

## PDF hosted at the Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen

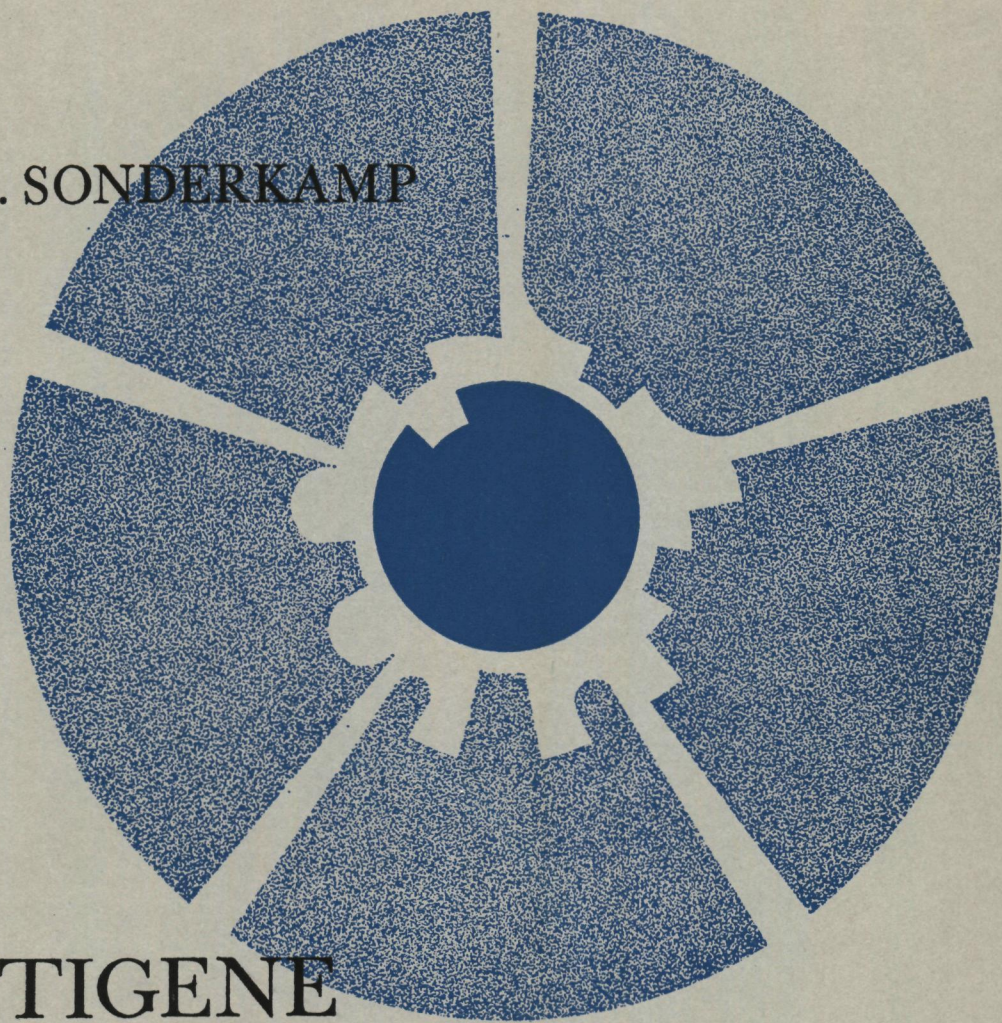
The following full text is a publisher's version.

For additional information about this publication click this link.

<http://hdl.handle.net/2066/107533>

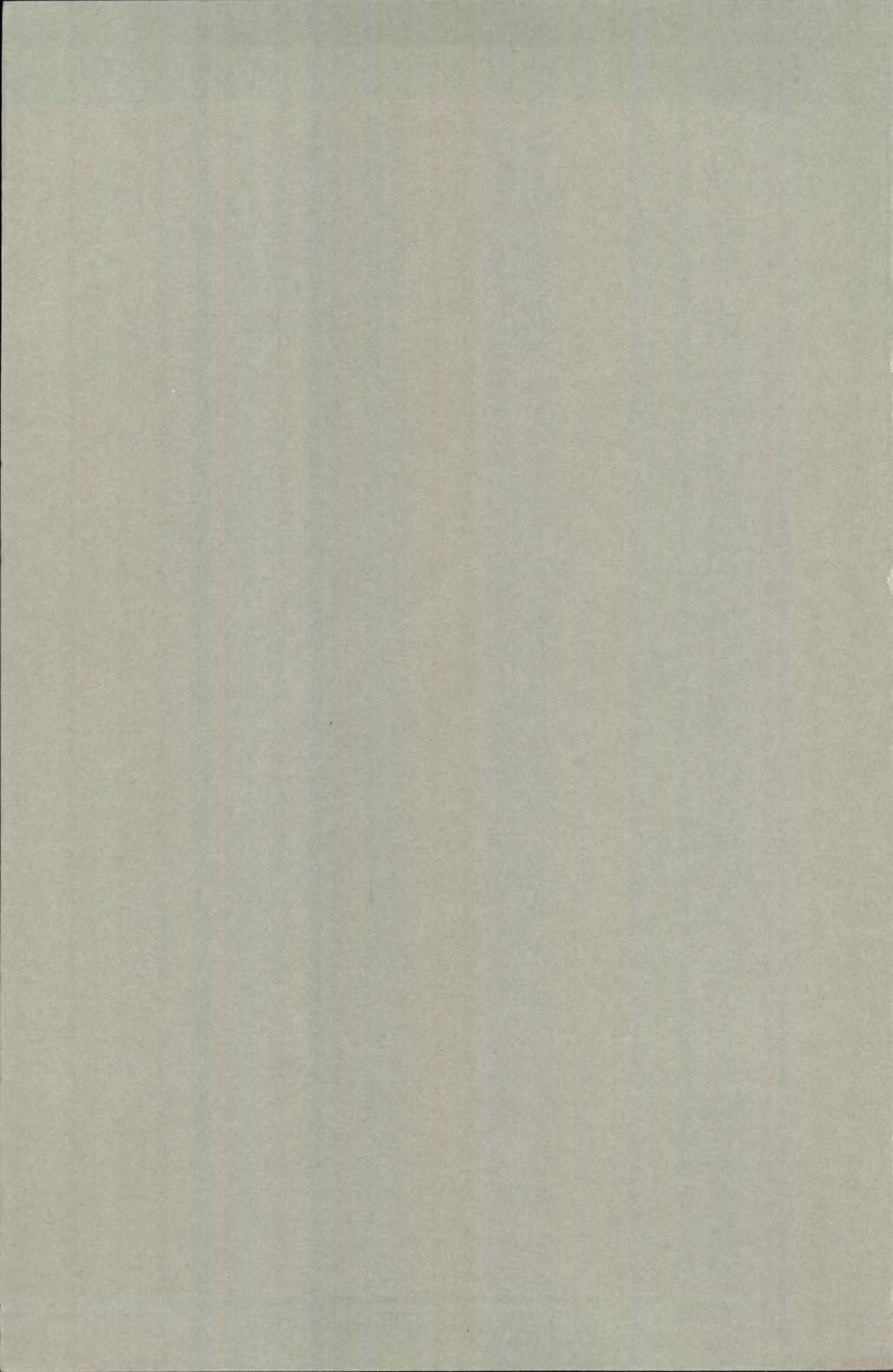
Please be advised that this information was generated on 2018-07-08 and may be subject to change.

H. J. A. SONDERKAMP



ANTIGENE  
VERWANTSCHAP  
VAN  
PARAINFLUENZA  
VIRUSSEN





ANTIGENE VERWANTSCHAP  
VAN PARAINFLUENZA-  
VIRUSSEN

**PROMOTOR:**

**PROF. DR. J. VAN DER VEEN**

# ANTIGENE VERWANTSCHAP VAN PARAINFLUENZA- VIRUSSEN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE  
AAN DE KATHOLIEKE UNIVERSITEIT TE NIJMEGEN,  
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR. W. J. M. A. ASSELBERGS,  
HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN,  
VOLGENS HET BESLUIT VAN DE SENAAT  
IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN OP 12 FEBRUARI 1965  
DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

HERMAN JOZEF ANDREAS SONDERKAMP

GEBOREN TE HOORN

Centrale Drukkerij n.v., Nijmegen



# INHOUD

## HOOFDSTUK I

### *Gegevens uit de literatuur*

Inleiding . . . . .	5
Antigene verwantschap tussen parainfluenzavirus type 1 en Sendai-virus . . . . .	6
Antigene verwantschap tussen parainfluenzavirus type 2 en „Simian Virus” type 5 (SV <sub>5</sub> ) . . . . .	10
Antigene verwantschap tussen parainfluenzavirus type 3 en „Shipping fever” (SF <sub>4</sub> )-virus . . . . .	12
Antigene verwantschap tussen verschillende typen parainfluenzavirussen . . . . .	13
Antigene verwantschap tussen parainfluenzavirussen en andere myxovirussen . . . . .	15
Natuurlijke besmetting van celkweken met parainfluenzavirussen .	16
Aard van de antigene verwantschap tussen parainfluenzavirussen .	18
Antistofvorming bij een secundaire immunologische reactie . . .	18
Doel van ons onderzoek . . . . .	20

