

(Uit het *pharmakotherapeutisch laborat. der Universit. van Amsterdam.*

Directeur: Prof. E. LAQUEUR).

OVER DE BACTERICIDIE VAN BLOED EN SERUM TEGENOVER STAPHYLOCOKKEN,

DOOR

L. K. WOLFF, *oogarts-bacterioloog te Amsterdam.*

Reeds eeuwenlang zijn de beoefenaars der wetenschappelijke geneeskunde in twee kampen verdeeld, dat der solidair- en dat der humoraal-pathologen, naarmate zij het essentiële der ziekelijke toestanden zochten in verandering der weefsels of in die der vochten. De cellulairpathologie van VIRCHOW was in het wezen der zaak een solidairpathologie, maar ook na hem bleven de twee richtingen in de geneeskunde voortbestaan. De strijd tusschen METSCHNIKOFF, die de oorzaak der immuniteit zocht in de phagocyten, en EHRLICH, die haar zocht in de eigenschappen van het bloed, is er weer een geweest tusschen een voorstander der cellulair (solidair) en een der humoraalpathologie.

Met de ontdekking van de antitoxinen, stoffen die in staat zijn in vitro en in vivo bepaalde bacterievergiften (diphtherie, tetanus, enz.) ongiftig te maken, kreeg de humoraalpathologie een belangrijken voorsprong op de cellulairpathologie. En het is niet te verwonderen, dat men zich heel spoedig na deze ontdekking de vraag voorlegde, of bij de andere bacterieziekten, waarbij geen echte toxinen aangetoond waren en waarbij men van endotoxinen sprak, toch niet overeenkomstige processen zich in het lichaam afspeelden. Inderdaad konden spoedig in het serum van genezen patiënten aan typhus, cholera, enz. en in dat van met bacteriën opzettelijk besmette dieren allerlei zoogenaamde „tegenstoffen” worden aangetoond. Het lag voor de hand aan te nemen, dat ook bij deze ziekten de strijd tegen de bacteriën in het bloed met behulp van deze tegenstoffen werd gestreden. Achteraf beschouwd steunde deze slotsom niet op heel beste grondslagen. Maar men was al tevreden met enkele proefnemingen, die in deze richting wezen, en jarenlang hebben wij in de overtuiging geleefd, dat de agglutininen, precipitinen, complementbindende stoffen, opsoninen, bacteriolysinen enz. inderdaad de oorzaak waren van de verworven immuniteit en niet bijkomstige verschijnselen, meer van belang voor de diagnose dan wel voor de immuniteit zelve.

Wij zijn thans weer op een keerpunt gekomen in de ontwikkeling der immuniteitsleer; wij hebben leeren inzien, dat onze besluiten te haastig zijn geweest en dat bij de ziekten, die veroorzaakt worden door bacteriën, welke geen echte toxinen uitscheiden, de oorzaak der verworven immuniteit in hoofdzaak moet gezocht worden in de cellen en weefsels, niet in de vochten. Zonder te lang op dit punt in te gaan, kan ik twee argumenten noemen, die wel heel sterk in

deze richting spreken. In de eerste plaats dan zou het verwonderlijk zijn, als het mechanisme van de aangeboren immuniteit zoo geheel anders dan dat der verworven immuniteit zou zijn. Bij de aangeboren immuniteit vindt men immers ongeveer nooit antistoffen, niettegenstaande de afweerkrachten dikwijls nog veel belangrijker zijn dan bij de verworven onvatbaarheid. In de tweede plaats heeft men talrijke gevallen gevonden (BESREDKA), waarbij ondanks aanwezigheid van tegenstoffen geen immuniteit aanwezig was, en omgekeerd gevallen, waarbij een behoorlijke verworven onvatbaarheid gepaard ging met een afwezig zijn van tegenstoffen in het bloed-serum.

Op welke wijze de onvatbaarheid van de weefsels tegen bepaalde bacteriën tot stand komt, is tot nu toe niet bekend; men kan ze zelfs niet eens meten, tenzij men proeven neemt in vivo, maar hierbij is het heel moeilijk om iets over het nadere mechanisme der immuniteit te weten te komen.

