auteurs wezen erop dat ook het complement door de juist genoemde behandelingen uit een serum verwijderd wordt.

Ook Muir en Martin vonden dat er geen opsoninen meer in een serum aan te toonen waren, als dit met complementbindende stoffen was behandeld.

Levaditi en Koessler zagen, dat een serum, dat anticomplement bevatte, niet alleen het complement van een ander serum onwerkzaam maakte, doch ook de opsoninen. Daen kon deze proeven bevestigen.

Levaditi en Inmann beschreven proeven die met vocht uit de voorste oogkamer en uit door afsnoering opgetreden oedeem van een proefdier werden verricht. Als regel werd in deze vloeistoffen geen complement aangetroffen en evenmin gelukte het hierin opsoninen aan te toonen. Wanneer echter door omstandigheden (tweede punctie van de voorste oogkamer of uittreden van bloed in het artificieele oedeem) wel complement werd gevonden dan gelukte het hen ook opsoninen aan te toonen.

Levaditi en zijn medewerkers kwamen tot de conclusie, dat op grond van hun waarnemingen aangenomen mocht worden, dat het normale opsonine identiek is met het complement.

Het is de vraag of deze conclusie geheel verantwoord is. Uit de onderzoekingen blijkt, dat daar, waar geen complement aanwezig is, geen opsoninen kunnen worden aangetoond. Hieruit mag echter nog niet de gevolgtrekking worden gemaakt dat complement en opsoninen dezelfde stof zijn. De mogelijkheid blijft open, dat er naast het complement een andere stof, het opsonine, bestaat. Neemt men dit aan dan moet verondersteld worden, dat de opsoninen complement noodig hebben om hun werking te kunnen ontplooien. Ook zou het nog een stof kunnen zijn, die vele eigenschappen met het complement gemeen heeft. Welk standpunt men echter in dit opzicht inneemt, is voor het door ons verrichte onderzoek niet van practisch belang.

Tropinen.

Zooals reeds eerder vermeld, vond Savtchenko in 1902 dat bij aanwezigheid van haemolytische sera de erythrocyten òf gehaemolyseerd òf gephagocyteerd werden. Hij schreef het optreden van deze phagocytose toe aan het voorkomen van de haemolytische amboceptor in het serum.

Ook Daen nam aan, dat de thermostabiele substantie in een immuunserum die de phagocytose bevordert, identiek moest zijn aan de fixateur of substance sensibilisatrice van de Fransche schrijvers.

Neufeld en Hühne ontkenden bovengenoemde identiteit. Zij waren van meening, dat de tropinen als een zelfstandige immuunstof van het serum moesten worden gekwalificeerd.

Muir en Martin noemden de tropine een echte immuunstof. Volgens hun meening was het niet uit te maken of overeenkomst met een agglutinine of een amboceptor bestaat. Zekere feiten pleiten volgens hen wel voor het eerste.

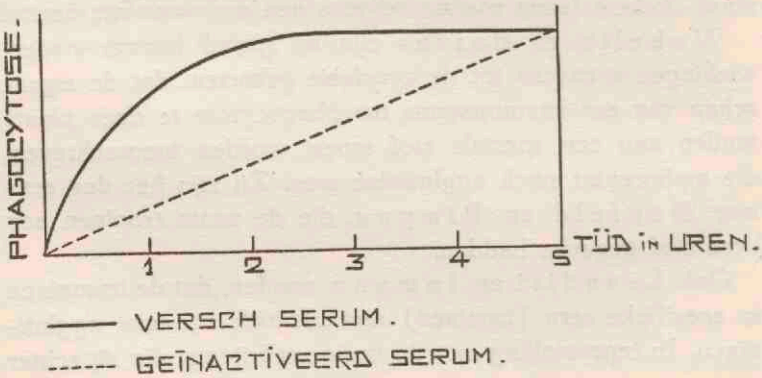
Wakelin en Barrat zijn op grond hunner onderzoekingen eveneens tot de conclusie gekomen, dat de eigenschap van een immuunserum om phagocytose te doen plaats vinden aan een speciale stof moest worden toegeschreven, die amboceptor noch agglutinine was. Zij zijn het dus eens met Neufeld en Rimpau, die de naam tropinen aan deze stof gegeven hadden.

Ook Levaditi en Inmann vonden, dat de opsoninen in specifieke sera (tropinen) niet identiek zijn met agglutininen. In tegenstelling met de vorige schrijvers zijn zij echter

wel van meening, dat de eigenschappen van de opsoninen die der amboceptoren benadert.

Dat ook thans de opvattingen omtrent de aard der tropinen en de wijze waarop zij reageeren nog niet geheel vaststaat, wordt wel weergegeven door hetgeen Topley en Wilson nog in 1936 in hun handboek schrijven. Zij zeggen n.l. „The mode of action is clearly analogous to that of the precipitins, agglutinins and lysins".

Het valt op, dat alle onderzoekers vermelden, dat de tropinen zonder de aanwezigheid van complement hun werking kunnen ontplooien. Dit is echter een eigenschap, die niet past in de definitie van amboceptor. Wel zou uit het werk van verschillende schrijvers mogen worden afgeleid, dat het complement in staat is de activiteit van de tropinen te vergrooten. Ward en Enders toonden in 1933 aan, dat bij aanwezigheid van een geïnactiveerd immuunserum de phagocytose langzamer plaats vond, dan wanneer complement aanwezig was. Zij vonden, dat het complement het proces versnelde. Het eindresultaat bleek hun echter in beide gevallen hetzelfde te zijn. De mate van phagocytose werd door tusschenkomst van het complement dus niet vergroot, doch slechts vond een versnelling van het proces plaats. Zij gaven dit weer in onderstaande grafiek:



Deze waarnemingen schijnen niet geheel in overeenstemming te zijn met die van Daen (blz. 13).

De beide proefreeksen zijn echter moeilijk met elkaar te vergelijken.

Invloed van zoutoplossingen.

Het is bekend dat zouten het tot stand komen van de phagocytose beïnvloeden. Allereerst blijkt dit uit het optreden van de z.g. spontane phagocytose. Hiermede wordt bedoeld de phagocytose die onder bepaalde omstandigheden zonder de aanwezigheid van een serum tot stand kan komen.

O.a. toonde Wright aan, dat, wanneer bij een suspensie van tuberkelbacillen en leucocyten in gedestilleerd water een gelijk volume van een 0.6 % NaCl oplossing werd gevoegd, er phagocytose optrad. Maakte hij de concentratie van het keukenzout grooter of kleiner dan was dit van invloed op het proces, in dien zin, dat dit minder intensief verliep.

Löhlein beschreef het optreden van phagocytose in een physiologische zoutoplossing. Indien het proces voldoende tijd gegeven werd om tot stand te komen, dan was de phagocytose in de physiologische NaCl-oplossing ook in vergelijking met die welke in het serum optrad, van beteekenis.

Daen daarentegen vond dat de phagocytose in keukenzoutoplossingen slechts gering was, vergeleken met die bij aanwezigheid van serum.

Belangrijk is de invloed van zoutoplossingen op de phagocytose die in een serum tot stand komt. Wright deelde mede, zooals we reeds zagen, dat, wanneer de concentratie van natriumcitraat in bloed 3 % bedraagt, er geen phagocytose optrad. Bij een concentratie van 1½ % kon hij daarentegen geen merkbare remming van het proces vaststellen.

Verdunde hij een serum met een 0.6 % NaCl oplossing (tot 64 maal) dan bleek de phagocytose hierin toe te nemen, terwijl deze verminderde wanneer voor de verdunning een 1.3 % oplossing gebruikt werd.

Hektoen en Ruediger e.a. konden vaststellen dat het van invloed is van welk zout men een oplossing aan het serum toevoegt. In den regel is de invloed van remmenden aard.

Porges deed om de phagocytose eenigszins te remmen een 2 % NaCl oplossing bij de sera waarmee hij experimenteerde.

Broom en Brown wezen op de remmende werking die ferrocyanide op het proces had. Hoe hooger de concentratie van dit zout, des te geringer werd de phagocytose.

Hamburger beschreef de vermindering van de phagocytose, wanneer hij de osmotische druk van een serum veranderde door toevoeging van gedestilleerd water of keukenzout. Ook de H en OH-ionen zijn van beteekenis voor het proces. Zoo vond Hamburger dat toename of afname van het alkaligehalte van het serum een verminderde phagocytose tengevolge had. Het eenige zout, dat in zekere concentratie aan het serum toegevoegd, een vermeerdering van de phagocytose tengevolge had, zou het $CaCl_2$ zijn.

Bij de opname van microörganismen en koolpartikeltjes door leucocyten spelen, naar men algemeen aanneemt, oppervlaktespanning, osmotische druk e.d. een groote rol. De invloed, die zouten op het tot stand komen van de phagocytose hebben, wordt nu door velen aan veranderingen dezer omstandigheden toegeschreven (Hamburger, Broom en Brown).

Algemeen wordt dus aangenomen, dat zouten het tot stand komen van de phagocytose beïnvloeden. Welk zout en in welke concentratie dit wordt toegevoegd is van belang. Bij het onderzoek van de phagocytose in bloed, is het noodzakelijk stolling te voorkomen, wat in den regel bereikt wordt door toevoeging van een zoutoplossing. Uit het voorgaande is duidelijk geworden dat bij het experimenteeren terdege rekening moet worden gehouden met de invloed die deze zoutoplossing op het proces kan hebben.

Dean merkte in 1907 op dat bij gebruik van suspensies

van oude laboratoriumculturen voor phagocytosereactie's vaak een sterkere phagocytose optrad, dan wanneer juist geïsoleerde stammen hiervoor waren gebruikt. Hij meende dit verschijnsel van de geringere virulentie der oude culturen afhankelijk te moeten stellen. Soortgelijke waarnemingen werden door Levaditi en Inmann gedaan. Ook zij meenden het verschil in virulentie als oorzaak te moeten aannemen.

Bail en Rubritius zagen dat typhusbacillen die zij direct uit het bloed van een geïnfecteerd dier hadden gekweekt, meer weerstand tegen een immuun-serum bezaten dan oude laboratoriumculturen. Hierbij viel hun echter op, dat ook typhusbacillen die langen tijd in een dierlijk organisme hadden doorgebracht, zoowel in vitro als intraperitoneaal, nog goed gephagocyteerd werden. Zij deelden niet mede of zij in dezelfde mate werden gephagocyteerd als die van een oude cultuur.

Uit het voorgaande mag wel besloten worden dat men er bij het nemen van proeven op bedacht moet zijn dat een verandering in virulentie der gebruikte culturen van invloed kan zijn op de uitkomsten der proeven.

In het algemeen wordt aangenomen dat de cellen van het reticulo-endotheliale systeem het vermogen bezitten te kunnen phagocyteeren (zie o.a. Snapper).

Lubarsch schreef dat er geen cellen zouden bestaan, die niet onder bepaalde omstandigheden als phagocyt kunnen optreden. Als voorwaarde stelt hij hierbij dat de cellen zich tot op zekere hoogte uit het celverband moeten kunnen losmaken. De in het bloed circuleerende cellen noemde hij dan ook phagocyten bij uitnemendheid.

Von Kresz meende dat alleen de leucocyten zoo genoemd mochten worden omdat eosinophile cellen en lymphocyten practisch niet zouden phagocyteeren. Bij onderzoek van bloed van een leucaemiepatiënt zag hij in de myeloblasten en myelocyten geen phagocytose optreden.

De Langen en Lichtenstein deelden mede dat de rol die leucocyten bij malariainfecties spelen, grooter is dan men gewoonlijk aanneemt. Vooral de staafkernige leucocyten vertoonen in het bloed van malariapatiënten een belangrijke mate van phagocytose.

Leitner en Gugelot hebben een onderzoek ingesteld naar het phagocyteerend vermogen van de cellen in het beenmerg. Zij zagen dat de rijpere cellen zeer duidelijk phagocyteerden, terwijl de jongere vormen, zooals de metamyelocyten en de myelocyten, aan dit proces vrijwel geen deel namen.

Phagocytose bij Brucella-infecties.

Sinds 1933 zijn verschillende publicaties van Huddleson verschenen over phagocytose bij brucella-infecties en in 1934 schreef hij een monographie waarin de verschillende serologische methoden om Banginfecties aan te toonen werden beschreven. Een door hem uitgewerkte methode om de „opsono-cytophagic power" van het bloed te bepalen is hierin vermeld. Het is de eenigszins gemodificeerde methode van Leishman-Veitch.

Een hoeveelheid citraatbloed wordt met een gelijk volume van een bacteriesuspensie in physiologische keukenzoutoplossing gemengd en gedurende een half uur op een temperatuur van 37° verwarmd. Dan wordt een uitstrijkpraeparaat gemaakt dat, na gekleurd te zijn, microscopisch wordt bekeken.

De uitvoering geschiedt aldus: 5 cm^3 bloed worden steriel opgevangen in 0.2 cm^3 van een 20 % natriumcitraatoplossing in physiologisch keukenzout. De eindconcentratie van het natriumcitraat moet 0.8 % bedragen. Er wordt een suspensie van Brucella gemaakt, in physiologische zoutoplossing, waarvan de Ph 7 moet zijn. Elk der drie Brucellatypen kan voor de bereiding van de suspensie worden gebruikt. De virulentie der bacillen is niet van beteekenis. De dichtheid van de suspensie met het apparaat van Gates gemeten moet 2 mm

bedragen. In latere publicaties wordt 6 mm. opgegeven. In kleine buisjes wordt 0.1 cc dezer suspensie met 0.1 cc citraatbloed gemengd en vervolgens worden zij gedurende een half uur in een broedstoof van 37° gezet, daarna wordt de inhoud van de buisjes door schudden goed gemengd en een uitstrijkpraeparaat gemaakt dat met Hastings-kleurstof behandeld wordt. In het praeparaat worden 25 cellen bekeken en er wordt geteld hoeveel bacillen er in ieder dezer 25 cellen aanwezig zijn.

Het bloed dient men zoo spoedig mogelijk te verwerken aangezien de leucocyten snel degenereeren als ze bij kamertemperatuur worden bewaard. De suspensie wordt vervaardigd van een cultuur die ongeveer 48 uur op vleeschagar gegroeid is. Geregelde contrôle dezer culturen is noodig omdat zij na herhaald overgeënt te zijn, ongeschikt kunnen worden om er de phagocytosereactie mee te doen. Het is gewenscht het uitstrijkpraeparaat snel te drogen, hetgeen b.v. met een fan kan gebeuren.

Na vele praeparaten bestudeerd te hebben heeft Huddleson een systeem opgesteld om de phagocytose der afzonderlijke leucocyten te classificeeren.

Indien geen enkel micro-organisme gephagocyteerd is, wordt de reactie van de cel negatief genoemd. Worden er 1 tot 20 micro-organismen in een leucocyt gevonden dan noemt hij de phagocytose „slight". Zijn er 21 tot 40 bacillen gephagocyteerd dan noemt hij deze „moderate" en is het aantal grooter dan 40 „marked".

Naast de phagocytosereactie verrichtte Huddleson altijd de huidreactie en in vele gevallen ook de agglutinatiereactie. Op grond van zijn uitgebreid onderzoek heeft hij een schema opgesteld volgens hetwelk de uitkomsten dezer reacties geïnterpreteerd kunnen worden. Het schema ziet er als volgt uit:

Agglutination test.	Allergic skin test.	Opsono-cytophagic power of blood.	Status toward brucella.
—	—	Zero to 20 per cent of cells, slight	Susceptible
—	+	Zero to 40 per cent of cells, marked	Infected
+	+	Zero to 40 per cent of cells, marked	Infected
—	+	60 to 100 per cent of cells, marked	Immune
+	+	60 to 100 per cent of cells, marked	Immune

Hij voegt hieraan toe dat een „marked" phagocytose in combinatie met een negatieve huidreactie slechts driemaal gevonden werd. Een geval waarin de agglutinatiereactie positief was, terwijl de huid- en phagocytosereactie negatief uitvielen werd door hem niet gevonden.

De techniek van de phagocytosereactie is eenvoudig, waardoor deze zich uitstekend voor routineonderzoek leent. *Het essentieele van de techniek zou zijn, dat niet de phagocytose die optreedt door de in elk bloed voorkomende opsoninen wordt aangetoond, maar slechts die, welke door middel van de specifieke opsoninen of tropinen tot stand komt.* Dit wordt bereikt door het toevoegen van het natriumcitraat in bepaalde concentratie, n.l. van 0.8 %. De niet specifieke phagocytose wordt dan geremd terwijl de specifieke wel plaats kan vinden.

Bekijkt men de wijze van interpretatie zooals Huddleson deze geeft, dan blijkt dat, volgens deze, de uitkomst van de phagocytosereactie tot het trekken van belangrijke conclusies aanleiding kan geven. Alvin E. Keller en medewerkers hebben het onderzoek van Huddleson op dit gebied nagewerkt. Zij hielden zich aan de gegeven interpretaties; met het trekken van conclusies gingen zij verder. Zij schrijven n.l. „If marked phagocytic activity and a positive skintest are demonstrated in a patient with fever it is likely that the fever is due to some disease, other than undulant fever. This test therefore may be used as a valuable aid in differential diagnosis".

Volgens deze uitspraak zou de phagocytosereactie den klinicus dus in sommige gevallen uit moeilijkheden op diagnostisch gebied kunnen helpen. Een ongeveer gelijke uitspraak deed Huddleson in 1938 naar aanleiding van een onderzoek dat hij bij een groep personen had verricht, die uit hoofde van hun beroep, in nauw contact met geïnfecteerde dieren kwamen. In 15 % van de gevallen vond hij een positieve agglutinatie- en huidreactie. In geval van ziekte, zegt Huddleson nu, zal men de diagnose febris undulans niet mogen stellen, alvorens door middel van de phagocytosereactie is uitgemaakt of men met acute infectie of met immuniteit te doen heeft.