## HOOFDSTUK II

### *Materiaal en methoden*

1. Weefselkweek . . . . .	21
2. Virusstammen . . . . .	22
3. Besmetting van caviae . . . . .	23
4. Serologisch onderzoek . . . . .	24
Bereiding van complementbindend antigeen . . . . .	25
Bereiding van hemagglutinerend antigeen . . . . .	26
Complementbindingsreactie . . . . .	26
Hemagglutineringsremmingsreactie . . . . .	27
Hemadsorptieremmingsreactie . . . . .	28
Precipitatie-reactie . . . . .	29



### HOOFDSTUK III

#### *Onderzoek bij dieren*

Beschrijving van de opzet en het doel van de proeven . . . . .	32
Resultaten	
Primaire immunologische reactie . . . . .	34
Secundaire immunologische reactie . . . . .	36
Anamnestiche reactie . . . . .	44
Beschouwingen . . . . .	52

### HOOFDSTUK IV

#### *Vorming van antistoffen tegen parainfluenzavirussen bij patiënten*

Omschrijving van de aard van het onderzoek . . . . .	56
Resultaten . . . . .	58
Beschouwingen . . . . .	59
<i>Samenvatting</i> . . . . .	61
<i>Summary</i> . . . . .	64
<i>Literatuurlijst</i> . . . . .	67

## HOOFDSTUK I

### GEGEVENS UIT DE LITERATUUR

#### *Inleiding*

De parainfluenzavirussen behoren tot de familie der myxovirussen. De grootte van de parainfluenzavirussen varieert van 150 tot 250 m $\mu$ . Het vermogen infectie te veroorzaken gaat verloren, indien de virussen worden behandeld met ether of indien ze gedurende korte tijd worden blootgesteld aan kamertemperatuur of hogere temperaturen. De parainfluenzavirussen kunnen erythrocyten van verschillende soorten dieren agglutineren; de virussen hechten zich aan receptoren op de erythrocyten, die bestaan uit mucoproteïnes. Indien erythrocyten worden toegevoegd aan een celcultuur, waarin parainfluenzavirus is geënt, vindt er een binding plaats van erythrocyten aan cellen, indien in of op de cellen virus aanwezig is. De erythrocyten zijn hierna niet meer van de cellen af te wassen. Deze reactie wordt hemadsorptiereactie genoemd (VOGEL en SHELOKOV 1957). Sommige parainfluenzavirussen kunnen lysis van erythrocyten veroorzaken.

Tot dusver zijn bij mensen 4 typen parainfluenzavirussen geïsoleerd, die onderling verschillen in antigene eigenschappen. Ook bij verschillende soorten dieren zijn parainfluenzavirussen geïsoleerd. Deze virussen zijn serologisch verwant — echter niet identiek — aan de typen, die bij de mens zijn gevonden.

In tabel 1 is een overzicht gegeven van de indeling der parainfluenzavirussen. In het vervolg zullen wij het hemadsorptievirus type 2 (HA-2) aanduiden met de naam parainfluenzavirus type 1, het „Croup-Associated” (CA)-virus met de naam parainfluenzavirus type 2 en het hemadsorptievirus type 1 (HA-1) met de naam parainfluenzavirus type 3. Het Sendai-virus, dat ook tot parainfluenzavirus type 1 behoort, maar niet identiek is aan het HA-2 virus, blijven wij Sendai noemen.

In dit hoofdstuk wordt een overzicht gegeven van de literatuur over de antigene verwantschap tussen parainfluenzavirussen onderling en tussen parainfluenzavirussen en andere myxovirussen. Voor gegevens over de morfologische en fysisch-chemische eigenschappen, het kweken, de verbreiding en de klinische betekenis van parainfluenzavirussen verwijzen wij naar het proefschrift van SMEUR (1961).

Tabel 1. *Indeling van parainfluenzavirussen*

Type	Gastheer	Virusstam	Literatuur
1	Mens Muis, Cavia	Hemadsorptievirus type 2 (HA-2) Sendai-virus; synoniemen: „Hemagglutinating Virus of Japan” (HVJ), „Newborn Pneumonitis Virus” (NPV) en influenza D-virus	Chanock e.m. 1958  Kuroya en Ishida 1953
2	Mens Aap	„Croup-Associated” (CA)-virus „Simian Virus-5” (SV-5)	Chanock 1956 Hull e.m. 1956
3	Mens Rund	Hemadsorptievirus type 1 (HA-1) „Shipping Fever”-virus (SF-4)	Chanock e.m. 1958 Reisinger e.m. 1959
4	Mens	M-25	Johnson e.m. 1960

*Antigene verwantschap tussen parainfluenzavirus type 1 en Sendai-virus*

Serologische onderzoeken bij dieren en mensen, die met parainfluenzavirus type 1 of met Sendai-virus waren geïmmuniseerd, hebben aangetoond, dat beide virussen vrij nauw aan elkaar verwant zijn. Na immunisatie met één van beide virussen werden dikwijls heterologe antistoffen gevormd tegen het andere virus.

Caviae, die intranasaal met Sendai-virus waren besmet, bleken niet alleen antistoffen te ontwikkelen tegen het homologe Sendai-virus maar ook tegen parainfluenzavirus type 1. De heterologe antistoffen waren aantoonbaar met behulp van de complementbindingsreactie (CHANOCK e.m. 1958; COOK e.m. 1959; PETERSEN 1959; ZHDANOV en BUKRINSKAYA 1960; SMEUR 1961; HO YUN DE 1962). De titer van de heterologe antistoffen was vrijwel even hoog als die van de homologe complementbindende antistoffen. Een deel van de caviae vormde ook hemagglutinatieremmende antistoffen tegen parainfluenzavirus type 1. De titer van de heterologe hemagglutinatieremmende antistoffen was echter veel lager dan die van de homologe hemagglutinatieremmende antistoffen. Er

werd geen ontwikkeling van heterologe antistoffen waargenomen, indien de sera werden onderzocht door middel van de neutralisatiereactie (CHANOCK e.m. 1958; BUKRINSKAYA 1960). Het blijkt dus, dat de uitkomsten van het onderzoek op de vorming van heterologe antistoffen afhankelijk is van de serologische reactie, die wordt toegepast.

Caviae, die intranasaal met parainfluenzavirus type 1 waren besmet, vormden ook heterologe antistoffen tegen Sendai-virus. De ontwikkeling van heterologe antistoffen werd bij een deel der geïnfecteerde dieren waargenomen. De heterologe antistoffen waren aantoonbaar door middel van de complementbindingsreactie en de hemagglutinatieremmingsreactie. De titers van de heterologe antistoffen waren veel lager dan die van de homologe antistoffen. Dit gold zowel voor de complementbindende als voor de hemagglutinatieremmende antistoffen (COOK e.m. 1959; ZHDANOV en BUKRINSKAYA 1960; SMEUR 1961; HO YUN DE 1962). Amerikaanse onderzoekers (COOK e.m. 1959) menen op grond van hun onderzoekingen, dat Sendai-virus antigene componenten bezit, die ook bij parainfluenzavirus type 1 voorkomen. Sendai-virus zou volgens hen rijker zijn aan de component, of componenten, die bij beide virussen voorkomen en die door middel van de complementbindingsreactie aantoonbaar zijn, dan parainfluenzavirus type 1. Deze onderzoekers beschouwen de beide virussen als variëteiten van één type.

Ook bij proeven op hamsters is een antigene verwantschap tussen parainfluenzavirus type 1 en Sendai-virus vastgesteld (COOK en CHANOCK 1963). Hamsters, die waren geïnfecteerd met Sendai-virus, waren gedurende enkele maanden na de infectie partieel immuun tegen parainfluenzavirus type 1. Na infectie van deze dieren met parainfluenzavirus type 1 werd er in de longen minder virus aangetroffen dan na infectie met parainfluenzavirus type 1 bij dieren, die van tevoren niet met Sendai-virus waren geïnfecteerd. Infectie met parainfluenzavirus type 1 verleende echter geen kruisbescherming tegen Sendai-virus. Serologisch onderzoek op de ontwikkeling van heterologe antistoffen werd niet verricht.

Het is mogelijk, dat konijnen specifiekere reageren dan caviae (ZHDANOV en BUKRINSKAYA 1960). Na immunisatie van twee konijnen met Sendai-virus werden geen heterologe hemagglutinatieremmende antistoffen tegen parainfluenzavirus type 1 gevormd; één van de twee dieren ontwikkelde heterologe complementbindende antistoffen. Twee konijnen, die met parainfluenzavirus type 1 waren geïmmuniseerd, ontwikkelden in het geheel geen heterologe antistoffen tegen Sendai-virus. De konijnen werden geïmmuniseerd door intraveneuse toediening van virus. Het is niet zeker of de specifiekere reactie van de konijnen verband houdt met de diersoort. Er werden slechts twee konijnen onderzocht en de dieren werden op een andere wijze geïmmuniseerd dan de caviae.