Het volgende onderzoek, betreffende de verworven immuniteit van het bloed van konijnen tegen staphylocokken, is bedoeld om in dit vraagstuk eenig licht te doen schijnen. Allereerst moet ik mij verdedigen tegen hen, die zouden meenen, dat ik inconsequent ben geweest door weer mijn toevlucht te nemen tot het bloed in plaats van tot de weefsels. Immers het bloed bevat ook levende cellen. Maar omdat deze in los verband zijn, kunnen wij er veel beter mee proeven nemen dan met vaste weefsels; en al geef ik aanstonds toe, dat men uit het vermogen van het bloed om bacteriën al of niet te vernietigen niet mag besluiten tot de immuniteitsverhoudingen van het geheele dier, eenig inzicht kan hierdoor toch wel verkregen worden in het mechanisme dier immuniteit.

Vóórdat ik de uitkomsten van mijn onderzoek medeel, moet ik echter iets vertellen over de methode om de immuniteit van het bloed vast te stellen en te meten. Daartoe onderzoekt men het vermogen van het bloed om ingebrachte bacteriën te vernietigen; men bepaalt de zoogenaamde bactericidie. In theorie is de methode hiervoor heel eenvoudig. Men heeft slechts verschillende hoeveelheden bloed of serum en bacteriën bij elkaar te voegen en na verloop van verschillende tijden door uitzaaiing de nog aanwezige hoeveelheid levende bacteriën te bepalen. Maar in de praktijk blijken bij deze onderzoekingen vele voetangels en klemmen voorhanden te zijn, waarop de vroegere onderzoekers niet of niet voldoende hebben gelet, en waardoor het onmogelijk is uit het vele medegedeelde materiaal juiste gevolgtrekkingen te maken.

Hieronder volgen enkele bronnen van fouten, die men bij het onderzoek moet omzeilen; de meeste onderzoekers over de bactericidie van het bloed hebben dit echter niet gedaan.

1°. *De agglutinatie.* Deze kan een bactericidie voorwenden, zonder dat deze in werkelijkheid bestaat. Vele proefreeksen van vroegere onderzoekers zijn hierdoor ten eenenmale onbruikbaar.

Het is niet gemakkelijk deze agglutinatie te ontgaan. Mikroskopisch onderzoek vóór en na de bebroeding van het mengsel van serum (bloed) en bacteriën kan misschien eenig licht geven. Bij de bepaling der bactericidie volgens WRIGHT in capillaire platte ruim-

ten ontstaat geen agglutinatie. Deze methode lukt echter alleen met staphylo- en streptocokken en met miltvuurbacillen, niet met typhus- of colibacillen.

2°. *Invloed der lucht.* Bij mijn onderzoek heb ik gevonden, dat bloedserum van sommige diersoorten (mensch) de eigenschap bezit den groei te remmen van bacteriën, als het mengsel bij 37° C. in tegenwoordigheid van de lucht wordt geplaatst. Zonder aanwezigheid van lucht merkt men van deze remming niets. Deze vorm van bactericidie kan natuurlijk van zeer veel belang zijn voor de genezing van wonden, daar in de bloedkorst en het eruit sijpelende en indrogende serum vele bacteriën, die de wond bezoedelden, in hun groei geremd kunnen worden, maar voor het gedrag van het bloed in de vaten ten opzichte van de bacteriën is deze eigenschap van geen waarde. Ik kom binnenkort nog uitvoeriger op dit verschijnsel terug.

3°. *De verdunning.* Het is ten eenemale ongeoorloofd besluiten te trekken voor het gedrag in vivo uit het gedrag in vitro van verdunde sera. Het is dikwijls gebleken, dat verdunde sera wel, onverdunde niet bactericide werken (verschijnsel van NEISSER-WECHSBERG).

4°. *De bloedstolling.* Een ideale methode behoort met onveranderd bloed te werken; deze is echter tot nu toe nog niet gevonden. (Als men tenminste afziet van de methode van METSCHNIKOFF om bloed in een afgebonden ader te onderzoeken). Zeker verkeerd is het om alleen met serum te werken. Verder is het ongeoorloofd bloed onstolbaar te maken met citras of oxalas natricus, fluor-natrium of hirudine, omdat men zoo de leucocyten beschadigt (HAMBURGER). Defibrineeren is beter; men verwijdert hierbij wel een gedeelte der leucocyten, maar de rest is niet belangrijk veranderd. Of het verwijderen van het fibrogeen van veel invloed is, is niet onderzocht, maar niet zeer waarschijnlijk. Wel staat het gedefibrineerde bloed bij het onveranderde bloed achter door zijn gemis aan bloedplaatjes (immunitet tegen trypanosomen). Voorloopig is er echter geen betere methode en ik heb mij dus met deze moeten vergenoegen.