Miss A. Evans en medewerkers kwamen evenwel na een onderzoek tot de conclusie, dat de phagocytosereactie bij Banginfecties als de minst betrouwbare van de serologische proeven moet worden beschouwd. Ook met de door Huddleson voorgestelde interpretatie van de phagocytosereactie konden zij zich niet vereenigen. Zij vonden sterke phagocytose bij Bangpatiënten. Hieraan kan echter onmiddellijk toegevoegd worden dat Huddleson in 1938 zelf opmerkte, dat bloed van patiënten, die aan febris undulans lijden, dikwijls een even hooge opsonische activiteit bezit als dat van individuen die immuun zijn. Daarom is het niet zeker dat groote opsonische activiteit altijd immuniteit beteekent.

Meyer en Geiger staan ook eenigszins critisch tegenover de beteekenis die Huddleson aan de phagocytose reactie toekent. Zij meenen dat de phagocytaire activiteit van een individu aan verandering onderhevig kan zijn, zoodat een enkelvoudig onderzoek geen juist inzicht in de toestand zal geven.

In een onlangs uitgekomen Amerikaansch textbook of clinical pathologie was naast de gebruikelijke chemische, bacteriologische en serologische methoden van onderzoek, die in de kliniek gebezigd worden, ook de methode van Huddleson en diens interpretatie hiervan opgenomen. Dit wijst erop dat deze reactie in Amerika wel van belang wordt geacht.

Agglutinatie- en Complementbindingsreactie.

Waar, naast de phagocytosereactie, de agglutinatie- en de complementbindingsreactie met de verschillende sera is gedaan, willen wij enkele opmerkingen omtrent de beteekenis dezer reacties bij Banginfecties maken.

De meest gebruikte serologische onderzoekingsmethode om Banginfecties vast te stellen is de agglutinatiereactie. Wright is de eerste geweest die haar in gevallen van Maltakoorts heeft toegepast. Omtrent het tijdstip waarop de agglutininen in het serum van lijders aan febris undulans kunnen worden aangetoond, is niet veel bekend. Dit zegt ook Löffler in zijn monographie over genoemde ziekte. Spengler meent dat de reactie meestal aan het einde van de eerste ziekteweek positief wordt, dikwijls echter eerst later.

Persoonlijke ervaring hieromtrent ontbreekt ons. De lijders aan febris undulans die wij gezien hebben, waren op het moment dat ze in de kliniek kwamen, altijd al eenige weken ziek en hadden reeds positieve reacties.

De beoordeeling van de agglutinatiereactie door de verschillende onderzoekers is niet altijd hetzelfde. Vooral bestaat verschil in opvatting in welke verdunning een positieve reactie als bewijs dat infectie heeft plaats gehad, moet worden beschouwd. Het meest wordt als ondergrens een serumverdunning van 1 : 80 of 1 : 100 aangenomen. Zoowel Alice Evans als Dalrymple geven een titer van 1 : 80 op. Löffler, Berenz en Kristensen leggen de grens bij een titer van 1 : 100. Jordan en Mc Broom vinden een positieve agglutinatiereactie in een serumverdun-

ning van 1 : 100 een bewijs dat infectie heeft plaats gehad. Is de reactie tot een verdunning van 1 : 40 positief dan hechten zij hieraan geen waarde.

Smillie en medewerkers komen naar aanleiding van een dierexperiment tot de conclusie dat een positieve reactie met een titer van 1 : 40 niet als aanduiding beschouwd mocht worden, dat een dier geïnfecteerd is. Zij voegen hieraan toe dat oude of zeer recente infecties hierdoor niet uitgesloten worden.

Topley en Wilson schrijven dat een agglutinatietiter van 1 : 25 in een streek waar de Brucella-infectie veel voorkomt, niet verwaarloosd mag worden.

Leest men de mededeeling van Fitch en medewerkers dan wordt de uiteenloopende beoordeeling van de agglutinatiereactie begrijpelijk. Zij hebben uitgebreide onderzoekingen gedaan in welke mate allerlei factoren de reactie kunnen beïnvloeden, zooals de Ph van het milieu, de dichtheid van de suspensie, de cultuur van welke deze gemaakt is, enz. Er mag wel aangenomen worden dat één of meer dezer factoren in de verschillende laboratoria niet geheel hetzelfde zullen zijn. Dit nu kan zijn invloed op de uitkomsten doen gelden. Duidelijk wordt dit geïllustreerd met de uitkomsten die in 10 verschillende laboratoria, bij onderzoek van eenzelfde serum, door Fitch opgezonden, werden verkregen. De agglutinatietiter varieerde in de diverse laboratoria van 1 : 160 tot 1 : 1000.

Ook is van beteekenis in welke mate de agglutinatie in een bepaalde verdunning optreedt. Al of niet volledige opklaring van de bovenstaande vloeistof dient vermeld te worden. In de meeste publicaties wordt dit echter niet gedaan. Zeker zullen ook persoonlijke inzichten een rol spelen bij het beoordeelen van de reacties en zelfs kunnen de omstandigheden waaronder eenzelfde persoon een reactie moet beoordeelen van invloed zijn. Een agglutinatiereactie in een verdunning van 1 : 50 zal men positief kunnen noemen indien men een statistisch onderzoek verricht. Vindt men deze uitkomst in het serum van een

koortsende patiënt, dat men uit diagnostische overwegingen onderzoekt, dan zal men zich wel wachten er zonder meer beteekenis aan te hechten. Zelfs indien het titer hooger is, b.v. 1 : 200, kan in zulke gevallen nog twijfel blijven bestaan.

Onspecifieke reacties t.o.v. Brucella abortus zijn volgens Kristensen en Holm uiterst zelden.

Men dient op de hoogte te zijn van het bij de Brucella-agglutinaties veel voorkomende „zône-phenomeen". Hieronder verstaat men het verschijnsel, dat in geringe serumverdunning de reactie negatief of zwak positief is, terwijl zij in sterkere verdunningen eerst duidelijk positief wordt. De practische beteekenis van dit verschijnsel is, dat men zich niet tevreden kan stellen met het verrichten van de reactie in serumverdunningen van 1 : 25 of 1 : 50, aangezien men dan de kans loopt, indien het zone-phenomeen optreedt, fouten te maken.

Alice Evans noemt de agglutinatiereactie de meest accurate indicator voor de aanwezigheid van een Brucella-infectie. Hierbij moet opgemerkt worden dat in het artikel, waarin zij deze uitspraak doet, de complementbindingsreactie niet genoemd wordt.

Men dient echter niet elke agglutinatie in het bloed van een patiënt, ook al is het titer hoog, als bewijzend voor het bestaan van febris undulans te beschouwen. Bij klinisch zich niet uitende, z.g. latente infectie, vindt men soms sterke agglutinatiereacties. Hiermede dient de klinicus rekening te houden, vooral als het gaat om personen die in hun beroep regelmatig nauw contact hebben met smetstoffen, b.v. dierenartsen, veehouders, enz. Hetzelfde geldt voor de hierna te bespreken complementbindingsreactie.

In tegenstelling met de agglutinatiereactie wordt de complementbindingsreactie voor de diagnostiek van Brucella-infecties betrekkelijk weinig toegepast. Ook hier is het tijdstip waarop in geval van ziekte de complementbindende amboceptoren in het serum aangetoond kunnen worden niet nauwkeurig bekend. Löffler meent dat deze stoffen iets later aanwezig

zijn dan de agglutininen; Kristensen is dezelfde meening toegedaan.

Bij welke titer de reactie positief gerekend moet worden is zelden vermeld. Beek komt, na bestudeering van de litteratuur, tot de conclusie dat remming van de haemolyse indien 0.1 cc. of 0.05 cc. serum in een totale hoeveelheid vloeistof van 2 of 2.5 cc. verdund zijn, als een positieve reactie moet worden beschouwd.

Spengler meent dat de complementbindingsreactie en de agglutinatiereactie wat uitkomsten betreft, ongeveer parallel loopen. Berenz onderzocht ruim 500 rundersera en vond 152 maal een positieve agglutinatiereactie (titer 1 : 100) en 202 maal een positieve complementbindingsreactie. Bij een positieve agglutinatie in een verdunning van 1 : 100 konden 19 maal geen complementbindende stoffen aangetoond worden. In 83 gevallen verliepen de reacties geheel afwijkend. In 57 hiervan was alleen de complementbindingsreactie positief, waarbij opgemerkt moet worden dat 33 dezer gevallen een positieve agglutinatiereactie in een verdunning 1 : 50 vertoonden. Volgens Kristensen vindt men, wanneer beide reacties vergeleken worden, naar beide zijden verschillen. De verdunningen, waarin de reacties positief gevonden worden, zijn dikwijls zeer sterk uiteenloopend.

Löffler deelt mede dat, niettegenstaande een negatief resultaat met de agglutinatie- en complementbindingsreactie is verkregen, toch een manifeste febris undulans aanwezig kan zijn. Dit is echter uitzondering; uit eigen ervaring was hem één geval bekend.

In het algemeen wordt de complementbindingsreactie als een aanvullend onderzoek van de agglutinatiereactie beschouwd.

Zeer belangrijk vooral in verband met het opsporen van oude of latente Banginfecties zijn de onderzoekingen van Axel Thomsen. Hij vond dat 94 % van een groep door hem onderzochte dierenartsen antilichamen tegen de abortus-bacil in hun bloed hadden. Een enkele maal konden

agglutininen aangetoond worden maar in de regel werden alleen complementbindende stoffen gevonden. Bij het onderzoek van 6 veterinairen, die aan febris undulans geleden hadden, bleken de agglutininen na herstel van de ziekte vrij snel te verdwijnen. De complementbindende stoffen waren na eenigen tijd wel in mindere mate aanwezig, geheel verdwijnen deden ze echter niet.

Dat de complementbindingsreactie minder vaak gedaan wordt dan de agglutinatiereactie zal wel een gevolg zijn van de moeilijke en tijdroovende techniek van de eerstgenoemde. Vooral in verband met de waarnemingen van Thomsen leek het ons nuttig in de verschillende sera ook een onderzoek naar complementbindende stoffen in te stellen. Het wekt verwondering in de publicaties van Huddleson, Miss Evans en andere Amerikaansche onderzoekers, die zich met de phagocytosereactie hebben bezig gehouden, weinig of in het geheel niets omtrent de complementbindende amboceptoren vermeld te vinden.

De Huidreactie.

De huidreactie heeft tot doel een allergie, die tengevolge van al of niet latente Brucella-infectie is opgetreden, aan te toonen. Verschillende praeparaten zijn tot dit doel aangewend. In Amerika wordt veel gebruik gemaakt van het door Huddleson bereide brucellergen. De bereiding hiervan is nogal gecompliceerd. Het eindproduct is het verdunde nucleoproteine uit Bangbacillen. Hiervan wordt 0.1 cc. intracutaan in de onderarm ingespoten.

In geval van een positieve reactie ontstaan een locaal oedeem en een erytheem, waarvan de grootte 2.5 tot 7.5 cm. in diameter moet zijn. Is de locale reactie niet in deze mate aanwezig dan mag zij niet als positief gekwalificeerd worden. Een enkele maal treedt necrose op, vrij vaak ziet men naast de locale- een algemeene reactie.

Gaub en Huddleson zijn van meening dat bij een negatieve huidreactie een Brucella-infectie practisch uitgesloten kan worden. Meyer en Geiger vinden de huidreactie een gevoeliger methode om latente infecties aan te toonen dan de agglutinatie- en complementbindingsreactie. Toch is zij volgens hen niet in staat om iedere, niet met klinische verschijnselen gepaard gaande infectie op te sporen, o.a. omdat de huidallergie volgens hen waarschijnlijk een variabele toestand is. Alice Evans acht de cutane reactie een minder accurate indicator voor versche infecties omdat de allergische toestand zich nogal laat zou ontwikkelen, later b.v. dan het optreden van de agglutininen. Zij vond in 39% van een aantal lijders aan chronische brucellosis de huidreactie negatief, hetgeen niet in overeenstemming is met de opvatting

dat de negatieve huidreactie een brucella-infectie uitsluit.

Persoonlijke ervaring over het ziektebeeld dat in Amerika chronische brucellosis wordt genoemd, ontbreekt ons. Het is niet de bedoeling hierop in te gaan. Alleen willen wij vermelden dat het Mary Poston bij 14 patiënten bij wie de diagnose chronische brucellosis was gesteld, 5 maal gelukte de bacillen uit het bloed te kweeken.

Dat men de serologische reacties moet verrichten alvorens men de huidrecatie doet, blijkt uit een mededeeling van van der Hoeden. Vijf en twintig dagen na de inspuiting van Bang-allergeen vond hij in 13 van de 17 gevallen een positieve agglutinatie- of complementbindingsreactie, terwijl deze reacties voordat het allergen ingespoten was, negatief waren geweest.

Eenige malen hebben wij in de kliniek de huidreactie gedaan met ons door Huddleson toegezonden materiaal (Brucellergen). Verschillende keeren zagen wij bij lijders aan Banginfectie, behalve de positieve locale reactie, een vrij heftige algemeene reactie optreden. Ook in de litteratuur vindt men heftige algemeene reacties veelvuldig vermeld. Raoul en Madame Kiroulsky beschrijven een nieuwe koortsperiode die in aansluiting aan het verrichten van een huidreactie optrad, bij een patiënt die reeds eenigen tijd geleden een Banginfectie had doorgemaakt.

Op grond van deze mededeelingen in de litteratuur, maar vooral ook naar aanleiding van onze onaangename ervaringen, hebben wij er bij ons onderzoek van afgezien de huidreactie te verrichten.

HOOFDSTUK II.

TECHNIEK VAN HET ONDERZOEK.

Phagocytosereactie.

Bij het verrichten van de phagocytosereactie is de door Huddleson uitgewerkte methode gebruikt en als volgt toegepast:

1. Met een spuit volgens Luers werd 15 tot 20 cc. bloed uit de vena cubiti genomen. Van dit bloed is 5 cc. in een buisje met 0.2 cc. van een 20 % natriumcitraatoplossing in physiologische keukenzoutsolutie gebracht. Stolling van het bloed werd hierdoor voorkomen en de vereischte concentratie van het natriumcitraat, 0.8 %, was verkregen. De rest van het bloed werd in een ander buisje gespoten, teneinde met het serum daarvan serologische reactie's te verrichten.

2. Een suspensie van abortusbacillen in physiologische zoutoplossing werd gemaakt van een cultuur die in 24 tot 48 uur op vleeschbouillonagar gegroeid was. Hiertoe werd 0.1 cc. zoutoplossing in een klein buisje gepipetteerd en, met behulp van een platinanaald met oogje werden bacillen in de zoutoplossing gebracht. Door roeren met de naald kon een gelijkmatige suspensie van de gewenschte dichtheid worden gemaakt.

3. Door middel van een pipet werd 0.1 cc. citraatbloed bij deze suspensie gevoegd. Het buisje werd geschud, teneinde de vloeistoffen goed te mengen en daarna gedurende 30 minuten in een broedstoof op een temperatuur van 37° gezet. Na verloop van dit halve uur werd het buisje wederom ge-

schud, vervolgens werd met een pipetje een druppel van de inhoud op een voorwerpglas gebracht, waarna, op de gebruikelijke wijze, een uitstrijkpraeparaat werd gemaakt.

4. Liefst den volgenden dag werd het praeparaat gedurende 15 minuten gefixeerd met een mengsel van gelijke deelen van alcohol en aether. Voor het kleuren is azuur-eosine volgens Giemsa gebruikt. Een verdunning van 30 druppels dezer kleurstof in 10 cc. water kleurde de praeparaten in 15 minuten goed. Na het kleuren werd afgespoeld met water. Eenige druppels van een 1 % azijnzuuroplossing werden vervolgens op het vochtige praeparaat gebracht waarna het na ongeveer 15 sec. weer met water afgespoeld werd.

Zoowel bij de venapunctie als bij het verdere onderzoek werd de steriliteit in acht genomen.

Allereerst dient thans gewezen op de fouten, die met de beschreven techniek gemaakt kunnen worden: Het afmeten van 5 cc. bloed met een spuit van 20 cc. is niet de ideale wijze om dit zeer nauwkeurig te doen. Hierbij komt, dat het practisch onmogelijk bleek te zijn bloed op te vangen, zonder dat een kleine hoeveelheid lucht in de spuit toetrad. Door de arm waarin gepuncteerd werd zoodanig te stuwen, dat de stamper door het bloed in de spuit naar boven gedrukt werd, kon voorkomen worden dat vele kleine luchtbelletjes of schuim in de spuit kwamen. Een luchtbel van geringe grootte was echter altijd wel aanwezig. Bij het ledigen van de spuit werd gezorgd dat de luchtbel zich onder de stamper bevond. De fout, die door de aanwezigheid van lucht bij het afmeten gemaakt kon worden, is op deze wijze tot een minimum gereduceerd.

Om direct contact van mond met pipet te vermijden, is bij het pipetteeren gebruik gemaakt van een U buisje met gummidop, dat door middel van een gummi-slangetje op een pipet bevestigd kon worden. Op deze wijze kan men behoorlijk nauwkeurig pipetteeren.

Het zal zeker mogelijk zijn veranderingen in de techniek aan te brengen, waardoor een grootere nauwkeurigheid bereikt

kan worden. Het gevolg zal zijn dat dan de techniek ingewikkelder wordt. Het is echter de bedoeling geweest deze zoo eenvoudig mogelijk te houden. De belangrijkste consequentie van eenige onnauwkeurigheid, is dat de eindconcentratie van het natriumcitraat niet precies 0.8 % zal zijn. In hoeverre geringe afwijkingen hierin van beteekenis zijn is ons niet bekend. Ook Huddleson laat zich hier niet over uit, terwijl de methode waarop hij het bloed en de andere vloeistoffen afmeet ook wel aan een nauwkeurigheidsgrens gebonden zal zijn. Wel kan vermeld worden dat hij in 1936 een reeks onderzoekingen publiceerde waarbij de concentratie van het citraat in het bloed 1 % is gemaakt in plaats van 0.8 %, terwijl toch de interpretatie van de uitkomsten dezelfde is gebleven.