Onderzoek bij andere soorten dieren is slechts op beperkte schaal ver-

richt. Ratten bleken heterologe antistoffen te vormen tegen parainfluenzavirus type 1 na intraperitoneale immunisatie met Sendai-virus en omgekeerd (BUKRINSKAYA 1960). Fretten, die intranasaal met parainfluenzavirus type 1 waren geïnfecteerd, ontwikkelden geen heterologe hemagglutinatieremmende antistoffen tegen Sendai-virus (JENSEN e.m. 1962). De fretten werden niet onderzocht op de vorming van complementbindende antistoffen.

Bij mensen zijn herhaaldelijk serologische kruisreacties tussen parainfluenzavirus type 1 en Sendai-virus waargenomen. Vrijwilligers, die met parainfluenzavirus type 1 waren geïnfecteerd, vormden in alle gevallen complementbindende en hemagglutinatieremmende antistoffen tegen Sendai-virus (REICHELDERFER e.m. 1958; HEATH e.m. 1962). Ontwikkeling van heterologe antistoffen tegen Sendai-virus is ook waargenomen bij patiënten met een infectie door parainfluenzavirus type 1, echter slechts bij een deel van de patiënten (SMEUR 1961; CHANOCK e.m. 1958). Het is mogelijk, dat het verschil in immunologische reactie tussen vrijwilligers en patiënten samenhangt met de leeftijd van de onderzochte personen. De patiënten waren kinderen, de vrijwilligers volwassenen. Op het verband tussen leeftijd en immunologische reactie zullen wij later terugkomen.

Door middel van vaccinatie kunnen ook heterologe antistoffen worden opgewekt. Kinderen, die waren geïmmuniseerd met geïnactiveerd Sendai-virusvaccin, vormden in enkele gevallen heterologe hemagglutinatieremmende antistoffen tegen parainfluenzavirus type 1 (JENSEN e.a. 1962). Het vaccin werd intramusculair toegediend. Ook na de toediening van de tweede dosis vaccin na een tussenpoos van een maand werden slechts door enkele kinderen heterologe antistoffen tegen parainfluenzavirus type 1 ontwikkeld. Er werd geen onderzoek verricht naar de vorming van heterologe complementbindende antistoffen. In de literatuur is tot dusver geen mededeling gedaan over proeven met een vaccin van parainfluenzavirus type 1.

Hoewel op grond van de bevindingen bij dieren en mensen mag worden aangenomen, dat Sendai-virus en parainfluenzavirus type 1 in sterke mate aan elkaar verwant zijn, menen sommige Russische onderzoekers, dat de onderlinge verwantschap tussen deze virussen niet zo nauw is, dat de beide virussen tot één type moeten worden gerekend. De Russische onderzoekers (HO YUN DE en GORBUNOVA 1961; HO YUN DE 1962) baseren deze opvatting op de resultaten van proeven met twee groepen Sendai-virusstammen, die door hen respectievelijk bij mensen en dieren waren geïsoleerd. De van de mens afkomstige virusstammen waren, wat de antigene eigenschappen betreft, vrijwel identiek aan de prototype-stam van het Sendai-virus, die in 1953 in Japan was geïsoleerd. De antigene eigenschappen van de stammen, die bij dieren waren afgezonderd, waren vrijwel identiek aan een Sendai-virusstam, die in 1956 in

Vladivostok (HO YUN DE, GORBUNOVA 1961) was afgezonderd. De virusstam uit Vladivostok verschilde in geringe mate van de virusstam uit Japan. Ratten, die waren geïmmuniseerd met de stam uit Vladivostok, vormden geen heterologe hemagglutinatieremmende antistoffen tegen het Japanse Sendai-virus. Er werden geen antigene verschillen tussen beide stammen gevonden, indien de complementbindingsreactie of de neutralisatiereactie werd toegepast of indien ratten, die met de Japanse Sendai-virusstam waren geïmmuniseerd, werden onderzocht op de ontwikkeling van antistoffen tegen het „Vladivostok”-virus.

De Russische onderzoekers beschouwen de virusstam uit Vladivostok als een variant van het Sendai-virus. Het bleek, dat de „Vladivostok”-variant in geringere mate verwant was aan parainfluenzavirus type 1 dan het Japanse Sendai-virus. Dit werd aangetoond door middel van proeven op caviae, die na infectie met één van deze virussen onderzocht werden op de vorming van complementbindende antistoffen tegen de heterologe virussen. Verder hebben andere Russische onderzoekers (BUKRINSKAYA e.m. 1962) aangetoond, dat er ook tussen stammen van parainfluenzavirus type 1 antigene verschillen voorkomen en dat sommige stammen in vrij sterke mate verwant zijn aan het Japanse Sendai-virus, andere stammen in geringe mate.

Uit deze proeven blijkt, dat de graad van verwantschap tussen parainfluenzavirus type 1 en Sendai-virus mede wordt bepaald door de virusstammen, die voor het onderzoek worden gebruikt. De Russische onderzoekers menen, dat de antigene verschillen tussen sommige stammen van parainfluenzavirus type 1 en sommige Sendai-virusstammen vrijwel even groot zijn als die tussen verschillende typen parainfluenzavirussen. Op grond hiervan hebben zij voorgesteld het Sendai-virus als een afzonderlijk type parainfluenzavirus te beschouwen. Deze opvatting wordt niet gedeeld door Amerikaanse onderzoekers (CHANOCK e.m. 1958; COOK e.m. 1959 en 1963; CHANOCK 1962), zoals reeds eerder is vermeld. Uit de studies van deze onderzoekers blijkt, dat Sendai-virus in sterke mate verwant is aan parainfluenzavirus type 1 en slechts in geringe mate aan andere typen parainfluenzavirussen. Ook wij zijn van mening op grond van de uitkomsten van onze onderzoeken bij dieren, dat Sendai-virus en parainfluenzavirus type 1 zo nauw verwant zijn, dat ze tot één type gerekend mogen worden. Sendai-virus kan worden beschouwd als een variëteit van parainfluenzavirus type 1.

Het is van belang erop te wijzen, dat het niet vaststaat, dat Sendai-virus infecties bij mensen kan veroorzaken. De mededelingen van Russische en Japanse onderzoekers over de isolatie van Sendai-virus uit materiaal van patiënten met luchtweginfecties en pneumonie moeten met reserve worden ontvangen. In sommige gevallen werd het virus afgezonderd in proefdieren (muizen en caviae), die van nature met Sendai-virus besmet kunnen zijn. In andere gevallen werd het virus geïsoleerd in bebroede



eieren, die van nature niet met Sendai-virus zijn besmet. Er werden echter geen proeven gedaan om zoveel mogelijk uit te sluiten, dat een kruisinfectie met een in het laboratorium aanwezige Sendai-virusstam in het spel was. Voorzover ons bekend is, werd er in laboratoria buiten Rusland en Japan, waarin op grote schaal onderzoek op respiratoire virussen is verricht, tot dusver in géén enkel geval Sendai-virus bij patiënten of gezonde personen afgezonderd. De uitkomsten van serologische onderzoeken pleiten evenmin voor de opvatting, dat Sendai-virus infecties bij mensen kan veroorzaken. Patiënten of gezonde personen kunnen antistoffen ontwikkelen tegen Sendai-virus. Dit gaat echter altijd gepaard met de vorming van antistoffen tegen andere parainfluenzavirussen. Daarentegen kunnen mensen wel uitsluitend antistoffen tegen parainfluenzavirus type 1 vormen. (SMEUR 1961; CHANOCK 1962).

*Antigene verwantschap tussen parainfluenzavirus type 2 en „Simian Virus” type 5 (SV<sub>5</sub>)*

Verse kweken van apenierweefsel zijn vrijwel altijd van nature besmet met virussen. HULL en medewerkers (1956) hebben uitgebreid onderzoek verricht over deze „ape-” virussen. Een van de door hen geïsoleerde virussen bleek op grond van biologische en fysisch-chemische eigenschappen tot de myxovirussen te behoren. Het virus werd door hen „Simian Virus type 5” (SV<sub>5</sub>) genoemd. SV<sub>5</sub>-virus is identiek aan twee virussen, SA-virus en DA-virus, die enkele jaren later werden gevonden bij onderzoeken van materiaal van patiënten.

SA-virus werd geïsoleerd door SCHULTZ en HABEL (1959). Keelsecreet van een patiënt met een acute luchtwegaandoening werd geënt in de allantoïsholte van een bebroed ei. Na enkele dagen werd de allantoïsvloeistof van het beënte ei geoogst en intracerebraal ingespoten bij hamsters. Hersenweefsel van enkele hamsters, die enige tijd na de intracerebrale injectie waren gestorven, werd overgeënt op verse kweken van apenierweefsel. In deze kweken werd na de enting een virus gevonden, dat op grond van biologische en fysisch-chemische eigenschappen werd geïdentificeerd als een myxovirus. Het is niet duidelijk of dit virus afkomstig is uit de apenier, uit de hamster of uit het keelsecreet van de patiënt. Het virus werd zonder enige verklaring voor de gebruikte afkorting „SA” virus genoemd.