5°. Tijdens en reeds heel spoedig na de besmetting van het lichaam met bacteriën kunnen zoowel in de immuniteitsverhoudingen van het lichaam als in de virulentie van de bacteriën veranderingen ontstaan. Vermoedelijk zullen deze veranderingen niet plaats vinden in de proefjes in vitro; het bloed in het dierlijke lichaam kan dus anders reageeren dan de proef in vitro uitwijst. Voorloopig kan men dit bezwaar alleen ondervangen, als men van een besmet dier de bactericidie van het bloed op gezette tijden onderzoekt en als men de virulentie der bacteriën bepaalt door kweken uit het geïnfecteerde lichaam eveneens op gezette tijden. Bij mijn onderzoekingen heb ik echter met dit bezwaar geen rekening kunnen houden.

Eindelijk moet nog een algemeene opmerking hier geplaatst worden. Een onderzoek over de immuniteit tegenover één bacteriesoort geeft geen recht zich uit te spreken over de wijze, waarop het lichaam met een andere bacterie worstelt; generaliseeren is op dit gebied geheel uit den boeze. Eveneens moet men eraan denken,

dat de besluiten slechts gelden voor de diersoort, waarmee men heeft gewerkt en niet voor een andere diersoort.

Ik heb voor deze onderzoeken in hoofdzaak de techniek gebruikt, zooals die door WRIGHT voor eenige jaren is aanbevolen. Daarbij wordt het mengsel van gedefibrineerd bloed, resp. serum, gebracht in capillaire ruimten, waarin na de broeding de kolonies zich ontwikkelen. Deze techniek heeft vele voordeelen boven de vroeger gebruikelijke. In de eerste plaats heeft men geen last van agglutinatie. Boven vermeldde ik al, hoe deze de uitkomsten geheel kan vervalschen; bij konijnenserum en staphylocokken heb ik zelf ondervonden, hoe belangrijk deze agglutinatie kan zijn; menschen-serum agglutineert staphylocokken niet. Voor menschenbloed heeft WRIGHT kunnen aantoonen, dat het een belangrijke bactericidie bezit tegenover staphylo- en streptocokken. Deze wordt veroorzaakt door de leucocyten. De bacteriën worden zeer korten tijd na de menging met het bloed gedood en wel extracellulair. Mengt men het bloed met doode bacteriën, dan wordt de bactericide kracht van dit bloed verhoogd. Deze werking is niet *specifiek*. Met doode staphylocokken of typhusbacillen wordt de bactericidie tegenover levende streptocokken verhoogd en omgekeerd.

In mijn vorig artikel over de bactericidie heb ik aangetoond, dat konijnenbloed en onverwarmd en verwarmd serum niet bactericide werken op staphylocokken. Hoe gedraagt zich nu bloed van een dier, dat herhaalde malen intraveneus met doode staphylocokken is ingespoten? Het bloed van zulke dieren bezit duidelijk het vermogen staphylocokken te vernietigen. Daarentegen bezit het serum van zulke dieren geen bactericide eigenschappen tegenover staphylocokken. Toch bevat dit serum wel antistoffen, zoowel complementbindende stoffen als agglutininen. Spelen deze dan toch een rol bij de bactericidie, doordat zij de staphylocokken sensibiliseeren? Dit is niet het geval. Het bloed van een geïmmuniseerd dier werkt even goed als het serum vervangen is door normaal serum; omgekeerd werkt bloed van een normaal dier niet bactericide, ook als men het serum vervangen heeft door serum van een immuun dier. De leucocyten van het geïmmuniseerde bloed zijn het agens, dat de bactericidie tot stand brengt. Verwijdert men deze leucocyten, dan verdwijnt het bactericide vermogen; bloed van een geïmmuniseerd dier, waarvan het serum vervangen is door een oplossing van RINGER, werkt nog bacteriedoodend.

Ook bij menschenbloed, dat reeds van nature bactericide op staphylocokken werkt, is de bactericidie afhankelijk van de leucocyten en niet van het serum; men kan dit serum o.a. vervangen door normaal konijnenserum of vloeistof van RINGER, zonder het bactericide vermogen op te heffen, en omgekeerd wordt normaal konijnenbloed niet bacteriedoodend, als men het serum vervangt door menschen-serum. Hieronder deel ik van dit alles een enkele proef ter staving mede. Alle getallen zijn gemiddelden uit vier proeven 1).

1) De accolades wijzen uit, dat bij deze proeven hetzelfde aantal bacteriën is gebruikt. Voor de volledige vermelding der proëfreesen wordt verwezen naar een eerlang in het *Z. f. Immunitätsforschung* verschijnend opstel over hetzelfde onderwerp.