Bij de bereiding van de bacterie-suspensie werd de dichtheid ervan geschat. Het aantal microörganismen per cc zal hierdoor aan grooter variaties onderhevig zijn, dan wanneer telkens met behulp van een nephelometer het aantal bacillen zoo nauwkeurig mogelijk gelijk wordt ingesteld. Er is van een suspensie uitgegaan waarin met de nephelometer van Wellcome is bepaald, dat het aantal microörganismen per cc. 20 milliard bedroeg. Binnen zekere grenzen heeft variatie in de dichtheid van de suspensie geen essentieele beteekenis. Eenige malen is de invloed van het gebruik van verschillende suspensies gecontroleerd. Hierbij was de dichtheid de helft, het dubbele en het viervoudige van de gewoonlijk gebruikte. Het verschil in uitkomst bij onderzoek van eenzelfde bloedmonster met deze suspensies, met die van de normale, was gering. Het verschil in dichtheid dat tengevolge van het schattenderwijs bereiden der gebruikte suspensie kan optreden is zeer zeker veel geringer dan de afwijkingen in de zoo juist genoemde contrôleproeven.

Om later te motiveeren redenen is deze techniek gewijzigd. In plaats van natriumcitraat aan het bloed toe te voegen om stolling te voorkomen, is liquoid gebruikt. Het liquoid is een natriumzout van polyanetolsulfonzuur. Waarom de keuze

op het liquoid gevallen is, zal later nog besproken worden.

Het onderzoek van de gemaakte praeparaten geschiedde met een binoculaire microscoop. Bij gebruik van een ongeveer 700-voudige vergrooting waren de cellen uitstekend te beoordeelen. Als regel werden aan beide randen van het praeparaat enkele cellen bekeken terwijl altijd een „toer" dwars over het praeparaat gemaakt werd om de cellen die meer in het centrum gelegen waren ook in de beoordeeling te betrekken. De neutrophile leucocyten waren zeer duidelijk van de andere cellen te onderscheiden. Ook de eosinophile cellen waren goed te herkennen. In contrôlepraeparaten bleek bij de toegepaste methode van kleuren geen granulatie van het protoplasma zichtbaar te zijn. Bij het onderzoek van de cellen is het voorschrift zooals Huddleson dit geeft, gevolgd, d.w.z. in ieder praeparaat werden 25 vrijliggende leucocyten bekeken en er werd geteld hoeveel micro-organismen in iedere cel aanwezig waren.

Hoewel geprobeerd is dit getal zoo nauwkeurig mogelijk vast te stellen, bleef toch de indruk bestaan dat de uitkomsten slechts als zeer benaderend beschouwd moesten worden. Hierbij komt nog dat het niet uitgesloten is, dat er micro-organismen in de cel niet zichtbaar zijn doordat hun projectie samenvalt met die van de donkergekleurde celkern. Meerdere malen leek dit het geval te zijn. Het komt ons om deze redenen niet geheel juist voor om aan de resultaten van het tellen der micro-organismen in de cellen een dergelijke belangrijke waarde toe te kennen als Huddleson dat doet. De uitkomsten van ons onderzoek zullen dan ook op een andere wijze worden weergegeven.

Ook Miss Evans is van meening dat aan het tellen van de gephagocyteerde bacillen niet te groote beteekenis moet worden gehecht. Zij is van meening dat niet het aantal bacillen in de leucocyt bepaalt of de reactie positief of negatief is, maar dat het van belang is erop te letten of de bacillen in de cel dichter bij elkaar gelegen zijn dan in de omgeving. Iemand met ervaring op het gebied van dit onderzoek, zou

dan dikwijls in staat zijn met één oogopslag te zien of de reactie positief is of niet.

Met deze opvatting kunnen wij ons niet geheel vereenigen, omdat wij zeer vaak leucocyten te midden van een zeer groot aantal bacillen hebben zien liggen, zonder dat er een bacil in de cel lag of erin scheen te liggen. In gedeelten van negatieve praeparaten waar de verdeeling der bacillen onregelmatig was, vormden de leucocyten dikwijls eilandjes temidden van een groote opeenhooping van micro-organismen. Werden in dergelijke gedeelten van het praeparaat 25 cellen onderzocht dan was de uitkomst practisch altijd gelijk aan die, welke gevonden werd, indien de fraaiere gedeelten van het praeparaat werden bekeken. Zeker was het nooit zoo dat de beoordeeling van het praeparaat, positief of negatief, beïnvloed werd door verschillende deelen ervan te onderzoeken. Wel is vermeden, samengeklonterde cellen en bacteriën in de beoordeeling te betrekken.

Meyer en Geiger hebben eveneens het tellen van de micro-organismen in de cellen achterwege gelaten. Zij gaven de beoordeeling door verschillende teekens weer. Hetzelfde hebben wij ook meenen te moeten doen. Het kwam wel gewenscht voor om eenigermate aan te geven in welke graad de reactie positief was. Een sterke positieve reactie, d.w.z. wanneer alle cellen geheel met bacillen gevuld waren is door het teeken III weergegeven. Een zeer duidelijk positieve reactie door II, een matig positieve reactie door I en een negatieve reactie is door het teeken - aangegeven. Er zijn echter ook gevallen waarbij men zich afvraagt of de uitkomst negatief of positief genoemd moet worden. Voor deze gevallen is het teeken ± gereserveerd. Om een indruk te geven, wanneer een reactie positief of sterk positief is genoemd, zullen van een aantal gevallen de hoeveelheid micro-organismen die per cel gezien werd worden weergegeven, naast de waardeering zooals deze in de tabellen voorkomt (blz. 93). Als grondregel is aangenomen, dat, wanneer in een paar cellen 1, 2 of 3 micro-organismen gezien werden, terwijl de overige er geen bevatten,

de reactie negatief is genoemd, rekening houdende met de mogelijkheid dat het een enkele maal de schijn kan hebben dat micro-organismen in de cel liggen, terwijl dit niet het geval is, of althans moeilijk is uit te maken. Om een reactie als positief te beschouwen moesten er in minstens 2 van de 25 leucocyten 10 of meer bacillen gezien worden.

Agglutinatie- en complementbindingsreactie.

Met het serum van iedere onderzochte persoon is een agglutinatiereactie met 5 verschillende serumverdunningen verricht. Deze waren 1 : 25; 1 : 50; 1 : 100; 1 : 200 en 1 : 400. Zoodoende werden zwak positief reageerende sera opgespoord, terwijl door de reactie tot in een verdunning van 1 : 400 voort te zetten, fouten door eventueel optreden van het zonephenomeen practisch uitgesloten zijn. Telkens werd tevens een z.g. contrôlebuisje, waarvan de inhoud uit 1 cc. physiologische zoutoplossing en suspensie bestond, ingezet.

De buisjes waarin de reactie plaats had werden in een waterbad op een temperatuur van 37° gezet en er na ongeveer 24 uur uit verwijderd. Nadat zij tot kamertemperatuur afgekoeld waren, werd de reactie afgelezen.

Bleek de agglutinatiereactie positief te zijn tot in een verdunning van 1 : 400 dan is zij herhaald en verder voortgezet. Aanvankelijk zijn eenige agglutinatiereacties met verschillende suspensies in duplo verricht. De eene, houdbare, suspensie, was de in het laboratorium voor routine onderzoek gebruikte. De andere werd versch bereid van de stam abortusbacillen die ook voor de phagocytosereactie werd gebruikt. Aan de suspensie die voor het routineonderzoek diende was carbol toegevoegd. De versche suspensie werd bereid van een cultuur, die 48 uur gegroeid was op vleeschbouillonagar. Bij dit vergelijkend onderzoek vonden wij enkele malen dat de agglutinatiereactie iets duidelijker verliep in de buisjes waaraan de versche cultuur was toegevoegd. Later is de reactie uitsluitend met een versche suspensie gedaan. De dichtheid van de suspensie werd zoo gekozen dat, wanneer 2 druppels ervan, aan de serumverdunningen werden toegevoegd, er een duidelijke troebeling optrad. Verschillende malen

zijn reacties herhaald en de uitkomsten dekten elkaar altijd goed.

Men zal kunnen opmerken dat de wijze waarop de agglutinatiereactie is uitgevoerd, niet voldoet aan alle eischen die b.v. Fitch en zijn medewerkers eraan stellen. We hebben de indruk gekregen dat zij voldoende betrouwbaar is en al zal het voordeelen kunnen hebben alle voorschriften van Fitch in aanmerking te nemen, dan staat hiertegenover een nadeel. Zou men alle factoren die de uitkomsten kunnen beinvloeden, zooals de dichtheid van de suspensie, de Ph van de keukenzoutoplossing die gebruikt wordt, enz. telkens minutieus hetzelfde willen maken dan zou de uitvoering der reactie niet alleen meer tijd in beslag nemen, maar ook de techniek ingewikkelder worden. Zooals reeds eerder is gezegd is het de bedoeling geweest de techniek zoo eenvoudig mogelijk te houden. De consequenties hiervan moeten daarbij aanvaard worden, maar het maakt niet de indruk dat deze van dien aard zijn dat het noodig is, een ingewikkelder methode te volgen.

De uitkomsten van de reactie zijn als volgt weergegeven: bestond na 24 uur in een buisje volledige samenklontering der bacteriën en was de bovenstaande vloeistof helder dan werd dit door het teeken III weergegeven. Was de bovenstaande vloeistof duidelijk opgeklaard, doch niet geheel helder en bevond zich op de bodem van het buisje een duidelijke sluier van samengeklonterde bacillen, dan werd dit met het teeken II aangeduid. Had de opklaring niet of niet duidelijk plaats gevonden maar was nog wel een geringe sluier op den bodem te zien dan werd het teeken I gebruikt. Was naast het puntvormige bezinksel slechts een geringe korrelige sluier te zien en werd geen duidelijke samenklontering der bacillen waargenomen dan werd het teeken ± gebezigd. Was van vlokvorming geen sprake dan werd het teeken - gebruikt.

De complementbindingsreactie is verricht volgens de methode welke door v. d. Hoeden in 1926 en in 1928 is aangegeven.

Alvorens tot het uitvoeren van de reactie zelf over te gaan is het haemolytisch serum uitgetitreerd teneinde zijn amboceptorgehalte vast te stellen. Men bepaalt daarbij in welke verdunning nog juist volledige haemolyse optreedt van het schapenbloed dat later bij het verrichten van de complementbindingsreactie zal worden toegevoegd. Voor de reactie zelf werd de 6-voudige concentratie daarvan gebruikt. Tevens is telkens een complementtitratie gedaan in het versche caviaserum dat voor de reactie werd gebruikt, terwijl eveneens in deze voorproef werd uitgezocht in welke verdunning het antigeen bij de te gebruiken concentratie van het complement toegevoegd kan worden, zonder remming van de haemolyse te veroorzaken. Zijn alle gegevens bekend en zijn de voorproeven naar wensch verloopen dan wordt de complementbindingsreactie verricht.

De te onderzoeken sera zijn, door verwarming op 56° gedurende 30 minuten, geïnactiveerd. Het antigeen, een suspensie van abortusbacillen, werd bereid van culturen van dezelfde stam, die ook voor de agglutinatie- en de phagocytosereactie is gebruikt. De cultuur was ongeveer 24 uur oud en werd na verwijdering van het condensatiewater in physiologische keukenzoutoplossing gesuspendeerd. De reactie had in buisjes plaats. Zij was quantitatief doordat van ieder serum 6 buisjes werden ingezet waarbij de serumconcentratie varieerde in de verhouding: 60, 20, 15, 5, 3 en 1. Daarbij bevond zich in het eerste buisje 3/50 cc. serum van de patiënt op een totale hoeveelheid van 0.9 cc. vloeistof. De hoeveelheden verdund serum, complement en antigeen waren in alle buisjes hetzelfde, terwijl in de 2de phase der reactie aan ieder buisje werd toegevoegd een gelijke hoeveelheid van een 5 % suspensie van gewasschen schapenbloed en de in de voorproef bepaalde verdunning van de haemolytische amboceptor. Om het eigenremmend-vermogen van de sera te controleeren werden met ieder serum eenige contrôlebuisjes ingezet, die, met uitzondering van het antigeen, dezelfde stoffen bevatten als de proefbuisjes. Ter contrôle van het antigeen, is telkens wanneer

reacties verricht werden, deze ook met een bekend serum gedaan en tevens met physiologisch keukenzout, zonder serum.

Dezelfde teekens waarmede de uitkomsten van de agglutinatie- en phagocytosereactie zijn weergegeven zijn ook voor het weergeven van de uitkomsten der complementbindingsreactie gebezigd. Was in een buisje volledige haemolyse opgetreden, was de reactie in dat buisje dus negatief, dan is dit door het teeken: - voorgesteld. Was de haemolyse volledig geremd, dan is dit door het teeken: III aangegeven. Bestond sterke, doch geen totale remming, dan is het teeken: II, in geval van duidelijke remming het teeken: I gebruikt. Was de remming dermate gering dat men zich afvroeg of de reactie wel positief genoemd mocht worden, dan is het teeken: ± gebruikt.

Voor het onderzoek is een uit het bloed van een lijder aan febris undulans gekweekte stam van abortusbacillen gebruikt. Dagelijks of om den anderen dag werd overgeënt, zoodat altijd culturen die 24 tot 48 uur oud waren ter beschikking stonden. Als voedingsbodem zijn buisjes condenswater bevattende vleeschbouillonagar gebruikt die met een wattenprop gesloten waren. De groei der bacillen was bij een temperatuur van 37° uitstekend.

Contrôle van de culturen geschiedde geregeld. In de eerste plaats doordat telkens, wanneer agglutinatie- en complementbindingsreactie's ingezet werden, waarvoor suspensies van de culturen als antigeen gebruikt waren, deze ook met een bekend serum zijn verricht. In de tweede plaats is minstens tweemaal per week een praeparaatje, gemaakt, en volgens Gram gekleurd om te zien of er geen verontreinigingen aanwezig waren. Vrijwel dagelijks zijn phagocytosereacties gedaan. Dikwijls werden proeven herhaald. Indien de bacillen tengevolge van het veelvuldige overenten of door andere oorzaak ongeschikt voor de phagocytosereactie zouden zijn geworden, dan was dit zeer zeker onmiddellijk opgevallen.

HOOFDSTUK III.

RESULTATEN VAN HET ONDERZOEK.

Bij Bangpatiënten.

Ter inleiding worden de resultaten medegedeeld van het onderzoek dat bij vijf lijders aan febris undulans werd verricht.

TABEL I.

Uitkomsten der reacties bij vijf lijders aan febris undulans.

No.	Diagnose	Agglutinatie [1])								Complementbind. [2])						Phagocyt.	
		1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	Citr. bloed	Liq. bloed
1288	M. Bang .	II	III	III	III	III	III	II	I							III	
1227	M. Bang .	II	III	III	III	III	III	III	III							III	
147	M. Bang .	III	III	III	III	III	III	±	—	III	III	III	III	III	I	III	III
148	Malta-koorts	II	III	III	III	III	III	II	I	III	III	III	III	III	II	III	III
182	M. Bang .	II	III	III	III	III	III	III	II	III	III	III	III	III	III	III	III

[1]) 1 = serumverdunning 1 : 25.
2 = „ 1 : 50.
3 = „ 1 : 100 enz.

[2]) Verhouding serumverdunningen.

1 = $^{3}/_{50}$ cc serum op 0.9 cc vloeistof . . . . 60.
2 = $^{1}/_{50}$ „ „ „ 0.9 „ „ . . . . 20.
3 = $^{3}/_{200}$ „ „ „ 0.9 „ „ . . . . 15.
4 = $^{1}/_{200}$ „ „ „ 0.9 „ „ . . . . 5.
5 = $^{3}/_{1000}$ „ „ „ 0.9 „ „ . . . . 3.
6 = $^{1}/_{1000}$ „ „ „ 0.9 „ „ . . . . 1.

Met uitzondering van patiënt 182, die pas 3 weken ziek was, leden alle andere patiënten reeds langer dan 1 maand aan de ziekte. Ook na het onderzoek bleven de laatstgenoemden eenige maanden koortsen. Geen hunner was met een vaccin of serum behandeld. De diagnose welke klinisch, voorzoover dit mogelijk is, met zekerheid gesteld kon worden, is door de serologische reactie bevestigd, terwijl het bij vier gevallen gelukte de bacillen uit het bloed te kweeken. Hierdoor was het mogelijk op grond van de eigenschappen van de gekweekte bacillen bij één der patiënten de diagnose Brucella melitensis te stellen. Volledigheidshalve zij opgemerkt dat deze patiënt tijdens een reis in Dalmatië ziek was geworden. In de andere gevallen werd Bacillus abortus gekweekt. Bij patiënte Nr. 1227 is nadat zij eenige weken vrij van koorts was en zij als genezen werd beschouwd, de huidreactie met brucellergeen verricht. De locale reactie was positief, terwijl tevens een hevige algemeene reactie optrad. Gedurende twee dagen was de temperatuur zeer hoog en de patiënte voelde zich ziek. Met het oog op deze heftige verschijnselen is zij de laatste geweest bij wie de huidrecatie is verricht.

Zooals uit de tabel blijkt was de agglutinatiereactie in alle gevallen sterk positief terwijl ook in de vier gevallen, waar de complementbindingsreactie was verricht, deze een sterk positieve uitkomst gaf. Ook de phagocytosereactie werd bij deze vijf patiënten sterk positief gevonden wanneer deze met citraatbloed werd uitgevoerd en eveneens in de drie gevallen waarin de reactie met liquoidbloed was verricht.

Dat volgens Huddleson het bloed van patiënten, die aan Maltakoorts lijden, een sterke phagocytaire activiteit kan vertoonen, werd dus bevestigd. Er kan aan toegevoegd worden dat hetzelfde gezegd kan worden van patiënten die aan de ziekte van Bang lijden.

Helaas ontbrak de gelegenheid meer patiënten te onderzoeken. Bovenstaand tabelletje is echter voldoende om aan te toonen dat zoowel met citraat- als met liquoidbloed phagocytose bij lijders aan febris undulans wordt gevonden. Er mag

verondersteld worden dat indien de huidreactie zou zijn ingesteld, deze bij alle vijf de patiënten wel positief zou zijn verloopen, waaruit zou volgen, dat zij volgens de indeeling van Huddleson, immuun waren. De meening van Keller dat koortsende patiënten waarbij een sterke phagocytose wordt gevonden, waarschijnlijk niet aan febris undulans, maar aan een andere ziekte lijden, vindt in de resultaten van dit onderzoek geen steun.