DA-virus werd gevonden in verse kweken van apenierweefsel, waarin bloed van een lijder aan hepatitis, patiënt D.A., was geënt (HSUNG e.m. 1962). Het virus bleek te behoren tot de myxovirussen. Ook in dit geval staat het niet geheel vast, dat het virus afkomstig is van de patiënt. In onbeënte kweken van apenierweefsel, die tegelijkertijd waren onderzocht, werd geen virus aangetroffen. Dit sluit echter niet met zekerheid uit, dat

het weefsel van nature besmet was. Het is mogelijk, dat de besmetting zo licht was, dat slechts een deel der kweken was geïnficeerd.

Door middel van proeven op dieren is aangetoond, dat SA-virus en DA-virus identiek zijn aan SV<sub>5</sub>-virus (HSIUNG e.m. 1962, CHANOCK 1962). Caviae, hamsters en konijnen, die waren geïmmuniseerd met een van deze virussen, vormden ook antistoffen tegen de beide andere virussen. De titers der „heterologe” antistoffen waren even hoog als die der homologe antistoffen. Wij zullen het virus verder SV<sub>5</sub> noemen.

Uit verschillende onderzoeken blijkt, dat SV<sub>5</sub>-virus verwant is aan parainfluenzavirus type 2. Caviae, die waren geïnficeerd met SV<sub>5</sub>-virus, vormden heterologe antistoffen tegen parainfluenzavirus type 2 (CHANOCK e.m. 1961; CHANOCK 1962; HSIUNG 1962). Ook andere soorten dieren (konijnen en apen) reageerden op deze wijze (HSIUNG 1962). De beide virussen zijn echter niet identiek. Ontwikkeling van heterologe antistoffen was alleen aantoonbaar met behulp van de complementbindingsreactie. De dieren vormden geen heterologe hemagglutineremmende en neutraliserende antistoffen. Bovendien werd er bij caviae, die waren geïnficeerd met parainfluenzavirus type 2, geen vorming van antistoffen tegen SV<sub>5</sub>-virus waargenomen. Onderzoeken bij patiënten en proeven op dieren wijzen erop, dat SV<sub>5</sub>-virus in geringe mate verwant is aan bofvirus en parainfluenzavirus type 3 (CHANOCK 1961; ISACSON 1962; HSIUNG 1962). Over de antigene verwantschap tussen bofvirus en parainfluenzavirussen zal later worden gesproken.

De relatie tussen SV<sub>5</sub>-virus en parainfluenzavirus type 2 toont enige overeenkomst met die tussen parainfluenzavirus type 1 en Sendai-virus. SV<sub>5</sub>-virus bezit vermoedelijk antigene componenten, die ook bij parainfluenzavirus type 2 voorkomen. SV<sub>5</sub>-virus is waarschijnlijk rijker aan de component of componenten, die bij beide virussen voorkomen, dan parainfluenzavirus type 2. SV<sub>5</sub>-virus kan worden beschouwd als een variëteit van parainfluenzavirus type 2 (CHANOCK e.m. 1961; CHANOCK 1962). Deze opvatting wordt niet gedeeld door CHANG en HSIUNG (1962). Deze onderzoekers menen, dat de antigene verwantschap van SV<sub>5</sub>-virus met parainfluenzavirus type 2 niet groter is dan die met de overige typen parainfluenzavirussen. Om deze reden hebben ze voorgesteld SV<sub>5</sub>-virus te classificeren als een afzonderlijk type, namelijk als parainfluenzavirus type 5.

SV<sub>5</sub>-virus is, evenals Sendai-virus, een micro-organisme, dat van nature bij dieren voorkomt. In sera van normale caviae, hamsters, konijnen, apen, koeien en geiten zijn hemagglutineremmende antistoffen tegen SV<sub>5</sub>-virus aangetroffen (HSIUNG 1962). De antistoffen zijn waarschijnlijk gevormd na een infectie met SV<sub>5</sub>-virus. Ook bij mensen zijn antistoffen tegen SV<sub>5</sub>-virus aangetoond. Hieruit mag echter niet worden afgeleid, dat ook bij mensen infecties met SV<sub>5</sub>-virus voorkomen, aangezien er in positieve sera van mensen naast antistoffen tegen SV<sub>5</sub>-virus

steeds ook antistoffen tegen één of meer andere parainfluenzavirussen worden gevonden, meestal antistoffen tegen parainfluenzavirus type 2 of (en) tegen bofvirus, soms antistoffen tegen parainfluenzavirus type 3 (CHANOCK 1961). De aanwezigheid van antistoffen tegen SV<sub>5</sub>-virus in sera van mensen berust vermoedelijk in de meeste gevallen op een infectie met parainfluenzavirus type 2. Misschien is in een deel der gevallen bofvirus of parainfluenzavirus type 3 hiervoor verantwoordelijk.

*Antigene verwantschap tussen parainfluenzavirus type 3 en „Shipping fever” (SF<sub>4</sub>)-virus*

Bij onderzoekingen in de Verenigde Staten naar de etiologie van een epidemische aandoening der luchtwegen bij runderen, die bekend staat als „shipping fever”, werd een virus geïsoleerd, dat in vele eigenschappen geleek op parainfluenzavirus type 3 (REISINGER e.m. 1959; ABINANTI en HUEBNER 1959; HOERLEIN e.m. 1959; ABINANTI e.m. 1960; KETLER e.m. 1961; GALE en KING 1961). Het virus werd SF<sub>4</sub> genoemd, een afkorting voor „shipping fever”-virusstam 4. Ook bij runderen, die leden aan „mucosal disease”, een aandoening van de luchtwegen en van het maagdarmkanaal, werd dit virus geïsoleerd (BAKOS en DINTER 1960).

Sommige onderzoekers (ABINANTI en HUEBNER 1959) hebben geen verschil gevonden in antigene eigenschappen tussen parainfluenzavirus type 3 en SF<sub>4</sub>-virus, noch bij proeven op dieren (konijnen, kippen en kalveren), noch bij proeven op een vrijwilliger. Andere onderzoekers (BAKOS en DINTER 1960; KETLER e.m. 1961) hebben wel een verschil waargenomen. Ze vonden, dat caviae, die met één van beide virussen waren geïnfecteerd, homologe en heterologe antistoffen ontwikkelden. De titers van de homologe antistoffen waren echter in de meeste gevallen hoger dan die van de heterologe antistoffen. Ook bij patiënten, die met parainfluenzavirus type 3 waren geïnfecteerd, en bij runderen, die met SF<sub>4</sub>-virus waren geïnfecteerd, werden verschillen tussen de titers van de homologe antistoffen en die van de heterologe antistoffen waargenomen.

Hoewel men verschil van mening kan hebben over de vraag of SF<sub>4</sub>-virus en parainfluenzavirus type 3 volledig identiek zijn, wat de antigene eigenschappen betreft, staat het voor iedereen vast, dat beide virussen zeer nauw aan elkaar verwant zijn. De ziekteverwekkende eigenschappen van deze virussen zijn niet gelijk. Parainfluenzavirus type 3 is niet pathogeen voor runderen in tegenstelling met SF<sub>4</sub>-virus (ABINANTI en HUEBNER 1959).

*Antigene verwantschap tussen verschillende typen  
parainfluenzavirussen*

Parainfluenzavirussen worden onderscheiden in typen, die immunologisch in sterke mate van elkaar verschillen. Serologische onderzoeken bij dieren en mensen hebben echter aangetoond, dat er kruisreacties tussen verschillende typen voorkomen.

Caviae, die zijn geïnfecteerd met één van de typen parainfluenzavirussen, ontwikkelen geen heterologe antistoffen tegen de andere typen (CHANOCK e.m. 1958; COOK e.m. 1959; CHANOCK 1960; SMEUR 1961). Wanneer de dieren na de infectie opnieuw worden geïmmuniseerd (hyperimmunisatie) door middel van intraperitoneale toediening van virus, worden in sommige gevallen wel heterologe antistoffen gevormd. Na hyperimmunisatie van caviae met parainfluenzavirus type 1 of Sendai-virus werden in enkele gevallen heterologe antistoffen tegen type 3 gevormd, zelden heterologe antistoffen tegen type 2 (CHANOCK e.m. 1958; COOK e.m. 1959). Hyperimmunisatie van caviae met parainfluenzavirus type 2 of type 3 leidt in de regel niet tot de ontwikkeling van heterologe antistoffen (CHANOCK e.m. 1958; COOK e.m. 1959). Het is van belang erop te wijzen, dat door de verschillende onderzoekers slechts een beperkt aantal dieren is onderzocht.