Bloed normaal konijn.....	29 kolonies	}
Serum „ „	29 „	
Bloed geïmmuniseerd konijn	71 kolonies	}
Serum „ „	110 „	
Gelatine	116 „	
Agglutinatie normaal serum	$\frac{1}{10}$ zwak	}
„ serum van een geïmm. dier ...	$\frac{1}{200}$ zwak	
Compl.titer normaal serum	$\frac{1}{10}$ „	}
„ serum geïmm. dier	$\frac{1}{200}$..	
Bloed geïmm. dier	62	}
Serum „ „	124	
Bloed „ „ + eigen serum	62	
„ „ „ + serum normaal konn . . .	61	
„ „ „ + vloeistof van RINGER ...	97	
(Bij het wasschen zijn de leucocyten iets beschadigd.)		
Bloed normaal dier	100	}
Serum „ „	100	
„ „ „ + serum geïmm. dier	105	
Menschenbloed Z	6	}
„ serum	87	
Normaal konijnbloed	90	
Menschenbloed + normaal konijnserum	18	
Menschenbloed W	34	}
Normaal konijnenbloed	107	
„ „ serum	104	
„ „ bloed + menschen-serum.	108	

Deze verworven bactericidie van het geïmmuniseerde konijn is specifiek. Het bloed van een tegen staphylocokken geïmmuniseerd konijn werkt niet op streptocokken en evenmin op miltvuurbacillen.

Immuun staph. konijnenbloed $39\frac{1}{2}$, immuun staph. konijnenserum 42 streptocokken.

Dit is dus in tegenstelling met wat WRIGHT vond bij de bactericidie van het menschenbloed.

Het bloed van konijnen, die van de huid uit met levende staphylocokken zijn behandeld, verkrijgt eveneens bactericide eigenschappen, niet echter dat van dieren, die met cultuurfiltraten (toxinen) zijn ingespoten. Daarentegen krijgen konijnen, die met miltvuurbacillen zijn behandeld (percutaan of intraveneus), in hun bloed geen bactericide eigenschappen tegen staphylocokken.

Hoe geschiedt de vernietiging der staphylocokken in het bloed der geïmmuniseerde konijnen? Het eenige, dat ik tot nu toe hierover kan zeggen, is dit, dat zij niet door phagocytose plaats vindt. De vernietiging komt n.l. buitengewoon snel tot stand na de menging van het bloed met de bacteriën, juist zooals WRIGHT dit voor

menschenbloed heeft aangetoond. Reeds na enkele minuten zijn de bacteriën vernietigd; na langer wachten vermeerdert dit aantal doode bacteriën niet merkbaar. Dit kon bewezen worden door vermenging van het bloed-bacteriemengsel met een groote hoeveelheid voedingsagar resp. 2, 5, 15, 30 minuten enz. na de menging en het tellen der kolonies na bebroeding.

Hoe de leucocyten deze vernietiging tot stand brengen, is nog niet bekend. Toch lijkt mij de uitkomst van groot belang voor de verklaring der weefselimmunitet. Immers een phagocytose door vaste cellen is minder gemakkelijk aan te nemen dan een vernietiging door bijv. in de buurt afgescheiden, voor de bacterie giftige stoffen. Uit het bovenstaande blijkt wel, dat het serum een geheel passieve rol speelt bij de vernietiging der staphylocokken.

In overeenstemming hiermee heb ik dan ook geen gunstigen invloed kunnen vaststellen van de bijvoeging van anti-staphylocokkenserum aan het mengsel bloed en staphylocokken. Integendeel, meestal bleek de bactericidie zelfs geschaad door het vreemde serum. Onderzocht werden drie monsters antistaphylocokkensera, n.l. twee Nederlandsche en één Engelsch.

Evenmin verkreeg het bloed van een normaal konijn bactericide eigenschappen na intraveneuse inspuiting van antistaphylocokkenserum.