Bij andere patiënten en bij gezonde menschen.

Gebleken is, dat bij patiënten, die aan de ziekte van Bang lijden de phagocytosereactie positief gevonden wordt. Van groot belang is nu te weten of deze reactie specifiek is. Om te trachten dit uit te maken, is een onderzoek ingesteld naar haar verloop bij patiënten die aan een andere ziekte lijden en bij gezonde menschen.

Men moet er rekening mee houden dat personen die met abortusbacillen geïnfecteerd zijn geweest, nog langen tijd na de infectie immuunstoffen tegen deze bacil in hun bloed kunnen hebben, onafhankelijk van het feit of de infectie aanleiding heeft gegeven tot het optreden van klinische verschijnselen, of wel dat deze „latent" verloopen is. Het is derhalve mogelijk dat men bij gezonde personen of bij patiënten die niet aan de ziekte van Bang lijden, positieve serumreacties, waaronder ook de phagocytosereactie, zal vinden, als gevolg van een vroegere infectie. Dit bemoeilijkt het onderzoek naar de specificiteit der reactie.

Nu zou men voor contrôle een groep personen kunnen kiezen bij wie een infectie zeer onwaarschijnlijk geacht moet worden. Indien men bij het samenstellen dezer groep rekening zou houden met beroep, woonplaats, het al of niet drinken van rauwe melk enz., dan lijkt het inderdaad mogelijk aldus een groep personen te vormen, waarbij de kans dat er zich geïnfecteerden onder bevinden, gering zal zijn. Dat men echter vergissingen kan begaan als men deze methode volgt is be-

grijpelijk en wordt wel het duidelijkst geïllustreerd door de groote moeilijkheden die zich dikwijls voordoen om bij lijders aan de ziekte van Bang vast te stellen, op welke wijze zij zich geïnfecteerd kunnen hebben. Kramer en Rombach beschreven beide een voorbeeld hiervan. Ook ons is het eenige malen overkomen, dat het zelfs bij nauwkeurig navragen, niet gelukte de mogelijke infectiebron op te sporen.

Andere maatstaven voor de keuze van personen voor de contrôlegroep, zullen evenmin volledige zekerheid geven dat geen infectie heeft plaats gehad.

Wij meenden een bruikbare aanwijzing te hebben in de afwezigheid van agglutininen en complementbindende antistoffen in het serum.

Daarbij dient men evenwel te bedenken dat bij wijze van uitzondering deze stoffen bij geïnfecteerde personen niet worden gevormd, of na besmetting spoedig weer verdwijnen.

TABEL II.

Onderzoek bij „contrôle"-personen.

No.	Geslacht.	Diagnose.	Aggl.	c.b.	Phagocytose citraat bloed	Phagocytose liq. bloed
1	m.	gezond	—		—	
2	m.	gezond	—		—	
3	m.	pleuritische Schwarte	—		—	
4	m.	otogene sepsis	—		—	
5	v.	dubbelzijdige hydronephrose	—		—	
6	v.	endocarditis lenta	—		—	
7	v.	paratyphus C	—		—	
8	m.	paratyphus Aertrycke	—		—	
9	v.	t.b.c. pulmonum	—		—	
10	v.	asthma bronchiale	—		—	
11	v.	miliair tuberculose	—		—	
12	v.	t.b.c. abdominalis	—	—	—	
13	m.	ulcus duodeni	—	—	—	—
14	m.	diabetes mellitus	—	—	—	
15	m.	diabetes mellitus	—		—	
16	v.	chronisch rheuma	—	—	—	—
17	v.	cholecystitis	—		—	
18	v.	icterus catarrhalis	—	—	—	
19	m.	diabetes mellitus	—		—	
20	m.	ulcus duodeni	—		—	—
21	v.	myalgie	—	—	III	
22	v.	diabetes mellitus	—		—	—
23	v.	longafwijkingen	—		—	
24	m.	hysterie	—		—	
25	m.	ulcus duodeni	—		—	
26	m.	M. Basedow en diabetes	—		—	
27	v.	pneumonie	—		—	
28	v.	braken e.c.i.	—	—	I	
29	v.	meningitis epidemica	—		—	
30	v.	gravida	—	—	III	
31	v.	ulcus duodeni	—		—	
32	v.	buikklachten	—		—	
33	v.	ulcus duodeni	—		—	—
34	m.	pneumonie	—	—	—	
35	v.	ulcus ventriculi	—	—	—	
36	v.	cystenier	—		—	
37	m.	pyelitis	—	—	—	
38	m.	roodvonk	—		—	
39	v.	recidiveerende pyelitis	—		—	
40	v.	nephrolithiasis	—		—	
41	m.	Hodgkin	—		—	
42	m.	ulcus duodeni	—		—	—
43	m.	ulcus duodeni	—		—	
44	m.	lymphosarcomatosis v. d. long	—		—	—
45	m.	pyurie	—	—	II	—

No.	Geslacht.	Diagnose.	Aggl.	c.b.	Phagocytose citraat bloed.	Phagocytose liq. bloed.
46	m.	tachycardie	—		—	
47	m.	Indische spruw	—		±	
48	m.	diabetes mellitus	—		—	—
49	v.	buikklachten	—	—	I	
50	v.	geen afwijkingen	—		—	—
51	v.	galsteenen	—		—	—
52	v.	hyperthyreoidie	—		—	—
53	m.	cardiospasme	—	—	—	—
54	m.	diabetes mellitus	—		—	—
55	v.	situs inversus	—	—	—	—
56	v.	chronisch rheuma	—		—	—
57	m.	carcinoma ventriculi	—	—	—	—
58	m.	chronisch rheuma	—	—	—	—
59	v.	bronchiectasen	—	—	II	—
60	v.	haemorrh. diathese	—		—	—
61	m.	ulcus ventriculi	—		—	—
62	v.	miltvenethrombose	—		—	—
63	m.	osteomalacie	—		—	—
64	m.	intermitteerende temp.	—		—	—
65	v.	longtuberculose	—		—	—
66	m.	longtumor	—		—	—
67	m.	geen afwijkingen	—		—	—
68	m.	geen afwijkingen	—	—	±	—
69	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
70	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
71	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
72	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
73	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
74	m.	ischias	—	—	—	—
75	v.	longtuberculose	—		—	—
76	v.	maagklachten	—		—	—
77	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
78	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
79	v.	typhus en lues	—		—	—
80	m.	diabetes mellitus	—		—	—
81	m.	tumor in abdomen	—	—	—	—
82	v.	hypertensie	—	—	—	—
83	v.	functioneele klachten	—		—	—
84	v.	cholecystopathie	—		—	—
85	m.	longafwijkingen, hooge koorts	—	—	—	—
86	v.	ulcus duodeni en hypertensie	—		—	—
87	m.	vaatlijden	—	—	—	—
88	m.	cystitis	—	—	—	—
89	v.	diabetes, graviditeit en zwangerschapsintoxicatie	—	—	—	—
90	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
91	m.	subacute nephritis	—	—	—	—

No.	Geslacht.	Diagnose.	Aggl.	c.b.	Phagocytose	
					citraat bloed.	liq. bloed.
92	m.	ulcus duodeni	—	—	—	—
93	m.	ulcus duodeni	—		—	—
94	m.	pneumonie	—	—	—	—
95	v.	colitis	—		—	—
96	v.	peritonitis tuberculosa	—	—	—	—
97	m.	diarrhoe	—	—	—	—
98	m.	pneumothorax na trauma . . .	—		—	—
99	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
100	m.	ulcus duodeni	—	—	—	—
101	v.	t.b.c. pulmonum en abdom. . .	—	—	II	±
102	m.	galsteenen	—	—	II	—
103	m.	ulcus duodeni	—	—	—	—
104	v.	gravida, niersteen, bronchiectasen	—	—	III	—
105	m.	vaatafwijkingen beenen				
		hyperthyreoidie	—		—	—
106	m.	lymphosarcoom	—	—	—	—
107	v.	ulcus duodeni	—		—	—
108	m.	niertuberculose	—		—	—
109	m.	longtuberculose	—	—	—	—
110	v.	buikklachten	—		—	—
111	v.	diabetes mellitus	—	—	—	—
112	v.	hypertensie	—	—	—	—
113	m.	maligne granuloom	—	—	—	—
114	m.	diabetes mellitus	—		—	—
115	m.	hypertensie	—	—	—	—
116	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
117	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
118	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
119	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
120	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
121	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
122	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
123	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
124	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
125	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
126	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
127	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
128	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
129	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
130	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
131	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
132	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
133	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
134	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
135	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
136	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
137	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—

No.	Geslacht.	Diagnose.	Aggl.	c.b.	Phagocytose	
					citraat bloed.	liq. bloed.
138	m.	geen afwijkingen	—	—	—	—
139	m.	nephrolithiasis	—	—	—	—
140	m.	buikklachten	—	—	—	—
141	m.	arthtitis	—	—	—	—
142	m.	renale glucosurie	—	—	—	—
143	m.	tuberc. pulmonum	—	—	II	I
144	v.	geen afwijkingen	—	—	—	—
145	m.	pleuritis (Hodgkin)	—	—	—	—

Er zijn 145 personen onderzocht. Alle sera hadden een negatieve agglutinatiereactie. In 81 gevallen is de complementbindingsreactie verricht, steeds met negatief resultaat. Bij alle personen is de phagocytosereactie met citraatbloed gedaan, terwijl bij 109 van hen tevens deze reactie met liquoidbloed is uitgevoerd.

In de groote meerderheid van de gevallen bestond overeenstemming in de uitkomsten van de phagocytosereactie met die der andere reacties. *In 10 gevallen echter was de phagocytosereactie met citraatbloed positief.*

Teneinde na te gaan of deze uiteenloopende resultaten het gevolg konden zijn van een fout in de techniek, is voorzoover de omstandigheden het toelieten, de phagocytosereactie herhaald. In onderstaande tabel worden de uitkomsten van dit tweede onderzoek gegeven, waarbij om een vergelijking gemakkelijk te maken, ook nog de uitkomsten van het eerste onderzoek zijn vermeld.

TABEL III.

Herhaling phagocytosereacties met citraatbloed.

No.		phagocytose.		phagocytose.
21 I	herhaling onderzoek 21	—	uitkomst 1e onderzoek	III
30 I	„ „ 30	III	„ 1e „	III
45 I	„ „ 45	—	„ 1e „	II
59 I	„ „ 59	II	„ 1e „	II
101 I	„ „ 101	II	„ 1e „	II
102 I	„ „ 102	III	„ 1e „	II
104 I	„ „ 104	I	„ 1e „	III

Vijfmaal waren de reacties wederom positief; éénmaal was de reactie bij herhaald onderzoek minder sterk positief.

Tweemaal bleek er een verschil te bestaan in het resultaat van het eerste en het tweede onderzoek. Het is niet waarschijnlijk dat dit verschil in uitkomst het gevolg is van een zoo sterke variatie van het tropinegehalte in het bloed, als men in aanmerking neemt, dat het tijdsverloop tusschen het eerste en tweede onderzoek niet grooter dan één week is geweest. Er is derhalve reden om aan te nemen, dat één der beide uitkomsten onjuist is. Bij patiënt Nr. 21 is de reactie voor een derde maal verricht, wederom met negatief resultaat. Of de fout moet worden toegeschreven aan een tekortkoming van de techniek, is niet te achterhalen. Later zijn verschillende malen reacties herhaald zonder dat belangrijke verschillen in uitkomst werden gevonden.

Hoe moet men nu de positieve phagocytosereacties bij menschen met negatieve agglutinatie- en complementbindingsreactie opvatten? Zooals bekend is, kan men in sommige gevallen wel complementbindende amboceptoren in het bloed vinden en geen agglutininen terwijl ook het omgekeerde voorkomt. In analogie hieraan zou men mogen veronderstellen dat, indien geen agglutininen en complementbindende stoffen worden gevonden, toch wel tropinen in het bloed aanwezig kunnen zijn. Een tweede mogelijkheid is echter dat de phagocytose-

reactie niet geheel specifiek is. Aangezien tot nu toe uit het onderzoek niet is op te maken welke van deze twee veronderstellingen als de juiste moet worden beschouwd, is getracht langs andere weg deze vraag op te lossen.

De phagocytose-reactie, zooals deze door Huddleson is uitgevoerd, heeft tot doel tropinen aan te toonen. Uit de litteratuur blijkt dat tropinen, in tegenstelling met opsoninen, relatief thermostabiel zijn. Wright, Neufeld e.a. deden phagocytosereacties door gewasschen cellen van een willekeurig persoon of dier, in het te onderzoeken serum te suspendeeren en vervolgens met een bacterie-suspensie samen te brengen. Op deze wijze hebben Neufeld en Rimpau door het serum in verwarmde en versche toestand te onderzoeken een onderscheid tusschen tropinen en opsoninen kunnen maken.

Volgens dezelfde methode is nu in verschillende sera een onderzoek naar het voorkomen van tropinen verricht en de uitkomsten zijn vergeleken met die, welke met de methode van Huddleson waren gevonden. Het essentieele verschil in de reacties is, dat Huddleson de werking van de opsoninen door toevoeging van citraat uitschakelt, terwijl bij de andere methode hetzelfde door verwarming, inactiveering, van het serum wordt bereikt.

Voor de uitvoering van de reactie hebben wij een weinig citraatbloed, 3 maal met een physiologische keukenzoutoplossing gewasschen, zoodat alle plasma verwijderd was. Serum van de te onderzoeken persoon werd gedurende 30 min. op een temperatuur van 56 graden in een waterbad verwarmd. Ongeveer gelijke hoeveelheden gewasschen cellen en geïnactiveerd serum werden bij elkaar gevoegd. Vervolgens werd goed gemengd en de phagocytosereactie op de gebruikelijke wijze uitgevoerd. Ook plasma van bloed dat tropinen bevatte en waarin de concentratie van het citraat 0.8 % is, bleek na verwarming, nog een duidelijke phagocytosereactie te veroorzaken. Zooveel mogelijk werden cellen en serum van een

zelfde persoon gebruikt teneinde agglutinatie van de erythrocyten te voorkomen. Later is gebleken dat eventueel optreden van deze agglutinatie de phagocytose niet merkbaar beïnvloedt. Om te beginnen zijn de resultaten van de phagocytosereactie met verwarmd plasma van 2 lijders aan febris undulans gegeven.

TABEL IV.

Phagocytosereacties met verwarmd plasma bij Bangpatienten.

No.	Omschrijving	Phagocytose.
147 N	gewasschen cellen 147 en verwarmd plasma 147 . . .	III
148 B_1	„ „ 148 „ „ „ 148 . . .	III

Deze uitkomsten toonen aan dat het op deze wijze zeer goed mogelijk is tropinen aan te toonen. De resultaten van de reacties met geïnactiveerd serum van personen uit de contrôlegroep waarbij de phagocytosereactie met citraatbloed positief is gevonden, zijn hieronder weergegeven.

TABEL V.

Phagocytosereacties met verwarmd serum bij personen uit de controlegroep.

No.	Omschrijving	Phagocytose.
21 V	Verwarmd serum 21 met gewasschen cellen 33 en suspensie	—
30 V	„ „ 30 „ „ „ 36 „ „	—
45 V	„ „ 45 „ „ „ 45 „ „	—
101 V	„ „ 101 „ „ „ 101 „ „	±
102 V	„ „ 102 „ „ „ 102 „ „	—
104 V	„ „ 104 „ „ „ 104 „ „	—
146 V	„ „ 146 „ „ „ 146 „ „	—

Het blijkt dat in twee gevallen, 21 en 45, uitkomst van het onderzoek gelijk is aan die, welke bij het tweede onderzoek

met citraatbloed werd gevonden. In één geval (101) is de uitslag van de reactie twijfelachtig, terwijl in de vier overige gevallen de reactie negatief werd gevonden. *In deze vier gevallen bestaat dus een volledige tegenstelling met de resultaten, welke ook na herhaald onderzoek met citraatbloed, zijn gevonden. Op grond hiervan moet de specificiteit van de phagocytosereactie met citraatbloed in twijfel worden getrokken.*

Volledigheidshalve volgen nog de resultaten van het onderzoek van dezelfde personen indien versch serum voor de reactie werd gebruikt.

TABEL VI.

Phagocytosereacties met versch serum.

No.	Omschrijving	Phagocytose.
21 S	Versch serum 21 met gewasschen cellen 33 en suspensie	III
30 S	„ „ 30 „ „ „ 36 „ „	III
101 S	„ „ 101 „ „ „ 101 „ „	III
102 S	„ „ 102 „ „ „ 102 „ „	III
104 S	„ „ 104 „ „ „ 104 „ „	III

Het blijkt dus dat volgens deze methode opsoninen uitstekend kunnen worden aangetoond.

Ook kan nog een voorbeeld worden gegeven waarin wordt aangetoond dat met de toegepaste techniek het serum of plasma moeten worden beschouwd als drager van de factoren die de phagocytose beheerschen. Voegen we plasma, waarin tropinen zijn aangetoond bij gewasschen cellen van een persoon wiens bloed geen immuunstoffen bevat, dan zien we de cellen onder invloed van dit plasma phagocyteeren. Worden daarentegen gewasschen cellen afkomstig van bloed dat tropinen bevat, in serum gesuspendeerd waarin deze niet aanwezig zijn, dan vindt geen phagocytose plaats. Dit blijkt uit het resultaat van de twee hieronder vermelde gevallen.

TABEL VII.

Phagocytosereacties waarbij plasma en cellen verwisseld zijn.

No.	Omschrijving	Phagocytose.
147 A	Citraatplasma 147 (Bangpatient) met gewasschen cellen 16	III
16 A	„ 16 (contr. „) „ „ „ 147	—

Vraagt men zich nu af waarin de oorzaak van de uiteenloopende resultaten die met citraatbloed en geïnactiveerd serum gevonden worden gelegen kan zijn, dan dient men zich eerst te realiseeren welk verschil er bestaat in de wijze waarop in beide gevallen de werking van opsoninen wordt geëlimineerd. Door verwarmen van het serum zooals dit gedaan is, wordt het complement vernietigd. Uit de litteratuur is gebleken dat opsoninen zonder complement onwerkzaam zijn. Sommige schrijvers zijn zelfs de meening toegedaan dat opsoninen en complement als identiek moeten worden beschouwd.