Ook andere soorten dieren kunnen heterologe antistoffen ontwikkelen. Konijnen, die waren geïmmuniseerd met parainfluenzavirus type 3, vormden in enkele gevallen heterologe antistoffen tegen type 1. Het omgekeerde was niet het geval (CHANOCK e.m. 1958; ZHDANOV en BUKRINSKAYA 1960; BUKRINSKAYA 1960). De dieren werden geïmmuniseerd door herhaalde malen virus intraveneus in te spuiten. De titers van de heterologe antistoffen waren veel lager dan die van de homologe antistoffen. Konijnen, die met parainfluenzavirus type 1 of 3 waren geïmmuniseerd, ontwikkelden geen antistoffen tegen type 2. Omgekeerd werden door immunisatie van konijnen met type 2 geen heterologe antistoffen tegen type 1 en 3 opgewekt (BUKRINSKAYA 1960). Hamsters, die waren geïnfecteerd met parainfluenzavirus type 3, waren gedurende korte tijd na de infectie gedeeltelijk beschermd tegen type 1 (COOK en CHANOCK 1963). Na infectie van deze dieren met type 1 werd er in de longen minder virus aangetroffen dan na infectie met type 1 bij dieren, die van tevoren niet met type 3 waren besmet. De heterotypische immuniteit, die door type 3 was opgewekt, was duidelijk geringer dan de immuniteit tegen type 1, die ontstond na een voorafgaande infectie met Sendai-virus. Er werd ook onderzoek verricht naar de ontwikkeling van immuniteit tegen heterologe typen bij hamsters, die waren geïnfecteerd met parainfluenzavirus type 1. De uitkomsten van deze proeven waren negatief.

Bij mensen zijn veelvuldig kruisreacties waargenomen. Proeven op vrij-

willigers, die waren besmet met parainfluenzavirus type 1, 2 of 3, hebben aangetoond, dat, na infectie met type 1, in een deel der gevallen antistoffen werden gevormd tegen type 3 en omgekeerd (HEATH e.a. 1962). Na infectie met type 2 werden geen antistoffen tegen andere typen ontwikkeld (TAYLOR-ROBINSON 1963). De uitkomsten van de tot dusver verrichte studies wijzen erop, dat patiënten met een respiratoire aandoening door parainfluenzavirus dikwijls antistoffen vormen tegen heterologe typen (CHANOCK e.m. 1958; 1960; COOK e.m. 1959; BUKRINSKAYA en PAKTORIS 1960; KIM e.a. 1961; LEWIS e.m. 1961; McDONALD e.m. 1962; VON EULER e.m. 1963). Na een infectie met type 1 werden vaak antistoffen tegen type 3 gevormd en omgekeerd. Kruisreacties tussen type 2 enerzijds en type 1 of 3 anderzijds werden veel minder vaak waargenomen. Het is van belang erop te wijzen, dat tot nu toe slechts enkele groepen onderzoekers mededelingen hebben gedaan over serologische onderzoeken bij patiënten, bij wie parainfluenzavirus is geïsoleerd en getypeerd. Nader onderzoek is vereist om een duidelijker inzicht te verkrijgen in de vorming van heterotypische antistoffen na infectie met parainfluenzavirus. Er zijn in de literatuur wel verscheidene mededelingen verschenen over de uitkomsten van serologische onderzoeken bij patiënten, bij wie het virologische onderzoek negatief was uitgevallen of bij wie geen virologisch onderzoek was verricht (GARDNER e.m. 1957 en 1960; MEENAN e.m. 1959; MC KINNEY e.m. 1959; CLARKE en SAYNOR 1959; EVANS 1960; HOLLAND 1960; SMEUR 1961; FROTHINGHAM en SANYAKORN 1961; DICK en HOLMES 1961; ROBINSON e.m. 1962; DOWLING en LEFKOWITZ 1962). Het bleek, dat serologisch positieve patiënten in een groot aantal gevallen tegelijkertijd antistoffen ontwikkelden tegen 2 (of meer) typen parainfluenzavirussen. De combinatie van antistoffen tegen type 1 en type 3 werd vaker gezien dan de combinatie van antistoffen tegen type 2 en één van de andere typen. Uit deze proeven kunnen echter geen conclusies worden getrokken omtrent het type parainfluenzavirus, dat kruisreacties heeft veroorzaakt, omdat de ziekteverwekker niet is geïsoleerd.

De uitkomsten van verschillende onderzoeken (CHANOCK 1956; CHANOCK e.m. 1958; HEATH e.m. 1962; STARCK e.m. 1963) wijzen erop, dat de vorming van heterotypische antistoffen verband houdt met de leeftijd. Volwassen personen blijken vaker antistoffen te vormen tegen heterologe typen dan kinderen. Er is nog niet veel bekend over de vorming van antistoffen na vaccinatie. Amerikaanse onderzoekers (JENSEN e.m. 1962) hebben een onderzoek verricht bij een groep volwassen personen, die waren geïmmuniseerd met geïnactiveerde vaccins. Van de 18 personen, aan wie type 3-vaccin was toegediend, ontwikkelden 11 antistoffen tegen Sendai-virus. Van de 20 personen, die waren geïmmuniseerd met Sendai-virusvaccin, vormden 6 antistoffen tegen type 3. De heterotypische antistoffen werden aangetoond met de hemaggluti-

natiereemmingsreactie. Onderzoek op heterotypische complementbindende antistoffen werd niet verricht. Ook werd geen onderzoek verricht op de vorming van heterotypische antistoffen tegen parainfluenzavirus type 2. Het is niet geoorloofd algemene conclusies te trekken uit dit onderzoek, omdat de studie beperkt was tot een betrekkelijk kleine groep personen. Bij kinderen en zuigelingen werd alleen de vorming van homologe antistoffen bepaald na toediening van een bivalent vaccin, dat was samengesteld uit de parainfluenzavirussen type 1 en type 3. Er werd geen onderzoek naar de vorming van heterotypische antistoffen verricht.

Uit de boven beschreven onderzoeken bij dieren en mensen blijkt, dat de parainfluenzavirussen type 1, 2 en 3 onderling verwant zijn. Dit geldt in het bijzonder voor type 1 en type 3. Over type 4 is nog weinig bekend. De intertypische verwantschap is echter veel geringer dan de verwantschap tussen variëteiten van één type. Dit blijkt uit de lage titers van heterotypische antistoffen in vergelijking met de titers van antistoffen tegen een variëteit van het homologe type, en uit de lagere frequentie, waarin heterotypische antistoffen worden gevormd. Naar onze mening is er geen reden om de indeling van parainfluenzavirussen in typen en de onderverdeling van typen in variëteiten, die in tabel 1 is weergegeven, te wijzigen.

#### *Antigene verwantschap tussen parainfluenzavirussen en andere myxovirussen*

De parainfluenzavirussen zijn immunologisch niet verwant aan influenzavirus A, B of C (ANDREWES en WORTHINGTON 1959; COOK e.m. 1959). Wel zijn er aanwijzingen, dat parainfluenzavirussen verwant zijn aan Myxovirus parotitidis (bofvirus) en myxovirus multiformis, ook wel „Newcastle disease”-virus (NDV) of pseudovogelpestvirus genoemd.

Uit proeven op caviae en konijnen is gebleken, dat bofvirus in geringe mate verwant is aan SV<sub>5</sub>-virus. Caviae en konijnen, die met SV<sub>5</sub>-virus waren geïmmuniseerd, vormden hemagglutineremmende antistoffen tegen bofvirus (HSIUNG 1962). Het omgekeerde werd door deze onderzoekster niet onderzocht. Onderzoekingen bij caviae hebben tot dusver geen duidelijke aanwijzingen opgeleverd voor een verwantschap tussen bofvirus en andere parainfluenzavirussen. Caviae, die met bofvirus waren geïnfecteerd, bleken geen antistoffen te ontwikkelen tegen parainfluenzavirus type 1, 2 of 3 of tegen Sendai-virus. In antisera tegen Sendai-virus, die bij caviae waren bereid, werden geen antistoffen gevonden tegen bofvirus (KUROYA 1953; FUKIMI 1954; DEMEIO en WALKER 1957; CHANOCK e.a. 1958; COOK e.m. 1959; ZHDANOV en BUKRINSKAYA 1960; BUKRINSKAYA 1960). In antisera tegen de parainfluenzavirussen type 1, 2 en 3, die bij caviae waren bereid, werden evenmin antistoffen tegen bofvirus aangetroffen (COOK e.m. 1959).



Wij kennen geen publicaties over onderzoekingen naar de antigene verwantschap tussen bofvirus en parainfluenzavirus type 1, 2 of 3 bij andere soorten dieren. De uitkomsten van studies bij patiënten doen vermoeden, dat bofvirus immunologisch verwant is aan sommige parainfluenzavirussen. Het bleek, dat lijders aan bof vaak antistoffen ontwikkelden tegen parainfluenzavirus type 2 en type 4 en tegen Sendai-virus en SV<sub>5</sub>-virus (CHANOCK 1956; DEMEIO en WALKER 1957; GARDNER 1957; CHANOCK 1957; JOHNSON 1960; SMEUR 1961; HSIUNG e.m. 1963).

„Newcastle disease“-virus is misschien verwant aan Sendai-virus. Japanse onderzoekers (HOSAKA e.m. 1963) hebben aangetoond, dat konijnen, die waren geïmmuniseerd met het soluble antigeen van „Newcastle disease“-virus, precipiterende antistoffen vormden tegen het soluble antigeen van Sendai-virus. Verder zijn er geen directe aanwijzingen voor een antigene verwantschap tussen „Newcastle disease“-virus en parainfluenzavirussen.