De bactericide eigenschappen van het bloed (van een geïmmuniiseerd konijn of van een mensch) kan men verminderen of opheffen door toevoeging van cultuurfiltraten van verschillende bacteriën, vooral van staphylocokken. Verwonderlijk is dit niet, omdat het bekend is, dat in deze filtraten van staphylocokkenculturen leucocidinen (= de leucocyten beschadigende stoffen) aanwezig zijn. Merkwaardig is het nu, dat de vermindering der bactericidie veel duidelijker is, als men bij het bloed eerst cultuurfiltraat voegt en dan bacteriën; doet men dit omgekeerd, dus eerst bacteriën en dan cultuurfiltraat, dan blijft de bactericidie bestaan, omdat de leucocyten de bacteriën al hebben gedood, vóórdat de leucocidinen worden toegevoegd. Zeer waarschijnlijk is de verminderde bactericidie van het bloed, die WRIGHT heeft gevonden bij patiënten met sepsis, toe te schrijven aan de vergiftiging der leucocyten door de door bacteriën afgescheiden toxinen.

Ik ben bezig te onderzoeken, of het mogelijk is door afneming der bactericidie de sterkte in vitro te meten van bacteriotoxinen. Wordt de schadelijke werking van het leucocidine opgeheven door toevoeging van antistaphylocokkenserum? Hiervan bleek in mijn proeven niets. Echter zijn de in den handel voorkomende sera geen eigenlijk antitoxische sera, maar zoogenaamde antibacteriële sera. Het is dus mogelijk, dat deze proef zou gelukken, als men een serum bezat, dat inderdaad het staphylocokkenleucocidine kon neutraliseeren. Hierover zijn nog proeven gaande. Gelukt dit, dan zou er alle aanleiding zijn om zulk een antitoxisch serum te beproeven bij gevallen met staphylocokkensepsis. Theoretisch is hiervoor veel meer te zeggen dan voor de toepassing der thans in den handel zijnde staphylocokkensera, die m.i. op zijn hoogst op niet specifieke wijze gunstig kunnen werken.

Samenvatting:

Door intraveneuse inspuiting van doode staphylocokken en door inwrijving in de huid van levende staphylocokken is het mogelijk bij een konijn aan het bloed bactericide eigenschappen te verleenen, die het van te voren niet bezat.

Deze verworven bactericidie is specifiek; zij wordt veroorzaakt door de leucocyten, die de bacteriën dooden, echter niet door phagocytose. Het serum of plasma zelf werkt voor het totstandkomen van deze bactericidie niet mede.

Het konijnenbloed en serum van normale en geïmmuniseerde konijnen agglutineert de staphylocokken; door toepassing van de dubbele-glaasjesmethode van WRIGHT ontstaat deze agglutinatie niet. Ik heb geen gunstigen invloed op de bactericidie tegenover staphylocokken kunnen vaststellen van de toepassing van anti-staphylocokkensera (hetzij in vivo of vitro). De bactericidie van het bloed wordt geschaad of opgeheven door toevoeging van staphylocokkentoxinen.

Augustus 1926.

LYMPHKLIERVERGROOTING BIJ CARCINOOM,

DOOR

Prof. Dr. G. C. VAN WALSEM, *te Haarlem.*

Reeds tweemaal heb ik in dit *Tijdschrift* (1924, II, 8 en 1926, I, 2) aangetoond, dat de gangbare opvatting, die de vergrooting der lymphklieren bij carcinoom uit twee processen verklaart, n.l. uit metastasevorming of uit chronische ontsteking, onvolledig is. In het eerste opstel heb ik de lipomatose, in het tweede het oedeem als oorzaak der vergrooting beschreven. Nu zal ik een derde mogelijke oorzaak van de vergrooting van lymphklieren in het afvloeingsgebied van het carcinoom beschrijven. Ik maak vooraf van deze gelegenheid gebruik om een in het eerste opstel gemaakte fout te herstellen, n.l. een onvolledigheid in het aanhalen van de literatuur. Eerst later toch ben ik opmerkzaam geworden op een hiermede in verband staanden arbeid van FAGE (*Recherches sur le tissu lymphoïde dans les épithéliomes non ulcérés et dans les ganglions correspondants, Thèse de Paris, 1909*; zie ook RUBENS-DUVAL, *Organes hématopoiétiques*, in GILBERT et WEINBERG, *Traité du sang*, Tome I, bldz. 475, 485, 506, fig. 71, 75, 83; en ook RUBENS-DUVAL et FAGE, *La régression adipeuse du ganglion lymphatique, Société de Biologie, Séance du 11 Décembre, 1909, T. LXVII, bldz. 969. La Semaine médicale, 1909, bldz. 611*). De tekst bij RUBENS-DUVAL was trouwens in verband met mijn doel — het wijzen op de vergrooting — geheel misleidend: „les ganglions ne diminuent pas sensiblement de volume”. Verder bleek mij, dat deze tekst in strijd is met de van FAGE overge-