Reeds lang is bekend dat zouten complement geheel of gedeeltelijk kunnen vernietigen. Ook met natriumcitraat is dit het geval. Het is echter de vraag of de concentratie van 0.8 % hiertoe in staat is. Van der Hoeden vond, indien hij 50 cm³ menschenbloed opving in 12 cc. 5 % oplossing van natriumcitraat nog een complementtiter van 1 : 64. De concentratie van het citraat bedroeg dan bijna 1 %. Verwacht mag worden dat ook bij een concentratie van 0.8 % eveneens nog een hoeveelheid complement van beteekenis aanwezig zal zijn. De uitkomsten van enkele complementtitraties in plasma van bloed, waarin de concentratie van het citraat 0.8 % was, en complementtitraties met serum als zoodanig, waren de volgende:

TABEL VIII.

Complementtitraties in serum, citraatplasma en liquoidplasma.

	1/10	1/20	1/40	1/80
I serum . . .	III	III	II	—
citr. plasma .	III	III	II	—
liq. plasma .	—	—	—	—
II serum . . .	III	I	I	—
citr. plasma .	III	I	I	—
liq. plasma .	—	—	—	—
III serum . . .	III	III	II	—
citr. plasma .	III	III	II	—
liq. plasma .	—	—	—	—
IV serum . . .	III	II	I	—
citr. plasma .	III	I	±	—
liq. plasma .	—	—	—	—
V serum . . .	III	II	I	—
citr. plasma .	III	II	I	—
liq. plasma .	—	—	—	—

Het blijkt dat nog wel degelijk complement aanwezig is in het citraatplasma, zelfs is een duidelijke vermindering in vergelijking met het serum niet merkbaar. De remmende werking van het natriumcitraat op de opsoninen moet derhalve in een andere richting worden gezocht. Waarschijnlijk zullen o.a. veranderingen van de Ph van het milieu, electrische lading, hier van beteekenis kunnen zijn. Er is niet veel over bekend en ook Huddleson laat er zich niet over uit. In ieder geval is de invloed van het citraat een andere dan die welke door verwarming van het serum wordt uitgeoefend. Theoretisch is de methode, om door vernietiging van het complement de activiteit der opsoninen uit te schakelen, de juiste.

Omdat de uitvoering van de phagocytosereactie met gewasschen cellen en verwarmd serum omslachtiger is dan de methode van Huddleson is naar een andere eenvoudige methode gezocht om het complement buiten werking te stellen.

In de juist genoemde publicatie bevestigde v. d. Hoeden, dat het liquoid naast de eigenschap het bloed vloeibaar te houden, eveneens de eigenschap bezit, zelfs in geringe concentratie het complement te vernietigen. Het leek ons derhalve uitermate geschikt om aan bloed, waarmede de phagocytosereactie gedaan moet worden, liquoid toe te voegen. Het bloed blijft dan vloeibaar en het complement is vernietigd. *Bij gebruik van liquoidbloed is dus de wijze waarop de activiteit van de opsoninen uitgeschakeld wordt in principe dezelfde als bij verwarming van het serum.*

Wel moet men er rekening mee houden dat liquoid een zout is en het derhalve mogelijk is dat het, behalve door vernietiging van het complement, ook nog op andere wijze het verloop van de reactie kan beïnvloeden. Dit overwegende is de concentratie van het liquoid gering genomen, kleiner dan waarvan v. d. Hoeden bij zijn onderzoek is uitgegaan. Tevens is, om zoo min mogelijk met invloed van zouten rekening te moeten houden, het liquoid als zoodanig aan het bloed toegevoegd en niet opgelost in een physiologische keukenzoutsolutie. Zooals reeds is medegedeeld werd aan 1 cc. bloed 1 mgr. liquoid toegevoegd, zoodat de concentratie 0.1 % bedroeg. Dat ook bij deze concentratie het complement na korten tijd niet meer aantoonbaar was, blijkt uit tabel VIII, waarin ook complementtitraties in het liquoidplasma zijn vermeld.

In tabel I op blz. 49 bleek, dat inderdaad in liquoidbloed van Bang-patiënten phagocytose was opgetreden in een even sterke mate als dit in het citraatbloed en het verwarmd plasma het geval was. Bij vele personen uit de contrôlegroep is de phagocytosereactie met liquoidbloed verricht. Eénmaal werd zij positief gevonden en éénmaal was de uitkomst twijfelachtig. Helaas bestond geen gelegenheid het bloed van degeen, bij wie de reactie positief was gevonden, nader te onderzoeken. In het geval waar de uitslag van de reactie met liquoidbloed als twijfelachtig moest worden gequalificeerd, werd bij onderzoek met verwarmd serum iets meer phagocytose gevonden, zoodat de uitkomst positief genoemd moest worden. In

beide gevallen was ook de reactie met citraatbloed positief. Bij alle andere gevallen in de contrôlereeks, waar de reactie met citraatbloed positief gevonden werd, was deze met liquoidbloed negatief. Ook de uitkomst van de reactie met verwarmd serum, voorzoover uitgevoerd, was bij deze personen negatief, waardoor de uitkomsten van de reacties met liquoidbloed en met verwarmd serum in de contrôleproef geheel met elkaar in overeenstemming zijn. *Door één en ander wordt de indruk gevestigd dat de phagocytosereactie, indien uitgevoerd met liquoidbloed meer specifiek is dan wanneer deze met citraatbloed wordt verricht.*

Om een indruk te krijgen, of de concentratie van het liquoid van grooten invloed is op de phagocytose, is verschillende malen, met eenzelfde bloedmonster, naast elkaar een reeks reacties verricht, waarbij de concentraties van het liquoid, 0.05 %, 0.1 %, 0.2 %, 0.4 % en 0.5 % gemaakt waren. Van een duidelijk merkbaar verschil in phagocytose kon niet gesproken worden. Het schijnt dus voor ons doel niet noodzakelijk te zijn om de concentratie van het liquoid nauwkeurig 0.1 % te maken. Neemt men dit aan, dan bestaat de mogelijkheid om de phagocytosereactie te verrichten zonder dat er venaepunctie gedaan moet worden. Men doet daartoe 1 mgr. liquoid in een buisje en laat dan ongeveer 1 cc. bloed uit de vingertop hierbij druppelen.

Enkele malen is het onderzoek op deze wijze naast de vroeger beschreven methode verricht. De uitkomsten waren behoorlijk met elkaar in overeenstemming, zoowel ingeval van positieve- als negatieve reacties.

Volledigheidshalve dient erop gewezen te worden dat het bij één der oud-patiënten (153) niet mogelijk was, venaepunctie te doen. Er is toen bloed uit de vinger genomen en de reactie is op de juist beschreven wijze verricht.

Bij personen die vroeger aan de ziekte van Bang geleden hebben.

Om een indruk te krijgen van de serologische reacties bij personen die in het verleden met abortusbacillen geïnfecteerd zijn geweest is een onderzoek ingesteld bij menschen, van wie bekend was dat zij een manifeste febris undulans hebben doorgemaakt. Er was gelegenheid 8 van deze vroegere Bang-patiënten te onderzoeken. De resultaten waren als volgt:

TABEL IX.

Vroegere patienten.

No.	Agglutinatie						Complementbinding						Phagocytose	
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	Citr. bloed	Liq. bloed
149	III	III	III	±	—	—	III	III	III	III	II	I	I	±
150	I	I	III	III	I	—	III	III	III	III	III	III	II	III
151	—	—	—	—	—	—	III	II	I	—	—	—	I	I
152	I	I	—	—	—		II	II	I	I	±	—	II	II
153	III	III	III	III	—		III	III	III	II	I	I		II
1288 I	I	III	I	I	—		III	III	II	II	I	—	I	±
1227 I	I	II	III	III	II	—	III	III	III	II	II	I	III	III
147 I	III	III	III	I	±	—	III	III	III	III	II	—	II	I

Vier van deze patiënten (No. 149; 1288; 1227 en 147) zijn tijdens hun ziekte in de Interne Kliniek verpleegd. Twee anderen waren dierenartsen, één der patiënten is in 1938 door Rombach beschreven. Voor zijn medewerking, waardoor het mogelijk was deze patiënt te onderzoeken zeg ik hem hartelijk dank. De 8e patiënt was in onze polikliniek in behandeling. De diagnose, ziekte van Bang, is destijds door zijn huisarts gesteld, waarna hij met vaccin behandeld is. (Nr. 152). In alle gevallen was de diagnose op goede gronden gesteld. Bij drie van de vier patiënten die destijds in de kliniek verpleegd zijn geweest, konden de bacillen uit het bloed gekweekt worden.

Het onderzoek leert ons dat langen tijd na de ziekte, de agglutinatie-, complementbindings- en phagocytosereactie positief gevonden worden. De mate waarin deze positief waren, was zeer verschillend. Zoo werd 5 jaar na de ziekte een

duidelijke positieve agglutinatiereactie gevonden. Bij een ander was deze reactie 6 jaar na de ziekte negatief en bij een derde persoon 1 jaar na de ziekte zwak positief. De complementbindingsreactie werd bij één persoon een jaar na de ziekte aanmerkelijk zwakker positief gevonden dan bij een ander na 5 jaar. De phagocytosereactie met liquoidbloed was bij iemand die na 6 jaar werd onderzocht, sterker positief dan bij een ander na 13 maanden. Indien men verschillende personen onderzoekt, maakt het de indruk dat er geen directe relatie bestaat van het tijdsverloop dat ligt tusschen het oogenblik van het onderzoek en de ziekte, met de titer waarin de reactie positief wordt gevonden. De uitkomsten van de reacties der gevallen, 1288; 1227 en 147, tijdens de ziekte, zijn in de tabel I op blz. 49 vermeld. Vergelijken wij deze met de uitkomsten die later zijn gevonden, dan blijkt vooral de agglutinatiereactie sterk in titer te zijn teruggeloopen, terwijl ook in 2 gevallen de phagocytosereactie aanmerkelijk minder sterk positief was geworden. Het verschil is het geringste bij de complementbindingsreactie.

Dat er zeker bij het individu een verband bestaat tusschen de tijd die na de ziekte verstreken is en de sterkte van de agglutinatiereactie, blijkt als we de ziektegeschiedenis van patiënt 149 nader bestudeeren. Door omstandigheden is vrijwel jaarlijks bij deze patiënt de agglutinatiereactie verricht. De volgende uitkomsten werden gevonden:

TABEL X.

Verloop van agglutinatiereactie in 5 jaren.

Jaar	Agglutinatie									Complementbinding					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6
1933	III	III	III	III	III	III	III	III	I	III	III	III	III	III	III
1934	II	III	III	III	III	I	—								
1936	II	III	III	I	—										
1937	III	III	II	I	—										
1938	III	III	±	—						III	III	III	III	II	I

De titer van de agglutinatiereactie was ieder jaar lager. Ook de complementbindingsreactie was na verloop van 5 jaren minder sterk positief geworden, doch niet in dezelfde mate als de agglutinatiereactie.

Het feit dat bij één der oud-patiënten een negatieve agglutinatiereactie werd gevonden, terwijl de complementbindings- en phagocytosereacties positief waren, is een aanwijzing dat men om vroegere infecties op te sporen, niet kan volstaan met uitsluitend de agglutinatiereactie te verrichten.

De uitkomsten van de phagocytosereacties met citraat- en liquoidbloed zijn vrijwel gelijk. In 2 gevallen bestonden verschillen: de reactie met citraatbloed was n.l. positief en die met liquoidbloed twijfelachtig. Dit verschil was echter uiterst klein, zoodat het de vraag is of er waarde aan gehecht mag worden.

Ook is bij enkele oud-patiënten de phagocytosereactie met verwarmd serum en gewasschen cellen verricht, terwijl deze ook tweemaal met verwarmd plasma is gedaan. De uitkomsten die met de vier verschillende methoden gevonden werden, zijn om een overzicht te krijgen nog eens naast elkaar vermeld.

TABEL XI.

Phagocytosereacties met verwarmd serum en plasma.

No.	Omschrijving	Verw. serum	Verw. plasma	Citr.	Liquoid
151 V	Verwarmd serum of plasma bij gewasschen cellen van 151 gevoegd	I	I	I	I
152	Verwarmd serum of plasma bij gewasschen cellen van 152 gevoegd	II	II	II	II
1288	Verwarmd serum bij gewasschen cellen van 1288 gevoegd	±		I	±
1227	Verwarmd serum bij gewasschen cellen van 1227 gevoegd	III		III	III

Er bestaat een volledige overeenkomst in de resultaten van de reacties met verwarmd serum en liquoidbloed. De verschillen van de reactie met verwarmd serum en citraatbloed waren

gering. Of de reactie met verwarmd serum of verwarmd plasma werd verricht bleek niet van invloed te zijn.

Nu een onderzoek is verricht bij lijders aan de ziekte van Bang en bij personen die deze ziekte vroeger hebben doorgemaakt, blijft nog een categorie menschen over die wel met abortusbacillen geïnfecteerd zijn geweest, maar nooit eenige ziekteverschijnselen tengevolge van deze infectie hebben waargenomen. In het vervolg zullen zij aangeduid worden als „latent" geïnfecteerde personen. Bij een aantal menschen die tot deze categorie gerekend moeten worden is eveneens een onderzoek naar de serologische reacties ingesteld. De moeilijkheid is echter om een groep samen te stellen van personen die zoo'n latente infectie hebben doorgemaakt. Wat moet men als criterium voor de aanwezigheid van een Bang-infectie in het verleden aannemen?

De Amerikaansche onderzoekers, waaronder ook Huddleson, maakten door middel van de huidreactie uit of iemand als geïnfecteerd beschouwd moest worden. Waar deze reactie door ons niet is verricht, moest een andere methode gevonden worden om dit uit te maken. Het beste leek het, de selectie van deze groep personen op dezelfde wijze als die van de contrôlegroep te doen plaats vinden. Derhalve zijn in deze groep die menschen ingedeeld, waarbij de agglutinatie- of complementbindingsreactie, eventueel beiden, positief werden gevonden. Er moet natuurlijk rekening mee gehouden worden dat bij deze wijze van selecteeren fouten gemaakt kunnen zijn omdat de mogelijkheid van miswijzingen van de agglutinatie- en complementbindingsreactie niet uitgesloten is, vooral waar geen rekening is gehouden met de titer waarin deze reacties positief werden gevonden. Nu zou men hieraan tegemoet kunnen komen, door, zooals vele onderzoekers doen, een zeker minimumtiter als eisch te stellen om een reactie positief te noemen. Dat ook hieraan bezwaren verbonden zijn leeren de uitkomsten van het onderzoek van de menschen die vroeger de ziekte van Bang hebben gehad.

In tabel XII zijn de uitkomsten van het onderzoek van een groep personen, op bovenbeschreven wijze samengesteld, vermeld.

TABEL XII.

Reacties bij „latent" geïnfecteerde personen.

No.	Diagnose	Agglutinatie					Complementbinding						Phagocyt.	
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	Citr. bloed	Liq. bloed
154	Typhus abdom. . .	±	I	I	±	—							—	
155	geen afw. (echtgen. pat. 1288) . . .	II	II	I	±	—							III	
156	diarrhoe	III	III	I	±	—							III	
157	nervositas	I	I	II	II	±	III	II	II	I	I	I	II	—
158	geen afw.	—	—	—	—	—	II	II	I	I	I	—	II	—
159	geen afw.	—	—	—	—	—	III	III	III	III	II	±	II	II
160	geen afw.	II	I	I	I	±	III	III	III	III	III	II	—	—
161	geen afw.	—	—	—	—	—	III	II	I	±	—	—	—	—
162	geen afw.	II	III	III	±	—	II	I	±	—	—	—	II	—
163	colitis	±	II	III	I	—	III	III	III	II	I	—	II	I
164	rugklachten . . .	—	—	—	—	—	III	II	I	—	—	—	II	±
165	bronchiectasen . .	—	—	—	—	—	II	—	—	—	—	—	I	—
166	longtuberculose . .	—	—	—	—	—	II	—	—	—	—	—	—	—
167	asthma bronchiale .	III	I	—	—	—	III	III	III	—	—	—	II	II
168	geen afw.	II	I	I	—	—	II	I	I	±	—	—	II	—
169	geen afw.	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	—	III	I
170	meningitis serosa .	I	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	II	—
171	geen afw.	—	—	—	—	—	III	III	III	III	II	I	II	II
172	geen afw.	—	—	—	—	—	III	II	I	I	±	—	II	II
173	geen afw.	—	—	—	—	—	III	III	—	—	—	—	II	II
174	geen afw.	—	—	—	—	—	II	I	I	±	—	—	II	I
175	geen afw.	—	—	—	—	—	III	III	II	I	±	—	II	I
176	geen afw.	—	—	—	—	—	III	III	II	—	—	—	II	—
177	geen afw.	III	III	II	I	±	III	III	II	II	I	I	II	—
178	rugklachten . . .	—	—	—	—	—	II	I	±	—	—	—	II	—
179	diabetes en hypertensie	±	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	II	—
180	geen afw.	—	—	—	—	—	III	III	III	III	II	I	—	—
181	koorts	III	III	III	III	II	III	III	III	II	II	I	III	—

De agglutinatiereactie is 28 maal verricht en werd 13 maal positief gevonden. De complementbindingsreactie was in 23 van de 25 gevallen positief, de phagocytosereactie met citraatbloed bij 23 van de 28 personen, die met liquoidbloed bij 10 van de 25 personen, waarbij deze reactie werd gedaan.

Alvorens uit deze cijfers conclusies te trekken dienen wij eerst de verhouding van de verschillende reacties t.o.v. elkaar na te gaan.