Wel is volgens sommige onderzoekers (KILHAM e.m. 1949; JORDAN en FELLER 1950) „Newcastle disease“-virus verwant aan bofvirus. Deze onderzoekers hebben waargenomen, dat patiënten met bof in sommige gevallen antistoffen ontwikkelden tegen „Newcastle disease“-virus. Deze bevindingen werden echter niet bevestigd door andere onderzoekers (BANG en FOARD 1956; Hsiung e.m. 1963). Bij proeven op dieren (konijnen, kippen, caviae) werden evenmin aanwijzingen gevonden voor een antigene verwantschap tussen „Newcastle disease“-virus en bofvirus (KILHAM e.m. 1949; JORDAN en FELLER 1950; BANG en FOARD 1956; HSIUNG 1963).

Het is mogelijk, dat ook de verwekker van mononucleosis infectiosa verwant is aan parainfluenzavirussen. Lijders aan mononucleosis infectiosa blijken in sommige gevallen antistoffen te vormen tegen Sendai-virus (DEMEIO en WALKER 1958). Verder is er een waarneming beschreven, die zou kunnen wijzen op een verwantschap van de verwekker van mononucleosis infectiosa met „Newcastle disease“-virus. Aan menselijke O-erythrocyten werd „Newcastle disease“-virus toegevoegd in een verdunning, waarbij net geen agglutinatie optrad. De erythrocyten werden wel geagglutineerd, indien antiserum tegen „Newcastle disease“-virus werd toegevoegd. Ook na samenbrengen van de behandelde erythrocyten met sera van sommige patiënten met mononucleosis infectiosa ontstond agglutinatie (BURNET en ANDERSON 1946).

#### *Natuurlijke besmetting van celkweken met parainfluenzavirussen*

Iedere onderzoeker, die regelmatig proeven verricht met verse kweken van apenierweefsel, weet, dat dit weefsel vaak van nature besmet is met een myxovirus of myxovirussen, die een positieve hemadsorptiereactie teweegbrengen. SV<sub>5</sub>-virus is één van de belangrijkste myxovirussen, die

in apenierweefsel worden aangetroffen (HULL e.m. 1956; CHANOCK e.m. 1961). Wij hebben er reeds op gewezen, dat SV<sub>5</sub>-virus van nature bij dieren voorkomt. De aanwezigheid van SV<sub>5</sub>-virus in apenierweefsel berust vermoedelijk op een natuurlijke infectie van apen met dit virus.

Behalve SV<sub>5</sub>-virus zijn ook andere parainfluenzavirussen in onbeënte celkweken aangetroffen. CHANY en medewerkers (1958) hebben in onbeënte kweken van apenierweefsel een virus (stam AE 102) gevonden, dat identiek bleek te zijn aan parainfluenzavirus type 3. Ongeveer tegelijkertijd werden door hen virusstammen van dit type geïsoleerd bij kinderen met luchtweginfecties. Het is dus mogelijk, dat de weefselkweken per ongeluk in het laboratorium waren besmet. Het is ook denkbaar, dat de apen, waarvan nierweefsel was afgenomen, reeds in vivo waren geïnfecteerd met een virusstam, die in het laboratorium aanwezig was. Ook de waarnemingen van COOK en medewerkers (1959) wijzen erop, dat laboratoriumbesmettingen met parainfluenzavirus voorkomen. In het laboratorium van deze onderzoekers was 4 maal een virus („Mills agent”) geïsoleerd uit onbeënte kweken van HeLa-cellen en apeniercellen, dat identiek bleek te zijn aan parainfluenzavirus type 3. In dezelfde periode werd dit virus ook afgezonderd bij twee kinderen met een acute respiratoire aandoening.

De „spontane” aanwezigheid van SV<sub>5</sub>-virus in verse kweken van apenierweefsel vormt een belangrijk probleem bij onderzoeken naar de antigenen eigenschappen van parainfluenzavirussen, die bij de mens zijn geïsoleerd. Voor de isolatie en het kweken van parainfluenzavirussen uit materiaal van patiënten wordt meestal gebruik gemaakt van vers apenierweefsel, omdat dit weefsel vrij gemakkelijk te verkrijgen is en omdat parainfluenzavirussen zich hierin goed kunnen vermenigvuldigen. Er bestaat dan echter een grote kans, dat de virusstammen worden verontreinigd met SV<sub>5</sub>-virus of — eventueel — met een ander van de aap afkomstig parainfluenzavirus. Het is dikwijls niet gemakkelijk aan te tonen, dat een virusstam is verontreinigd. Indien het al mogelijk is het van de mens afkomstige virus te onderscheiden van het apevirus, dan blijft toch de moeilijkheid de beide virussen van elkaar te scheiden. Sommige onderzoekers (CHANOCK e.m. 1961) voegen als routine antiserum tegen SV<sub>5</sub>-virus toe aan kweken van apenierweefsel. Het antiserum onderdrukt de vermenigvuldiging van SV<sub>5</sub>-virus wel, maar elimineert het virus niet. Indien twee verschillende parainfluenzavirusstammen met hetzelfde virus zijn verontreinigd, bijvoorbeeld met SV<sub>5</sub>-virus, kan een verwantschap tussen beide virussen worden gevonden, die niet berust op het bezit van gelijke eigenschappen, maar op de aanwezigheid van dezelfde verontreiniging in beide stammen.

Tot dusver heeft men bij onderzoeken naar de antigenen verwantschap tussen parainfluenzavirussen meestal gebruik gemaakt van virusstammen, die in verse culturen van apeniercellen waren gekweekt. Het is

duidelijk, dat het de voorkeur verdient virusstammen voor deze proeven te kweken in weefselculturen, waarin zelden of nooit natuurlijke virusinfecties worden waargenomen.

### *Aard van de antigene verwantschap tussen parainfluenzavirussen*

Gedurende de laatste jaren zijn in de literatuur verschillende mededelingen gedaan over de samenstelling van parainfluenzavirussen en hieraan verwante virussen. Vooral Sendai-virus en „Newcastle disease”-virus zijn uitvoerig onderzocht (HOSAKA e.m. 1959, 1960, 1961 en 1962; ROTT en REDA 1963). De gegevens betreffende de samenstelling van deze virussen zijn waarschijnlijk ook van toepassing op andere parainfluenzavirussen. Men heeft in een virusdeeltje drie verschillende antigene componenten aangetoond: het „soluble” antigeen, dat gebonden is aan de ribonucleoproteïnen, die binnen in het viruspartikel liggen, en twee componenten, die meer aan de oppervlakte van het viruspartikel zijn gelegen. Waarschijnlijk bezit een virusdeeltje nog meer antigene componenten. Antistoffen tegen het „soluble” antigeen kunnen worden aangetoond met behulp van de complementbindingsreactie en de precipitatiereactie, antistoffen tegen de oppervlakkig gelegen antigenen met behulp van de hemagglutinatieremmingsreactie, complementbindingsreactie en precipitatiereactie.

De antigene verwantschap tussen parainfluenzavirussen kan ons inziens het beste worden verklaard door aan te nemen, dat eenzelfde antigene component (of verschillende antigene componenten) voorkomt bij verschillende typen, maar dat de hoeveelheid antigeen en (of) de kwaliteit van de betreffende antigene component wisselt van type tot type.

### *Antistofvorming bij een secundaire immunologische reactie*

Als een mens of een dier voor het eerst in zijn leven immunologisch reageert tegen een bepaalde antigene component, spreekt men van een primaire immunologische reactie. Iedere volgende immunologische reactie tegen dezelfde antigene component noemt men een secundaire immunologische reactie. De vorming van antistoffen is bij een secundaire reactie eerder aantoonbaar dan bij een primaire reactie. Bovendien loopt de antistoftiter bij een secundaire reactie op tot een hogere waarde en wordt het maximum eerder bereikt. Een parainfluenzavirusstam bezit verschillende antigene componenten. Tegen iedere component kunnen antistoffen worden gevormd. Het is echter mogelijk, dat het antigene vermogen van sommige componenten zo zwak is, dat bij een primaire immunologische reactie zo weinig antistoffen tegen deze componenten worden gevormd, dat ze niet aantoonbaar zijn met behulp van de ge-

bruikelijke serologische reacties. Bij een secundaire immunologische reactie vindt er een grotere productie van antistoffen plaats en kunnen ook antistoffen tegen zwakke antigene componenten worden waargenomen. Het is dus te verwachten, dat bij dieren, die verschillende malen met een virusstam zijn gevaccineerd, of bij mensen, die verschillende malen met hetzelfde type virus zijn geïnfecteerd, een breder spectrum van antistoffen wordt gevonden dan bij dieren of mensen, die slechts éénmaal zijn gevaccineerd of geïnfecteerd. Het is duidelijk, dat de kans op serologische kruisreacties met verwante virussen ook groter is bij een secundaire immunologische reactie.