Vergelijken wij de uitkomsten van de agglutinatie- en complementbindingsreacties onderling, dan valt op dat de laatste veelvuldiger positief is gevonden dan de eerste en wel 14 van de 25 maal, dat beide reacties zijn gedaan. Omgekeerd werd de agglutinatiereactie tweemaal positief gevonden terwijl de complementbindingsreactie negatief was. (No. 170 en 179). In deze beide gevallen was de titer van de agglutinatiereactie zeer laag. Van opklaring van de bovenstaande vloeistof was in geen der buisjes sprake. De beteekenis van deze zwakke reacties is zeer twijfelachtig en, waar hier ook de complementbindingsreactie negatief was, is het de vraag, of bij deze twee personen een infectie met abortusbacillen mocht worden aangenomen. Waarschijnlijk behooren zij niet in de groep van personen met latente infecties ingedeeld te worden. De uitkomst van de complementbindingsreactie was eveneens éénmaal van dien aard dat men zich moest afvragen of er waarde aan gehecht mocht worden (No. 169). Vooral omdat ook de agglutinatiereactie negatief was. Tegen het opnemen van de gevallen 165 en 166 in de groep geïnfecteerde personen kunnen dezelfde bezwaren geopperd worden. Om de juist genoemde redenen zullen deze 5 gevallen buiten beschouwing worden gelaten, waardoor tevens eenige correctie, op de wijze waarop de selectie heeft plaats gevonden, is aangebracht.

De groep wordt dan door 23 personen gevormd. Elfmaal was de agglutinatiereactie positief en in alle 20 gevallen waarin de complementbindingsreactie is verricht, werd deze positief gevonden. Een op zichzelf staande duidelijk positieve agglutinatiereactie werd niet aangetroffen. De complementbindingsreactie was bij 12 personen, bij wie geen agglutinatie kon worden aangetoond, positief. Dit laatste is in overeenstemming met de waarneming van Thomsen, die bij een groep gezonde dierenartsen de complementbindingsrecatie veel vaker positief vond dan de agglutinatie. Het onderzoek leert ons

evenals dit bij de oud-patiënten reeds tot uiting kwam, dat men om latente Bang-infecties op te sporen, niet met de agglutinatiereactie alleen uitkomt, maar dat juist in deze omstandigheden de complementbindingsreactie van groote beteekenis is.

De phagocytosereactie met citraatbloed uitgevoerd was in 19 van de 23 gevallen positief. Viermaal werd deze negatief gevonden, en wel éénmaal in combinatie met een positieve agglutinatiereactie, tweemaal met een positieve complementbindingsreactie, terwijl éénmaal zoowel complementbindings- als agglutinatiereactie positief waren. Bij 10 personen bij wien geen agglutininen werden gevonden, konden dus wel tropinen worden aangetoond. Het blijkt dat de resultaten van de phagocytosereacties met citraat- en liquoidbloed onderling nogal uiteenloopen. *Ook met liquoidbloed werd de phagocytosereactie positief gevonden bij zeven personen, bij wie geen agglutininen konden worden aangetoond.*

Evenals dit bij de contrôlegroep is gedaan, werd ook hier een nader onderzoek ingesteld. Doordat de meeste personen poliklinisch zijn onderzocht was het slechts in een paar gevallen mogelijk, het onderzoek te herhalen. Bij drie menschen bestond hiertoe de gelegenheid. Het volgende resultaat werd verkregen:

TABEL XIII.

Herhaling onderzoek bij latente infecties.

No.	Omschrijving	Phagocytose		Uitkomsten vorig onderz.	
		Citr.	liq.	Citr.	liq.
157 I	Herh. onderzoek 157 op andere dag	II	—	II	—
128 I	„ „ 128 „ „ „	III	I	II	I
181 I	„ „ 181 „ „ „	III	—	III	—

Alle uitkomsten waren dezelfden als bij het eerste onderzoek.

Wil men nu uit de resultaten van het onderzoek naar de phagocytosereacties bij personen die een infectie hebben door-

gemaakt, een conclusie trekken, dan is de meest voor de hand liggende deze: *dat de phagocytosereactie met citraatbloed gevoeliger is dan die met liquoidbloed.* Deze conclusie kan door theoretische argumenten gesteund worden.

Het is bekend dat tropinen als zoodanig phagocytose teweeg brengen. Bij aanwezigheid van complement verloopt de reactie sneller en volgens sommigen intensiever dan wanneer geen complement aanwezig is. Waar nu in het citraatbloed dat voor de reactie werd gebruikt practisch evenveel complement aangetoond kon worden als in serum, en het gebruikte liquoidbloed geen complement meer bevatte, mag worden verwacht dat de reactie met citraatbloed eerder of sterker positief gevonden zal worden dan die met liquoidbloed.

Evenals bij de personen in de contrôleproef is geschied is ook thans weer in eenige gevallen de reactie met verwarmd serum of plasma verricht. De uitkomsten waren als volgt:

TABEL XIV.

Phagocytosereacties met verwarmd serum.

No.	Omschrijving	Phagocytose
162 V	Verwarmd plasma 162 met gewasschen cellen 74 en suspensie	—
158 V	„ „ 158 „ „ „ 158 „ „	—
163 V	„ „ 163 „ „ „ 163 „ „	I
164 V	„ serum 164 „ „ „ 164 „ „	—
165 V	„ „ 165 „ „ „ 164 „ „	—
167 V	„ „ 167 „ „ „ 110 „ „	II
171 V	„ „ 171 „ „ „ 171 „ „	I
172 V	„ „ 172 „ „ „ 172 „ „	I
173 V	„ „ 173 „ „ „ 173 „ „	I
174 V	„ „ 174 „ „ „ 174 „ „	I
175 V	„ „ 175 „ „ „ 175 „ „	I
176 V	„ „ 176 „ „ „ 176 „ „	—
178 V	„ „ 178 „ „ „ 178 „ „	—
181 V	„ „ 181 „ „ „ 181 „ „	—

Er blijkt wederom groote overeenkomst te bestaan met de

resultaten van de reacties die met liquoidbloed zijn gedaan. Behalve enkele gradueele verschillen, die met het oog op hetgeen over het tellen van de micro-organismen is gezegd, buiten beschouwing kunnen worden gelaten, werd éénmaal met verwarmd serum een negatieve uitkomst gevonden, waar deze met liquoidbloed positief was. Hierbij moet worden opgemerkt dat deze reactie ook bij een vorig onderzoek met liquoidbloed positief was gevonden. Eénmaal moest de reactie met verwarmd serum als twijfelachtig worden gequalificeerd, waar de uitkomst met liquoidbloed negatief was. Viermaal werd de reactie met verwarmd serum negatief gevonden, in overeenstemming met de uitkomsten die met liquoidbloed waren verkregen, terwijl in deze gevallen de reacties met citraatbloed positief waren. Ook de gradueele verschillen in uitkomst die tusschen het verwarmd serum en citraatbloed gevonden zijn worden buiten beschouwing gelaten.

De resultaten van de reactie met verwarmd serum vertoonen dus groote overeenkomst met die van de reactie met liquoidbloed. Op grond hiervan, zou men wederom geneigd zijn te zeggen, dat de reactie met citraatbloed waarschijnlijk niet geheel specifiek is, een zelfde oordeel als waartoe het onderzoek van de groep contrôlepersonen geleid heeft. Toch zijn hier de verhoudingen anders, want bij laatstgenoemde groep was het oordeel mede gebaseerd op het feit dat de complementbindings- en agglutinatiereacties negatief waren gevonden. Thans is dit echter niet het geval.

In verband met de uitkomsten van de agglutinatie- en complementbindingsreactie zou men zich kunnen afvragen of de phagocytosereactie met citraatbloed gevoeliger is dan die met verwarmd serum. Is het niet mogelijk dat in enkele gevallen waar bij geïnfecteerde personen de reactie met verwarmd serum negatief is gevonden en die met citraatbloed positief, er tropinen in geringe hoeveelheid aanwezig zijn geweest? Dezelfde theoretische argumenten, die bij de bespreking van de reactie met liquoidbloed naar voren zijn gebracht, gelden ook hier. Voorts bestaat ook nog de mogelijk-

heid dat bij verwarming van een serum een geringe hoeveelheid tropinen verloren gaan.

Vergelijken we nu nog het aantal afwijkingen van de reactie met citraatbloed met die met verwarmd serum in de groep van contrôlepersonen en in die der latent geïnfecteerde personen, dan zien we dat deze in de eerste groep 6 op de 145 en in de tweede 4 op de 13 bedraagt. Beschouwen we de heele tweede groep en veronderstellen we de reactie met liquoidbloed juist te zijn, dan bedraagt het aantal miswijzingen 8 op de 20 gevallen. Deze verhoudingen zijn niet met elkaar in overeenstemming. De gegevens leenen zich niet voor statistische bewerking, waardoor men met het trekken van conclusies zeer voorzichtig moet zijn. Toch vraagt men zich af of het aantal verondersteld onjuiste resultaten in de groep van latent geïnfecteerde personen niet erg groot is. Hierdoor komt wederom het denkbeeld dat de reactie met citraatbloed gevoeliger is dan die met de andere methoden, naar voren.

Zou men aannemen dat de reactie met citraatbloed niet geheel specifiek is, dan vraagt men zich af, hoe het komt dat bij enkele personen, ook bij herhaald onderzoek phagocytose gevonden werd. Als dit niet het gevolg is van de aanwezigheid van een geringe hoeveelheid tropinen, welke is dan de constante factor in het bloed die de oorzaak is dat in deze gevallen in citraatbloed toch phagocytose plaats vindt?

Uit het voorafgaande blijkt wel dat men niet gerechtigd is naar aanleiding van het verrichte onderzoek een beslissende uitspraak te doen ten gunste van één der reacties. Het aantal onbekende factoren is nog te groot en het materiaal te klein. Er zullen zeker nog problemen moeten worden opgelost alvorens men in staat is de phagocytosereactie met welke techniek ook uitgevoerd, op de juiste waarde te schatten.

Samenvattend zouden wij kunnen zeggen dat er redenen bestaan, om aan te nemen dat de phagocytosereactie met citraatbloed niet geheel specifiek is.

De reactie met verwarmd serum mag, op grond van

theoretische overwegingen wel specifiek genoemd worden.

Wegens de groote overeenkomst die bestaat tusschen de resultaten van de methode met verwarmd serum en van die met liquoidbloed, mag ook aan de uitkomsten van laatstgenoemde methode een groote mate van specificiteit worden toegekend.

Het is niet uitgesloten dat de phagocytosereactie met citraatbloed uitgevoerd, gevoeliger is dan die met liquoidbloed of verwarmd serum.

De waarde van de reactie voor de diagnostiek wordt echter minder hierdoor bepaald, dan wel, zooals Miss Evans naar aanleiding van de phagocytosereactie schrijft, door het aantal miswijzingen die de reactie geeft.

Om een indruk te geven hoe Huddleson en zijn medewerkers bij het onderzoek van een groep personen te werk gaan, moge het volgende voorbeeld dienen: In een hospitaal waar een endemie van Brucellosis heeft geheerscht tengevolge van het gebruik van geïnfecteerde melk, zijn 8124 personen onderzocht. Bij 845 of 10.3 % werd een positieve huidreactie gevonden. Bij 623 van deze 845 gevallen of 73.5 % werd een negatieve-, een geringe- of matig positieve phagocytosereactie aangetroffen. Bij 222 personen was deze sterk positief („marked"). De eerstgenoemden werden als „infected" beschouwd, de laatstgenoemden als „immune". Bij 705 personen met negatieve huidreactie is de agglutinatiereactie verricht. Slechts éénmaal was deze in een verdunning van 1 : 25 positief. Bij de 845 personen met positieve huidreactie, werd 111 maal een positieve agglutinatie gevonden (13.1 %). Van de 623 „geïnfecteerde" personen hadden er 5.3 % agglutininen in hun bloed en van de 222 „immunen" 78 of 39.6 %. In alle 845 gevallen was een bloedcultuur aangelegd. Viermaal gelukte het bacillen uit het bloed te isoleeren. Eénmaal was het brucella abortus en driemaal brucella suis.

De huidrecatie met brucellergen werd de meest gevoelige

reactie genoemd voor de diagnostiek van brucellosis. Is deze reactie negatief dan zou infectie kunnen worden uitgesloten. Bij een positieve reactie, zou het mogelijk zijn door middel van de phagocytosereactie uit te maken of infectie, of immuniteit bestaat. Een negatieve agglutinatiereactie zou een brucella-infectie niet uitsluiten.

Beschouwen we deze gegevens nader dan zien we, dat aan een negatieve- en een zwak of matig positieve phagocytosereactie dezelfde beteekenis werd toegeschreven. Slechts indien de reactie sterk positief is wordt er waarde aan gehecht. Het aantal positieve agglutinatiereacties is zeer gering in vergelijking met het aantal positieve huidreacties. Wel is dit het grootst bij de personen bij wie een sterke phagocytose wordt gevonden. Het is jammer dat er geen complementbindingsreacties zijn verricht. Zeker was dit aan het onderzoek ten goede gekomen.

Waarom Huddleson pas aan een sterk positieve phagocytosereactie beteekenis toekent, motiveert hij niet. Een bezwaar hiervan is o.a. dat daarbij het aantal bacillen in de cellen een overwegende rol gaat spelen. Waarom een matig maar duidelijk positieve reactie geen beteekenis heeft is niet begrijpelijk. Evenmin is aannemelijk gemaakt waarom men juist de phagocytosereactie zoo'n belangrijke beteekenis moet toekennen bij het vaststellen van immuniteit. Waarom is iemand immuun als de phagocytosereactie sterk positief is? Een dergelijk schema als Huddleson voor de phagocytosereactie heeft opgesteld, zou men met hetzelfde recht voor de complementbindingsreactie mogen samenstellen. Bij ons onderzoek van Bang-patiënten is reeds gebleken dat de indeeling van Huddleson niet geheel opgaat. *Het komt ons dan ook voor dat het geen aanbeveling verdient de interpretatie van de phagocytosereactie, zooals Huddleson die geeft, over te nemen.*

Het is juister de phagocytosereactie als een serologische reactie te beschouwen, evenals de agglutinatie- en de complementbindingsreacties dit zijn en aan de aanwezigheid van

tropinen niet de beteekenis toe te schrijven die Huddleson eraan geeft.

De toepassing van de phagocytosereactie is beter op te vatten als een methode die naast de agglutinatie- en de complementbindingsreactie voor de diagnostiek gebruikt kan worden. Een twijfelachtig positieve agglutinatiereactie kan beteekenis krijgen indien phagocytose gevonden wordt. Hetzelfde geldt voor de complementbindingsreactie. Als voorbeeld hiervan zou No. 165 in de groep van latent geïnfecteerde personen genoemd kunnen worden. Hier is de uitkomst van de complementbindingsreactie van dien aard dat men er zonder meer geen beteekenis aan mag hechten. In de positieve phagocytosereactie vindt deze steun.

Er moet echter opgemerkt worden, dat de agglutinatie- en complementbindingsreactie reeds jaren lang gebruikt worden terwijl het onderzoek met de phagocytosereactie eerst in een beginstadium verkeert, reden waarom men voorloopig goed zal doen voorzichtig te zijn met de interpretatie daarvan.

Er dient nog op gewezen te worden dat het materiaal van de Amerikaansche onderzoekers niet geheel identiek is met dat, hetwelk door ons is onderzocht. In Nederland komt, behoudens een enkel niet autochtoon geval van Maltakoorts, uitsluitend de infectie met abortusbacillen in aanmerking, terwijl men in Amerika zeer veel met infectie met brucella suis te doen heeft. Bij een vergelijking van de resultaten dient er rekening mee gehouden te worden dat eventueele verschillen hiervan het gevolg zouden kunnen zijn.

Onderzoek naar het voorkomen van tropinen bij dierenartsen en veterinaire studenten.

Zooals reeds vroeger is medegedeeld, zijn om kans te hebben personen met positieve reacties te vinden, bij voorkeur menschen onderzocht bij wie de mogelijkheid van een infectie met abortusbacillen groot is. Om deze reden is een onderzoek ingesteld bij dierenartsen en veterinaire studenten. Aan degenen die zoo bereidwillig zijn geweest hun medewerking voor dit onderzoek te verleenen, breng ik hierbij mijn dank.

De resultaten die bij genoemde personen gevonden werden, waren van dien aard, dat het de moeite loont, hier nadere aandacht aan te besteden. De uitkomsten van de reacties zijn reeds in de behandelde groepen van controle-personen en latent geïnfecteerden medegedeeld. De groepeering was toen gebaseerd op de uitslag van de serologische reacties.

Thans echter worden de onderzochte dierenartsen en veterinaire studenten op een andere wijze gegroepeerd en wel op grond van de waarschijnlijkheid van contact met smetstof. In de eerste groep zijn studenten ondergebracht die niet of weinig practisch hebben gewerkt, in de tweede groep studenten die als co-assistenten in de veterinaire kliniek werkzaam zijn, terwijl in de derde groep dierenartsen die praktijk uitoefenen zijn ondergebracht. Een van hen was eerst kortgeleden afgestudeerd, de anderen echter hadden reeds 7 jaar en langer praktijk gedaan. Bij geen van de in deze groep ondergebrachte personen, waren anamnestisch aanknoopingspunten te vinden voor een doorgemaakte ziekte van B a n g. De dierenartsen, die zijn onderzocht waarvan bekend was dat zij wel aan deze ziekte hadden geleden, zijn dan ook in deze groepen niet opgenomen.

Om te beginnen zullen thans de uitkomsten medegedeeld worden die bij een aantal derde- en vierde-jaars studenten zijn gevonden.

TABEL XV.

Serologische reacties bij veterinaire studenten.

No.	Omschrijving.	Aggl.	Compl. B.	Phagocytose	
				Citr. bloed	Liq. bloed
169	Veterinair student 3e jaar . . .	—	±	III	I
116	„ „ 3e „ . . .	—	—	—	—
117	„ „ 3e „ . . .	—	—	—	—
118	„ „ 3e „ . . .	—	—	—	—
119	„ „ 3e „ . . .	—	—	—	—
120	„ „ 3e „ . . .	—	—	—	—
121	„ „ 3e „ . . .	—	—	—	—
122	„ „ 3e „ . . .	—	—	—	—
123	„ „ 3e „ . . .	—	—	—	—
124	„ „ 3e „ . . .	—	—	—	—
125	„ „ 3e „ . . .	—	—	—	—
126	„ „ 3e „ . . .	—	—	—	—
129	„ „ 3e „ . . .	—	—	—	—
131	„ „ 3e „ . . .	—	—	—	—
132	„ „ 3e „ . . .	—	—	—	—
136	„ „ 3e „ . . .	—	—	—	—
137	„ „ 3e „ . . .	—	—	—	—
138	„ „ 3e „ . . .	—	—	—	—
127	„ „ 4e „ . . .	—	—	—	—
128	„ „ 4e „ . . .	—	—	—	—
130	„ „ 4e „ . . .	—	—	—	—
133	„ „ 4e „ . . .	—	—	—	—
134	„ „ 4e „ . . .	—	—	—	—
135	„ „ 4e „ . . .	—	—	—	—

Slechts bij één hunner werd een positieve phagocytose-reactie gevonden en een complementbindingsrecatie, die te zwak was om er waarde aan te hechten.

De resultaten die bij de co-assistenten werden gevonden, zijn eenigszins anders:

TABEL XVI.

Serologische reacties bij co-assistenten.

No.		Agglutinatie						Complementbinding						Phagocyt.	
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	Citr. bloed	Liq. bloed
177	Vet. stud. coass.	III	III	III	I	±	—	III	III	II	II	I	I	II	—
161	„ „ „	—	—	—	—	—	—	III	II	I	±	—	—	—	—
69	„ „ „	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
70	„ „ „	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
71	„ „ „	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
73	„ „ „	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
162	„ „ „	II	III	III	±	—	—	II	I	I	—	—	—	II	—
72	„ „ „	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Hier worden in 3 gevallen één of meer positieve reacties gevonden. Tweemaal is zoowel de agglutinatie- als complementbindingsreactie positief en bovendien de phagocytosereactie. Eenmaal was alleen de complementbindingsreactie positief. De phagocytosereactie in het liquoidbloed werd bij alle personen negatief gevonden.

De resultaten die bij de practiseerende dierenartsen werden gevonden volgen thans:

TABEL XVII.

Serologische reacties bij dierenartsen

No.		Agglutinatie					Complementbinding						Phagocyt.	
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	Citr. bloed	liq. bloed
158	Dierenarts	—	—	—	—	—	II	II	I	I	I	—	II	—
159	„	—	—	—	—	—	III	III	III	III	II	±	II	II
180	„	—	—	—	—	—	III	III	III	III	II	I	—	—
160	„	II	I	I	I	±	III	III	III	III	III	II	—	—
68	„	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
171	„	—	—	—	—	—	III	III	III	III	II	I	II	II
172	„	—	—	—	—	—	III	II	I	I	±	—	II	II

Op één uitzondering na zijn bij alle dierenartsen één of meer der reacties positief gevonden. Het valt op dat, terwijl de

complementbindingsreactie zesmaal positief was, dit met de agglutinatiereactie slechts éénmaal het geval is. De phagocytosereactie met citraatbloed was viermaal positief en die met liquoidbloed driemaal.

Thomsen vond dat bij dierenartsen in Denemarken de complementbindingsreactie zeer vaak positief gevonden werd. Hetzelfde komt ook hier tot uiting. Er kan nog aan worden toegevoegd dat ook de phagocytosereactie in meer gevallen positief werd gevonden dan de agglutinatiereactie. De groep personen is klein, zoodat met het trekken van conclusies voorzichtigheid in acht genomen moet worden, wat niet wegneemt, dat de resultaten wel zeer frappant zijn.

Wat reeds door Thomsen is waargenomen, en hetgeen ook thans tot uiting komt, is het feit dat het aantal positieve reacties bij de veterinaire studenten gering is, terwijl dit bij de praktizeerende dierenartsen daarentegen zeer groot is. Dit is te verklaren door de grootere besmettingskansen waaraan laatstgenoemden uit hoofde van hun beroep zijn blootgesteld.

De dierenarts bij wien negatieve reacties zijn gevonden was eerst kort voordat het onderzoek werd verricht, afgestudeerd. Een half jaar later bestond gelegenheid hem nogmaals te onderzoeken, hetgeen van belang was, vooral in verband met het feit dat hij zich speciaal met de verloskunde bezighoudt. Het resultaat van dit tweede onderzoek was als volgt:

No.		Agglutinatie								Complementbinding						Phagocytose	
		1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6		
68 I	Dierenarts 68 ½ jaar later	I	III	III	III	III	III	I	I	III	III	II	II	II	I	II	II

We zien dat in de loop van dit halve jaar alle reacties positief zijn geworden. Van ziekte is echter geen sprake geweest.

Het is nu zóó, dat bij alle zeven onderzochte dierenartsen positieve reacties zijn gevonden.

Ook uit een ander oogpunt zijn de resultaten van dit tweede onderzoek leerzaam. Niettegenstaande de infectie symptoomloos verloopen is, was de titer der reacties hooger dan deze soms bij patiënten wordt aangetroffen. Het is voor de klinicus belangrijk hiervan op de hoogte te zijn. Indien deze persoon ziek was geworden en de reactie's uit diagnostische overwegingen waren verricht, dan zou men licht geneigd zijn de diagnose febris undulans te stellen en mogelijk ten onrechte. Reeds vele onderzoekers hebben erop gewezen dat men met de beoordeeling van positieve serologische reacties bij personen die aan contact met abortusbacillen zijn blootgesteld, voorzichtig moet zijn. Dit wordt ook hier duidelijk gedemonstreerd. In dergelijke gevallen zal men zich voor het stellen van een diagnose vooral moeten laten leiden door de klinische verschijnselen.

Ook wij ondervonden deze moeilijkheden in de kliniek. Als voorbeeld kan een jonge man van 21 jaar gesteld worden die ziek was geworden en hooge koorts had. De huisarts rekening houdende met de mogelijkheid van typhus, liet het serum onderzoeken. De reactie van Widal was negatief, maar de agglutinatie met abortusbacillen bleek positief te zijn en onder de diagnose ziekte van Bang werd de patiënt in de kliniek opgenomen. De koorts was bij opname geweken. Noch het lichamelijke onderzoek, noch het bloedonderzoek leverde aanknoopingspunten op voor het stellen van de diagnose ziekte van Bang. De uitkomsten van de serologische reacties waren echter de volgende:

No.	Agglutinatie							Complementbinding					
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6
181	III	III	III	III	II	I	—	III	III	III	II	II	I

Zoowel de agglutinatie- als de complementbindingsreactie werden duidelijk positief gevonden. Deze resultaten geven

redenen genoeg om de diagnose, febris undulans, in overweging te nemen. Zooals reeds gezegd waren de klinische verschijnselen echter hiermede niet geheel in overeenstemming en evenmin het morphologisch bloedonderzoek. Er bestond geen leucopenie en geen relatieve lymphocytose.

Nu was het beroep van deze jongeman veehouder en hij vertelde meerdere malen bij verlossingen van koeien geholpen te hebben. De mogelijkheid van infectie is dus ruimschoots aanwezig geweest. Er moet rekening mee gehouden worden dat de positieve serologische reacties hiervan het gevolg kunnen zijn. Daarom mogen dezen in dit geval niet als doorslaggevend argument bij het stellen van de diagnose gebruikt worden. De moeilijkheid was dat er geen afwijkingen te vinden waren. Het is zeer goed mogelijk dat de koorts door een vulgaire infectie werd veroorzaakt. Zij ging immers gepaard met keelpijn en buikpijnen. Gedurende de 12 dagen dat de jongen in het ziekenhuis was, is de temperatuur normaal gebleven, terwijl hij geen klachten had. Acht dagen nadat het eerste serologische onderzoek had plaats gehad, is dit nogeens herhaald. De volgende uitkomsten werden daarbij gevonden.

No.	Agglutinatie							Complementbinding						Phagocytose	
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	Citr. bloed	Liq. bloed
181a	III	III	III	II	I	±	—	II	II	II	II	I	—	III	—

We zien dat de complementbindingsreactie die in dezelfde proefreeks werd verricht met die van het eerste serummonster, zwakker was geworden, terwijl de agglutinatiereactie niet sterker positief werd gevonden, eerder zwakker. Omdat de agglutinatiereactie op een andere dag met ander antigeen is verricht, is het de vraag of er waarde aan dit geringe verschil in titer gehecht mag worden. Was de koorts inderdaad afhankelijk geweest van een manifeste infectie met abortusbacillen dan hadden we wel kunnen verwachten dat de reacties

sterker positief zouden zijn geworden. Thans mogen we veronderstellen dat door een infectie van anderen aard koorts is opgetreden, waardoor zooals meer gezien wordt, de agglutinatie- en complementbindingsreacties, die waarschijnlijk ook vóór de ziekte reeds positief waren, in sterkte zijn toegenomen. Toen de temperatuur weer eenigen tijd normaal was, is de titer van de reactie weer teruggeloopen. Bij navragen bleek ook nog dat het bloed dat door de huisarts voor het verrichten van serologische reacties was opgestuurd, op de 5e ziektedag was afgenomen. Het is niet waarschijnlijk dat indien geen vroegere infectie had plaats gehad, onder deze omstandigheden reeds zulke sterke positieve reacties zouden worden gevonden. De diagnose ziekte van Bang is hier, op grond van de klinische verschijnselen verworpen, ondanks het feit dat sterk positieve serologische reacties waren gevonden.

Uit bovenstaand geval blijkt dat het vinden van positieve agglutinatie- en complementbindingsreacties aanleiding kunnen geven tot moeilijkheden in de diagnostiek, waarbij het zal kunnen voorkomen dat ten onrechte de diagnose ziekte van Bang gesteld wordt. Is men er echter van op de hoogte dat soms positieve serologische reacties bij personen die nooit aan febris undulans geleden hebben, worden gevonden, dan zal men deze vergissing minder spoedig begaan.

Wat betreft de phagocytosereactie zien we dat die met citraatbloed positief was en met liquoidbloed negatief. Het is dus mogelijk, hoewel niet zeker dat het serum een geringe hoeveelheid tropinen bevatte. Al nemen we echter aan dat deze aanwezig waren, dan zouden we, in verband met de klinische diagnose, hier toch geen beteekenis aan willen hechten.

SAMENVATTING EN CONCLUSIES.

Naar aanleiding van publicaties van Huddleson is een onderzoek ingesteld naar de waarde van de phagocytosereactie bij Brucella-infecties. De techniek van Huddleson om door toevoeging van natriumcitraat aan het bloed, de phagocytose, die tengevolge van de aanwezigheid van opsoninen in ieder serum optreedt, uit te schakelen, is zoo nauwkeurig mogelijk gevolgd.

Allereerst is de phagocytosereactie bij vijf lijders aan febris undulans verricht. Bij allen was de reactie sterk positief.

In de tweede plaats is de reactie verricht bij 145 personen die of gezond waren, of lijdende aan een andere ziekte dan febris undulans. Om de mogelijkheid van een vroegere infectie met Brucella, die al of niet tot optreden van klinische verschijnselen aanleiding heeft gegeven, op te sporen, is bij deze personen de agglutinatie- en de complementbindingsreactie verricht. De uitkomst van deze reacties was bij allen negatief. Bij tien hunner werd een positieve phagocytosereactie gevonden. Het was mogelijk bij zeven van hen het onderzoek te herhalen. Hierbij werd de reactie tweemaal negatief gevonden en vijfmaal wederom positief.

Teneinde na te gaan welke de beteekenis van deze positieve reacties was is vervolgens een nader onderzoek ingesteld.

Uit de litteratuur blijkt, dat de opsoninen die in een normaal serum voorkomen, thermolabiel zijn en complement noodig hebben om hun activiteit te kunnen ontplooien. Enkele schrijvers meenen zelfs, dat opsoninen en complement aan elkaar gelijk zijn.

De opsoninen in een immuunserum, ook wel tropinen ge-

noemd, zijn relatief thermostabiel en zij hebben voor het teweegbrengen van phagocytose geen complement noodig.

Wij vonden nu dat in het bloed, waarmede de phagocytosereactie werd verricht, vrijwel evenveel complement aanwezig was als in versch serum. De aanwezigheid van natriumcitraat in een concentratie van 0.8 % had blijkbaar geen invloed op het complementgehalte.

Om uit te maken of de phagocytose, in de gevallen waarin deze gevonden werd met de methodiek van Huddleson, werkelijk aan de aanwezigheid van tropinen moest worden toegeschreven, is bij zeven der genoemde personen de phagocytosereactie met geïnactiveerd serum verricht. Het resultaat was op één uitzondering na, negatief.

Omdat de reactie met verwarmd serum wat omslachtiger is dan die met citraatbloed, is aan het bloed liquoid toegevoegd in een concentratie van 0.1 %. Deze laatste stof heeft de eigenschap om reeds in geringe concentratie het bloed vloeibaar te houden en tevens het complement te vernietigen.

Het bleek, dat bij lijders aan de ziekte van Bang de phagocytose zoowel met liquoidbloed als met verwarmd serum positief was. Bij de niet geïnfecteerde personen werd de reactie met liquoidbloed slechts éénmaal zwak positief gevonden, terwijl éénmaal de uitkomst twijfelachtig was. Er bestond vrijwel volledige overeenkomst van de resultaten der reactie met liquoidbloed met die met verwarmd serum.

In de derde plaats is een groep van 8 personen die aan de ziekte van Bang geleden hadden, onderzocht. Zeven van hen hadden positieve agglutinatiereacties, terwijl allen een positieve complementbindingsreactie vertoonden. De phagocytosereactie was bij alle acht in meerdere of mindere mate positief, zoowel met citraat- als met liquoidbloed.

In de vierde plaats is een groep van personen samengesteld van wie mocht worden aangenomen dat zij met Brucella geïnfecteerd zijn geweest, zonder dat deze infectie aanleiding had gegeven tot het optreden van klinische verschijnselen. Een

infectie werd aangenomen op grond van een positieve agglutinatie- of complementbindingsreactie.

De phagocytosereactie met citraatbloed was in 19 van de 23 gevallen positief, die met liquoidbloed in negen.

Bij drie personen is de reactie met citraatbloed herhaald met dezelfde resultaten als bij het eerste onderzoek.

Veertienmaal is de reactie met verwarmd serum verricht. Er bleek vrijwel volledige overeenkomst te bestaan in de uitkomsten van de phagocytosereacties met liquoidbloed en die met verwarmd serum. De uitkomsten met deze laatste methode weken zevenmaal af van die der reactie met citraatbloed, in dien zin, dat de reactie met verwarmd serum negatief was en die met citraatbloed positief.

Voorts was bij de personen, die in deze groep zijn opgenomen, de complementbindingsreactie in alle gevallen positief, terwijl de agglutinatiereactie dit slechts 11 van de 23 maal was.

Tropinen konden zoowel in combinatie met agglutininen als met complementbindende antistoffen worden aangetoond.

Bij onderzoek van veterinaire studenten, die slechts weinig met vee in aanraking waren geweest, van co-assistenten in de klinieken en van practiseerende dierenartsen, werd een grooter aantal positieve agglutinatie-, complementbindings- en phagocytosereacties gevonden, naarmate de betroffen personen meer practijk hadden gedaan. Van de vijf en twintig studenten had er slechts één zwak positieve reacties, terwijl bij ieder van de zeven dierenartsen, die geen van allen aan de ziekte van Bang hadden geleden, één of meer reacties positief waren. In deze laatste groep was de complementbindingsreactie steeds positief, de agglutinatiereactie slechts in één geval, terwijl de phagocytosereactie driemaal positief was.

Tenslotte moet worden opgemerkt dat de huidreactie niet is verricht, omdat wij de enkele malen dat deze in de kliniek is gedaan, heftige algemeene verschijnselen zagen optreden in aansluiting aan de intracutane injectie van brucellergen.

De verrichte onderzoekingen hebben tot de volgende conclusies geleid:

1. De phagocytose-reactie met citraatbloed is niet geheel specifiek.
2. De phagocytose-reactie met liquoidbloed mag specifiek genoemd worden.
3. De phagocytose-reactie met citraatbloed is gevoeliger dan die met liquoidbloed en met verwarmd serum.
4. Uit een positieve phagocytose-reactie mag niet worden afgeleid, dat de onderzochte persoon immuun is.
5. De phagocytose-reactie heeft waarde als diagnostische onderzoekingsmethode, naast de agglutinatie- en de complementbindingsreactie.
   Een vergelijking van de beteekenis der juist genoemde reacties met de phagocytose-reactie laat het onderzoek niet toe.

SUMMARY.

Referring to publications of Huddleson an investigation has been set up to ascertain the value of the opsono-cytophagic test in cases of Brucella-infections.

The technique of Huddleson to eliminate the phagocytosis, which occurs in each serum, by adding a solution of sodium citrate to the blood, has been followed as closely as possible.

First of all the test was performed with five patients with febris undulans. With all of them a positive reaction was found.

Secondly the test was carried out with 145 persons who were either healthy or suffering from disease other than Brucellosis.

To trace the possibility of previous infection with Brucella whether or not accompanied by clinical symptoms, the agglutination- and complementfixation-tests were executed. The result of all these reactions was negative. With 10 of them a positive opsono-cytophagic test was found. With seven it was possible to repeat the examination. These latter showed two negative and again five positive results. To find out which was the signification of these positive reactions closer investigation was undertaken.

From the literature it appears that the opsonins in a normal serum are thermolabile and need complement to develop their activity. Some authors are even of opinion that opsonins and complement are identical.

The opsonins in an immune-serum, also called bacterio-

tropins, are relatively thermostabile and need no complement to bring about phagocytosis. We have found about as much complement in the blood with which the phagocytosis test was performed, as in fresh serum. The presence of sodium citrate in a concentration of 0.8 % had apparently no influence on the complement content. In order to find out whether in the cases in which the reaction was found by means of the method of Huddleson the phagocytosis was really due to the presence of bacterio-tropines, the phagocytosis test was performed with seven persons with inactivated serum; with one exception the results were negative.

As the reaction with heated serum is more cumbrous than that with citrated blood, liquoid in a concentration of 0.1 % was added to the blood. Liquoid in a small concentration has the quality to prevent clotting and also to annul the complement.

It appeared that in cases of Brucellosis the cytophagic tests both with liquoid blood and heated serum were positive.

With non-infected persons the reaction with liquoid blood was found only once to be positive, whereas once the result was dubious.

An almost complete agreement of the results of the reactions with liquoid blood and with inactivated serum was found.

Thirdly a group of 8 persons which had suffered from Brucellosis was examined. With 7 of them the agglutination test turned out positive, whereas all of them showed complement-fixation.