In dit hoofdstuk is er reeds op gewezen, dat proefdieren, die éénmaal met parainfluenzavirus zijn geïnfecteerd, een type-specifieke serologische reactie tonen. Er zijn aanwijzingen, dat na herhaalde toediening van antigenen soms ook heterotypische antistoffen worden gevormd. Gerichte studies over het effect van hyperimmunisatie op de antistofvorming zijn echter niet beschreven. Wij hebben reeds meegedeeld, dat volwassen personen, die met parainfluenzavirus zijn geïnfecteerd, waarschijnlijk vaker heterotypische antistoffen ontwikkelen dan kinderen. Het is bekend, dat de mens twee of meer malen met hetzelfde type parainfluenzavirus kan worden geïnfecteerd (REICHELFFELDER e.m. 1958; TYRRELL e.m. 1959; BLOOM e.m. 1961; DICK e.m. 1961; KAPIKIAN e.m. 1961; CHANOCK e.m. 1962). Het verschil in het serologische reactiepatroon tussen volwassen personen en kinderen berust vermoedelijk op het feit, dat er op oudere leeftijd vaker een secundaire immunologische reactie in het spel is.

Een secundaire immunologische reactie treedt niet alleen op na re-infecties (of na re-vaccinaties) met hetzelfde type virus, maar ook na infecties — op verschillende tijdstippen — met twee verwante virussen. In het laatste geval vindt er een secundaire immunologische reactie plaats tegen de antigene component (of componenten), die bij beide virussen voorkomt. Sommige onderzoekers duiden deze reactie aan als anamnestiche reactie of „recall”-fenomeen. Deze aanduiding kan worden gebruikt, mits men zich voor ogen houdt, dat het in wezen gaat om een secundaire immunologische reactie, die is opgewekt door een infectie (of vaccinatie) met een verwant virus. Men mag aannemen, dat mensen of dieren, die verschillende malen met verwante virussen zijn geïnfecteerd of geïmmuniseerd een soortgelijk serologisch reactiepatroon zullen tonen als individuen, die verschillende malen met hetzelfde virus zijn geïnfecteerd. In beide gevallen zal tengevolge van een secundaire immunologische reactie het spectrum van antistoffen breder worden. Het lijkt waarschijnlijk, dat dit effect minder uitgesproken zal zijn voor infecties met verwante virussen.

Er zijn verschillende onderzoeken verricht over de vorming van antistoffen na infecties of vaccinaties met serologisch verwante virussen, o.a. met influenzavirussen (HARBOE e.m. 1960; HARBOE e.m. 1962; HAR-

BOE e.m. 1963; HENLE en LIEF 1962) en ARBO-virussen (CASALS e.m. 1963). Het ligt buiten het kader van dit proefschrift de literatuur over onderzoekingen met deze en andere virussoorten te bespreken. Wij willen alleen wijzen op de bevinding, dat het antistofspecrum breder werd bij een secundaire immunologische reactie tegen sommige influenzavirussen en ARBO-virussen.

### *Doel van ons onderzoek*

Wij hebben een onderzoek ingesteld naar de betekenis van de secundaire immunologische reactie voor de vorming van antistoffen tegen parainfluenzavirussen en hieraan verwante virussen. Zowel de secundaire immunologische reactie na re-infectie met hetzelfde virus als die na re-infectie met een verwant virus werden onderzocht. De studie werd uitgevoerd bij *caviae*.

Wij hebben verder onderzoek verricht bij patiënten met een infectie door parainfluenzavirus en bij lijdens aan mononucleosis infectiosa. Het doel van deze studies was een indruk te verkrijgen over het serologische reactiepatroon van deze patiënten. Patiënten met mononucleosis infectiosa werden in het onderzoek opgenomen, omdat er in de literatuur op gewezen is, dat de verwekker van mononucleosis infectiosa misschien verwant is aan parainfluenzavirussen.

## HOOFDSTUK II

### MATERIAAL EN METHODEN

#### 1. *Weefselkweek*

Bij het onderzoek werd gebruik gemaakt van verse kweken van apenier-weefsel en menselijk schildklierweefsel en van de HeLa-celijn, die continu wordt voortgekweekt. De methoden, die in ons laboratorium worden toegepast voor het aanleggen van verse weefselkweken, zijn beschreven door SMEUR (1961); de methode voor het kweken van HeLa-cellen is beschreven door KOK (1957).

De volgende media werden gebruikt:

##### 1. Aankweekmedium voor verse weefselkweken:

Kalfsserum	20	ml
Hanks' oplossing	80	ml
Lactalbumine hydrolysaat	0,500	g
Penicilline	5000	E
Streptomycine	5000	$\gamma$

##### 2. Aankweekmedium voor HeLa-cellen:

Het bovengenoemde medium werd ook gebruikt voor het kweken van HeLa-cellen. In plaats van 20 ml kalfsserum werd 5 ml paardeserum gebruikt.

##### 3. Onderhoudsmedium voor verse weefselkweken:

„Tissue culture” medium 199 (DIFCO)	100	ml
NaHCO <sub>3</sub>	0,052	g
Penicilline	5000	E
Streptomycine	5000	$\gamma$

##### 4. Onderhoudsmedium voor HeLa-cellen:

Dit medium had dezelfde samenstelling als het onderhoudsmedium voor verse weefselkweken. Hieraan werd echter extra toegevoegd 0,01 g gist-extract (DIFCO) per 100 ml medium.

De celkweken werden omgezet met trypsine volgens de in ons laboratorium gebruikelijke methode (KOK 1957).



## 2. Virusstammen

Voor het onderzoek werden de volgende virusstammen gebruikt:

Bofvirus (stam ENDERS), afkomstig van Prof. Dr. R. GISPEN te Utrecht. Het virus werd gekweekt in de allantoïsholte van bebroede kippe-eieren. Sendai-virus, afkomstig van Prof. Dr. J. MULDER te Leiden. Het virus werd gekweekt in de allantoïsholte van bebroede kippe-eieren.

De prototype-stam van parainfluenzavirus type 1 (stam HA2-C35), afkomstig van Dr. R. M. CHANOCK te Bethesda, U.S.A. De stam was geïsoleerd in een cultuur van apenierweefsel en werd in ons laboratorium voortgekweekt in verse kweken van apenierweefsel.

De prototype-stam van parainfluenzavirus type 2 (stam GREER), afkomstig van Dr. R. M. CHANOCK te Bethesda, U.S.A. De stam was geïsoleerd in een cultuur van apenierweefsel. Ze werd in ons laboratorium acht maal gepasseerd in verse kweken van apenierweefsel en vervolgens meer dan 20 maal in culturen van HeLa-cellen.

De prototype-stam van parainfluenzavirus type 3 (stam HA1-C243), afkomstig van Dr. R. M. CHANOCK te Bethesda, U.S.A. De stam was geïsoleerd in een cultuur van apenierweefsel. Ze werd in ons laboratorium 20 maal gepasseerd in verse kweken van apenierweefsel en vervolgens 10 maal in culturen van HeLa-cellen.

SV<sub>5</sub>-virus (stam SA), afkomstig van Prof. Dr. R. GISPEN te Utrecht. De stam was geïsoleerd in een cultuur van apeniercellen (SCHULTZ en HABEL 1959). Ze werd in ons laboratorium voortgekweekt in verse kweken van apeniercellen.

Parainfluenzavirus type 1 (stam 61-1264), afkomstig uit het virologisch laboratorium van het St. Elisabeth-Ziekenhuis te Tilburg. De stam was in 1961 afgezonderd uit de keel van een kind met pseudocroup. De stam was geïsoleerd in een verse cultuur van menselijk schildklierweefsel. Ze werd in ons laboratorium vier maal gepasseerd in verse kweken van apeniercellen en vervolgens twee maal in verse kweken van menselijk schildklierweefsel.

Parainfluenzavirus type 1 (stam 26.615). De stam was in 1963 in ons laboratorium afgezonderd uit de keel van een kind met angina en bronchopneumonie. Ze was geïsoleerd in een cultuur van HeLa-cellen en werd hierin voortgekweekt. De stam was dus nooit gekweekt in culturen van apeniercellen.

Parainfluenzavirus type 3 (stam 24.249). De stam was in 1962 in ons laboratorium afgezonderd uit de keel van een kind met een aandoening der bovenste luchtwegen en otitis media. Ze was geïsoleerd in een cultuur van HeLa-cellen en werd hierin voortgekweekt. Ook deze stam was dus nooit gekweekt in culturen van apeniercellen.

De parainfluenzavirusstammen, die in Tilburg en Nijmegen waren geïsoleerd, werden getypeerd met behulp van antisera, die bij caviae waren

bereid. De caviae waren geïmmuniseerd met respectievelijk de prototype-stammen van parainfluenzavirus type 1, 2 en 3, en met Sendai-, SV<sub>5</sub>- en bofvirus. De uitkomsten van de proeven zijn weergegeven in tabel 2. De prototype-stammen van parainfluenzavirus type 1, 2 en 3 werden aanvankelijk gebruikt voor de bereiding van de antisera, die nodig waren voor de typering van virusstammen. De prototype-stammen waren echter gekweekt in verse culturen van apeniercellen. Wij konden niet uitsluiten, dat de stammen waren verontreinigd met een van de aap afkomstig parainfluenzavirus. Met het oog hierop hebben wij bij ons eigenlijke onderzoek zo veel mogelijk gebruik gemaakt van virusstammen, die in culturen van HeLa-cellen of schildkliercellen waren gekweekt. Wij hebben nog nooit waargenomen, dat deze celculturen waren verontreinigd met parainfluenzavirus.