In all cases the opsono-cytophagic reaction with citrated- as well as with liquoid blood was more of less positive.

Fourthly a group was composed of persons which were supposed to have been infected with Brucella not followed by clinical symptoms. An infection was supposed on the ground of a positive agglutination- or complement-fixation-test.

The cytophagic test with citrated blood was positive in 19 of the 23 cases, that with liquoid blood in 9 cases.

Fourteen times the reaction was performed with heated

serum. An almost complete agreement proved to exist between the cytophagic reactions with liquoid blood and those with inactivated blood. The results with the latter method differed 7 times from those with citrated blood, in a way that the reactions with heated serum were negative and those with citrated blood positive.

Furthermore the complement-fixation-test with the persons of this group was positive in all cases, whereas the agglutination was positive only in 11 of the 23 cases.

Bacteriotropins could be proved in combination with agglutinins as well as with complement-fixing-amboceptors.

Examining veterinary students that had only little contact with cattle, and other students that had worked in the clinics, and also veterinary surgeons, the amount of positive reactions was found to be increasing with the greater practice of the persons involved. Of the 25 students only one showed positive reactions, whereas with each surgeon one or more reactions were positive. In this last group the complement fixation remained permanently present, the agglutination only with one of them, whereas the ph. test was positive with three.

Finally it must be pointed out that the cutaneous reaction was not performed, because in connection with the intracutaneous injection of brucellergen we had observed severe local and systemic reactions.

Conclusions:

The investigation has led to the following conclusions:

1. The cytophagic test with citrated blood is not entirely specific.
2. The cytophagic test with liquoid blood may be called a specific one.
3. The cytophagic test with citrated blood is more sensitive than those with liquoid blood and heated serum.

4. Immunity may not be deducted from a positive cytophagic test.
5. The test has value as a diagnostical method besides the agglutination and the complement fixation test. The investigation does not allow a comparison of the importance of the two last-mentioned reactions with the cytophagic reaction.

TABEL XVIII.

Hieronder volgen eenige uitkomsten door tellen van het aantal bacillen in de leucocyten, op de wijze zooals Huddleson dit aangeeft, gevonden. Tevens is vermeld de beoordeeling zooals deze in de verschillende tabellen door teekens is voorgesteld.

																									Beoordeeling.
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—
0	0	1	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	2	1	3	0	2	0	1	0	1	0	2	1	—
0	0	10	5	1	0	0	0	0	3	0	0	2	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	7	0	—
0	1	0	0	0	3	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	11	9	15	10	±
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	20	0	9	0	±
0	0	0	0	2	3	0	10	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	15	0	0	0	0	±
14	2	10	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	+	0	0	10	0	0	I
9	3	2	6	13	12	8	16	10	7	7	3	3	0	0	4	8	4	9	13	4	9	3	20	7	I
0	7	0	5	15	11	13	14	5	4	0	12	9	0	15	2	0	7	5	3	20	0	5	15	7	I
0	+	+	0	24	+	0	0	0	0	+	0	0	15	+	0	0	0	8	0	+	0	0	0	0	I
0	0	1	22	0	0	0	1	12	0	0	0	0	0	9	0	10	3	0	0	15	0	6	0	0	I
0	0	18	3	+	+	0	0	17	0	9	0	0	0	6	0	7	4	6	0	15	20	0	9	1	I
7	+	8	0	0	0	0	0	0	0	+	7	0	0	0	0	+	5	0	0	5	11	0	3	8	I
2	12	10	2	5	0	20	10	0	+	11	2	+	0	15	2	0	1	11	+	10	30	+	15	30	II
3	10	2	0	20	+	8	6	5	8	15	0	+	+	20	7	22	8	+	+	+	0	4	+	10	II
+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	20	+	+	0	+	5	0	+	0	+	0	10	II
+	15	20	18	17	22	+	+	0	14	3	12	+	13	24	3	+	+	11	15	10	9	+	15	6	II
20	2	0	22	+	0	2	28	0	5	10	1	8	0	13	15	11	30	28	10	+	12	7	+	12	II
35	25	36	+	25	0	35	+	30	+	36	+	+	+	+	34	35	30	+	24	+	35	35	+	+	III
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	III
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	30	2	+	+	+	+	+	30	+	+	30	+	+	+	+	III
+	+	+	+	+	+	+	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	25	+	+	+	+	+	+	+	III
+	+	+	+	+	+	+	+	35	+	+	+	+	+	+	+	35	+	+	30	+	+	+	+	+	III

0 is geen phagocytose.
+ is zeer sterke phagocytose, waarbij tellen onmogelijk was.

LITTERATUUR

Bail, O. und Rubritius, H. Veränderungen von Bakterien im Tierkörper. Centralblatt für Bakt. 43, 1907.

Beek, A. Brucella-infecties bij slagers. Acad. proefschrift 1933, Utrecht.

Berenz, H. Welchen Wert haben die serologischen Untersuchungsmethoden bei Abortus infectiosus Bang. Diss. Leipzig 1938.

Bordet, J. Les leucocytes et les proprétés actives du serum chez les les vaccinés. Annales de l'institut Pasteur, 1895, IX.

Broers, C. W. Opsoninen. Ned. Tijdschrift voor Geneesk. IIA, 1907.

Broom, J. C. and Brown, H. C. Observations upon electric charge in certain bacteriological problems. The British medical journ. of experimental path. 10, 1929.

——— Further observations upon electric charge in its relation to haemolysis and phagocytosis. The British med. journ. of experimental path. 11, 1930.

Buchner, H. Immunität und Immunisierung. Münchener med. Wochenschr. 2, 1889; 3, 1889.

Bulloch, W. and Atkin, E. E. Experiments on the nature of the opsonic action of the bloodserum. Proc. of the Royal soc. of London. 1905, 74.

Bulloch, W. and Western, G. F. The specifity of the opsonic substances in the bloodserum. Proc. of the Royal Soc. of London. 1906, 77.

Daen, G. An experimental inquiry into the nature of the substance in serum which influences phagocytosis. Proc. of the Royal Soc. of London. 1905, vol. 76.

——— Discussion in phagocytosis. The British Medical Journal. II, 1907.

Dalrymple—Champneys, W. Undulant fever with special reference to animal sources of infection and the possibility of its prevalence in England and Wales. Reports on public health and medical subjects. 1929, 56.

Denijs, J. et Leclef, J. Sur le mecanisme de l'immunité. La cellule. 1895, 11.

Erwin, C. E. and Hunt, H. F. The diagnosis and treatment of undulant fever. J.A.M.A. 109, 1937.

Evans, Alice E. Studies on chronic brucellosis. Public Health reports, 1937, vol. 52, No. 41.

Evans, Alice E., Robinson, F. H. and Baumgartner. Studies on chronic brucellosis. Public Health reports. 1938, vol. 53, No. 34.

Fitch, C. P., Donham, C. R., Bishop, Lucille, M. and Boyd, W. L. Studies of the test tube agglutinationtest for the diagnosis Bang's disease. University of Minnesota; Agriculture exper. station. Techn. Bull. 73, 1930. 77, 1931.

Gabritschewsky, G. Du rôle des leucocytes dans l'infection diphthérique. Annales de l'inst. Pasteur, 1894, VII.

Gould, S. E. and Huddleson, I. Forest. Diagnostic methods in undulant fever. (Brucellosis) Journal of the Amer. Med. Association, 109, II, 1937.

Grunke, W. Die Phagocytose bei akuten Infektionskrankheiten und durch parenteralen Eiweisszufuhr erzeugter Fieberzustände. Zeitschr. für klinische Medizin, 1936.

Hamburger, H. J. Phagocytose. Ned. Tijdschr. voor Geneesk. II B, 1907.

Hektoen, L. and Ruediger, G. F. Studies in phagocytosis. The journal of infections diseases. II, 1905.

Van der Hoeden, J. De complementbindingsreactie bij gonorrhoe. Verslagen en mededeelingen betreffende de volksgezondheid. 1927.

——— Over brucella infecties. Ned. Tijdschr. voor Geneesk. 1928, IV.

——— Brucella infectie bij een zoogende vrouw. Ned. Tijdschr. voor Geneesk. 1934, I.

Huddleson, I. Forest. Brucella infections in animals en men. The Commonwealth Fund. New York. 1934.

——— Brucellosis. Central brucella station. 1938.

Huddleson, I. Forest, Johnson, H. W. and Meyer, A. B. A method measuring the opsono-cytophagic power of the blood of cattle for Brucella. Technical Bulletin No. 149, Mei, 1936.

Jordan, O. E. and Broom, J. Mc. The occurrence of brucella agglutinins in cattle in the Panama landzone. Journal of the Amer. Vet. Med. Ass., 1932. LXXXI.

Keller, Alvin E., Crit Pharris and Gaub, W. H. Diagnosis of undulant fever. J.A.M.A. 1936, 107, II.

Kramer. Ned. Tijdschr. voor Geneesk. 1936, II.

Kresz, H. Von. Ueber Phagocytose. Münch. Med. Wochenschr. II, 1932.

Kristensen, M. und Holm, P. Bakteriologische und statistische Untersuchungen über Febris undulans in Danemark. Centr. Blatt für Bakt. Parasitenk. und inf. Krankh. 1929, 112.

Krocke, Ray R. Opsono-cytophagic Test. A textbook of clinical pathology, 1938.

Langen, C. D. de en Lichtenstein, A. Leerboek der Tropische Geneeskunde.

Leishmann, W. B. Note on a Method of quantitatively estimating the phagocytic power of the leucocytes of the blood. The British medical journal. 1, 1902.

Leitner, St. J. en Gugelot, P. G. Nieuwe waarnemingen en onderzoekingen op het gebied van de familiaire kernafwijkingen der leucocyten. Ned. Tijdschr. voor Geneesk. III, 1938.

Levaditi, C. et Inmann. Contributions a l'étude des opsonines. Pouvoir opsonisant des sérums normaux. C. R. Soc. de Biologie, 62, 1907.

——— Contributions à l'étude des opsonines. Opsonines des sérums spécifiques. C. R. Soc. de Biologie, 62, 1907.

——— Contributions à l'étude des opsonines. Méchanisme de l'opsonisation. C. R. Soc. de Biologie, 62, 1907.

——— Contributions à l'étude des opsonines. Propriétés opsonisantes des sérums normaux. C. R. Soc. de Biologie, 62, 1907.

Levaditi, C. et Koesler, K. Contributions à l'étude des opsonines normales. Anti-complements et anti-opsonines. C. R. Soc. de Biologie, 62, 1907.

Löffler, W. Febris undulans Bang des Menschen. Würzburger Abh. aus dem Gesamtgebiete der Medizin, 1930, 26.

Löhlein, M. Sur la phagocytose „in vitro" des microbes pathogènes. Annales de l'inst. Pasteur, 29, 1905.

——— Observations sur la phagocytose „in vitro". Annales de l'inst. Pasteur, 1906.

Lubarsch, O. Ueber Phagocytose und Phagocyten. Klin. Wochenschr. 1925, 2.

Metchnikoff, E. Ueber eine Sprosspilzkrankheid der Daphniën. Archiv. für path. Anatomie und Physiol. und für Klin. Med. Band 96, 1884.

——— Ueber die Beziehungen der Phagocytose zu Milzbrand Bacillen. Virchow's Archiv. 1884, Band 97.

——— Etudes sur l'immunité. Annales de l'institut Pasteur, 1889, III.

——— L'état actuel de la question de l'immunité. Annales de l'inst. Pasteur, 1894, VIII.

Meyer, K. F. and Geiger, J. C. The increasing importance of brucelliasis as an occupational hazard. Journal of the Amer. Vet. Med. Ass. 1934, LXXXVI.

Mudd, Baldwin, Lacké, Morton, Mc. Cutchens and Strumia. On the mechanism of opsonin and bacterotropin action. Journal of experimental med. 49, 1929.

Muir, R. and Martin, W. B. M. On the combining properties of the opsonin of an immune serum. Proc. of the Royal Soc. of London, 1907, 79.

Neufeld und Rimpau. Ueber die Antikörper der Streptokokken und Pneumokokken Immunserums. Deutsche Med. Wochenschr. 1904, 40.

Platanow, G. Mikromethode zur Ermittlung der Phagocytären Leukocytenfähigkeit. Klin. Wochenschr. I, 1932.

Porges, O. Ueber Opsoninen für Stärke. Zeitschr. für Immunitätsforschung. 2, 1909.

Poston, Mary. Studies in chronic brucellosis. Public health reports. 1938, vol. 53, I.

Raoul, M. et Kourilsky, Mme. Simone. Brucellose à incubation prolongée. Bulletins et Mém. de la Soc. des Hopitaux de Paris, 1938, 19.

Robertson and Sia. A method for demonstrating the growth inhabitory and bactericidal action of normal serum leucocytes mixtures. The Journal of experimental med. 39, 1924.

——— Studies on pneumococces growth inhibition. The journal of experimental medicine, 40, 1924.

Rombach, K. A. Brucella-infectie (Bang) bij een lijder aan chronische nephritis. Ned. Tijdschr. voor Geneesk. 1938, IV.

Rosenthal, W. Ueber die Bedingungen der Phagocytose. Centralblatt für Bakteriologie, 42, 1909.

Savtschenko, J. G. Du rôle des immunisines (fixateurs) dans la phagocytose. Annales de l'inst. Pasteur, 16, 1902.

Sleeswijk, J. G. Ueber den Bau der Opsonine. Centr. Blatt für Bakter., Parasitenk. und Inf. Krankh. 1908, 46.

——— Over de oorzaken der phagocytose. Acad. proefschrift, Amsterdam, 1908.

Smillie, E. W., Little, R. R. and Florence, L. An interpretation of the agglutination reaction to bacillus abortus in 75 cases of bovine abortion, bacteriologically controled. Journ. exp. Med. 1919, 30.

Snapper, I. Over reticulo-endotheliose. Ned. Tijdschr. voor Geneesk. II, 1938.

Spengler, Gustav. Die Bangsche Krankheit beim Menschen. Urban und Schwarzenberg. Berlin, 1929.

Thomson, Axel. Des proportions de la réaction sérologique de certains groupes professionnels vis à vis du bacillus abortus. Den Kgl. veteriaer O. G. Landb. skole, 1930.

——— La maladie de Bang chez les vétérinaires en Denemark. Revue Générale de médicine vétérinaire, 1932.

Topley and Wilson. The principles of bacteriology and immunity, 1936.

Veitch, R. Mc. Leod. A simple and rapid method of estimating the phagocytic power of different bloods. Journal of pathology and bacteriology, 1908, 12.

Wakelin, Barrat, W. O. The phagocytosis of red blood cells. Proc. Royal Soc. of London, 74, 1905.

——— Die quantitative Bestimmung der Erythrocyten-opsoninen. Centralblatt für Bacteriologie, 43, 1907.

Ward and Enders, J. F. An analysis of the opsonic and tropic action of normal and immune sera. The journal of experimental med. 57, 1933.

Wigodtchikoff, G. et Mme. Manouillova. Sur la phagocytose. Annales de l'inst. Pasteur, 44, 1930.

Wigodtchikoff, G. La phagocytose; manifestations physico-chimiques. Annales de l'inst. Pasteur, 44, 1930.

Wright, A. E. On the measurement of the bactericidal power of small samples of blood under aërobic and anaërobic conditions and on the comparative bactericidal effect of human blood drawn of and tested under these contrasted conditions. Proc. of the Royal Soc. of London, 71, 1903.

Wright, A. E., Douglas, S. B., Burden, J. and Sanderson. An experimental investigation of the role of the blood fluids in

connection with phagocytosis. Proc. of the Royal Soc. of London, 72, 1903.

Wright, A. E., Douglas, S. B. and Burden, J. Further observations in the role of the blood fluids in connection with phagocytosis. Proc. of the Royal Soc. of London, 73, 1904.

Wright, A. E., Paddington, W. and Douglas, S. B. On the action exerted upon the staphylococcus pyogenes by human fluids, and on the elaboration of protective elements in the human organism in response to inoculations of a staphylococcus vaccin. Prof. of the Royal Soc. of London, 74, 1904.

Wright, A. E., Douglas, S. R. On the action exerted upon the tubercle bacillus by human blood fluids and on the elaboration of protective elements in the human organism. in response to inoculation of a tubercle vaccin. Proc. of the Royal Soc. of London, 73, 1904.

Wright, A. E. and Reid, S. T. On the possibilities of determing the presence of absence of tubercular infection by the examination of a patient's blood and tissue fluids. Proc. of the Royal Soc. of London, 77, 1906.

——— On the spontaneous phagocytosis and on phagocytosis which is obtained with the heated serum of patients who have responded to tubercular infection or as the case may be to the inoculation of tubercle vaccin. Proc. of the Royal Soc. of London, 77, 1906.

STELLINGEN

I.

Ook vóór 1929 kwam in de Noordelijke landen van Europa brucellosis bij den mensch voor.

II.

Bij de behandeling van ernstige diabetespatiënten make men niet als regel gebruik van protamine-zink-insuline.

III.

Bij gladde amputatiewonden van de eindleden der vingers verdient een primaire, vrije huidplastiek aanbeveling.

IV.

Bij de behandeling van huidcarcinomen dient aan de Röntgencaustiek de eerste plaats ingeruimd te worden.

V.

Bij de behandeling van het portiocarcinoom met radium verdient het in vele gevallen aanbeveling de gouden tubes, die het radium bevatten, door middel van een boorkanaal in de tumor te leggen.

VI.

Het vermogen van leucotaxine (Menkin) om de doorlaatbaarheid van de capillairen te verhoogen, berust op de aanwezigheid van histamine.

VII.

Wanneer een arachnoiditis van de chiasmastreek hoogstwaarschijnlijk is en de gezichtsscherpte vermindert of de gezichtsveldstoornissen toenemen, dan is operatieve exploratie van het chiasma aangewezen.

VIII.

Het komt voor, dat een bestaand ulcus duodeni of ventriculi niet door inspectie of palpatie bij geopend abdomen is te vinden, maar wel bij Röntgenologisch onderzoek.

IX.

De organisatie van een „Diabetes-nazorg" heeft niet alleen medische, maar ook sociaal-economische voordeelen.