### 3. *Besmetting van caviae*

Voor de besmetting werd gebruik gemaakt van virusstammen, die uitsluitend in kippe-eieren waren gekweekt (bof- en Sendai-virus) of in culturen van HeLa-cellen (parainfluenzavirus type 1, stam 26.615 en parainfluenzavirus type 3, stam 24.249). Eén groep caviae werd besmet met een virusstam (parainfluenzavirus type 1, stam 61-1264), die enige tijd was gekweekt in verse culturen van apeniercellen en vervolgens was gepasseerd in culturen van schildkliercellen. De laatste groep caviae werd uitsluitend onderzocht op de vorming van antistoffen tegen parainfluenzavirus type 1 (prototype stam HA2-C35).

De virussuspensies, die voor de besmetting werden gebruikt, werden op de volgende wijze bereid. Bof- en Sendai-virus werden gekweekt in de allantoïsholte van bebroede kippe-eieren. De eieren werden beënt met bofvirus, nadat ze 8 dagen bij 37° C waren geïncubeerd; in een ei werd 0,3 ml van een 10<sup>-3</sup> verdunde virussuspensie gespoten. De eieren werden na de enting gedurende 6 dagen bij 37° C geïncubeerd. Vervolgens werd de allantoïsvloefstof geogst. De eieren werden beënt met Sendai-virus, nadat ze 9 dagen bij 37° C waren geïncubeerd; in een ei werd 0,3 ml van een 10<sup>-3</sup> verdunde virussuspensie gespoten. De eieren werden na de enting gedurende 2 dagen bij 37° C geïncubeerd. Daarna werd de allantoïsvloeistof geogst. Deze allantoïsvloeistoffen werden gebruikt als virussuspensies voor de besmetting van caviae, nadat ze gedurende maximaal 6 maanden bij -50° C waren bewaard. De suspensie van bofvirus bevatte ongeveer 10<sup>6</sup> EID per ml. Onder 1 EID<sub>50</sub> („Egg Infectious Dose 50”) werd verstaan een hoeveelheid virus, die in staat was een infectie te veroorzaken bij de helft van het aantal eieren, die met deze dosis virus waren besmet. De suspensie van Sendai-virus bevatte ongeveer 10<sup>8</sup> EID<sub>50</sub> per ml.

De parainfluenzavirusstammen van type 1 en type 3 werden geënt in kweken van Hela-cellen (de stammen 26.615 en 24.249) of van schildkliercellen (stam 61-1264). Aan een celkweek werd ongeveer 100 TCD<sub>50</sub> virus toegevoegd. Onder 1 TCD<sub>50</sub> (Tissue Culture Dose 50<sup>''</sup>) werd verstaan een hoeveelheid virus, die in staat was een positieve hemadsorptie-reactie te veroorzaken bij de helft van het aantal celkweken, die met deze dosis virus waren besmet. De beënte celculturen werden stationair bij 36° C geïncubeerd. Op de tweede of derde dag na de enting werden de culturen één maal bevroren en ontdooid. De celresten werden niet afgecentrifugeerd. Het mengsel van celresten en kweekmedium werd gebruikt als virussuspensie voor de besmetting van caviae, nadat het gedurende maximaal 6 maanden bij -50° C was bewaard. De virussuspensies bevatten 10<sup>4</sup> tot 10<sup>5</sup> TCD<sub>50</sub> per ml.

Ter controle werden proeven op caviae verricht met vloeistoffen van bebroede kippe-eieren en van celkweken, die niet met virus waren besmet. De controle-vloeistoffen werden op dezelfde wijze bereid als de virussuspensies.

Caviae werden besmet onder ether-narcose. In ieder der beide neusgaten werd 0,2 ml virussuspensie of controle-vloeistof gedruppeld. De proeven geschieden in een vertrek, waarin geen andere dieren aanwezig waren. Op één dag werden slechts met één virusstam besmettingsproeven verricht. Caviae, die met eenzelfde virusstam waren besmet, werden bij elkaar in één vertrek geplaatst. Gedurende de gehele periode van de proef werden ze hierin afgezonderd. De besmetting met parainfluenzavirus veroorzaakte infecties, die door middel van serologisch onderzoek aantoonbaar waren. Bij geen der caviae werden ziekteverschijnselen waargenomen, die aan de infectie konden worden toegeschreven.

Sommige groepen caviae werden op de 21e dag na de besmetting opnieuw geïmmuniseerd met dezelfde virusstam door middel van intraperitoneale toediening van 1 ml virussuspensie. Andere groepen caviae werden op de 30 of 93e dag na de besmetting opnieuw geïnfecteerd met dezelfde virusstam of met een ander virusstam door middel van intranasale enting volgens de hierboven beschreven methode. Uitvoerigere gegevens over de opzet van deze proeven worden vermeld in hoofdstuk III.

#### 4. Serologisch onderzoek

*Onderzochte sera.* Serologisch onderzoek op parainfluenzavirus werd verricht bij caviae en bij patiënten. Gegevens over de sera van patiënten worden vermeld in hoofdstuk IV. Sera van caviae werden verkregen door middel van hartpunctie; monsters bloed werden vóór de besmetting en op verschillende tijdstippen na de besmetting afgenomen. Ook bij onbehandelde caviae en bij caviae, die met controle-vloeistof waren be-

handeld, werd bloed afgenomen. Uitvoerige gegevens over de tijdstippen, waarop sera werden verzameld, worden in hoofdstuk III vermeld. De sera werden bij  $-20^{\circ}$  C bewaard.

*Bereiding van complementbindend antigeen.* Complementbindend antigeen van bof- en Sendai-virus werd op dezelfde wijze bereid als de suspensies van deze virussen, die werden gebruikt voor de besmetting van caviae. De virussuspensies werden gedurende maximaal 6 maanden bij  $-50^{\circ}$  C bewaard. Voor gebruik werden ze gedurende  $\frac{1}{2}$  uur op  $56^{\circ}$  C verhit.

Voor de bereiding van complementbindend antigeen van parainfluenza-virus type 1, 2 en 3 werden resp. de stammen 61-1264, „Greer” en 24.249 gebruikt. Type 2- en 3-antigeen werd bereid in kweken van HeLacellen, type 1-antigeen in kweken van apeniercellen. Het was niet mogelijk type 1-antigeen te bereiden in kweken van HeLa- of schildkliercellen, omdat de opbrengst van het virus in deze celkweken te gering was.

De celkweken werden beënt met ongeveer 100 TCD<sub>50</sub> virus. Op de tweede en vijfde dag na de enting werd het medium van de celkweken ververst. Het oude medium werd bewaard bij  $-50^{\circ}$  C. Op de achtste dag na de enting werden de kweken drie maal bevroren en ontdooid. De oude media, die bij  $-50^{\circ}$  C waren bewaard, werden hieraan toegevoegd. Het mengsel van celresten en media werd gedurende 20 minuten bij  $4^{\circ}$  C gecentrifugeerd met een snelheid van 2000 omwentelingen per minuut. De bovenstaande vloeistof werd afgezogen en bewaard. Het sediment werd in een klein volume (ongeveer 15 ml) van de bovenstaande vloeistof geresuspendeerd. Vervolgens werd het sediment gedurende 10 minuten behandeld met ultrasonore trillingen (ultrasonic desintegrator MSE 18.000/20.000 Herz). Tengevolge hiervan werden de nog intacte cellen gedesintegreerd en kwam het in de cellen aanwezige of aan celresten geadsorbeerde virus vrij in de vloeistof. De celbestanddelen werden van de vloeistof gescheiden door centrifugatie gedurende 20 minuten bij  $4^{\circ}$  C met een snelheid van 2000 omwentelingen per minuut. De bovenstaande vloeistof werd gevoegd bij de reeds eerder afgezogen, bovenstaande vloeistof. Het mengsel werd gedurende 60 minuten bij  $4^{\circ}$  C gecentrifugeerd met een snelheid van 20.000 omwentelingen per minuut teneinde het virus te laten sedimenteren. Het sediment werd geresuspendeerd in een kleine hoeveelheid veronalbuffer, die gelijk was aan  $\frac{1}{20}$ e gedeelte van het oorspronkelijke volume. Om een gelijkmatige verdeling van de virusdeeltjes te verkrijgen werd de suspensie gedurende 3 minuten met ultrasonore trillingen behandeld. Deze virus-suspensie werd gebruikt als antigeen voor de complementbindingsreactie. De suspensie werd gedurende maximaal 3 maanden bij  $-20^{\circ}$  C bewaard. Voor gebruik werd ze gedurende  $\frac{1}{2}$  uur op  $56^{\circ}$  C verhit.

Vloeistoffen van onbeënte kippe-eieren en van onbeënte celkweken werden als controle gebruikt bij complementbindingsreacties. De controle-vloeistoffen werden op hetzelfde tijdstip geoogst en op dezelfde wijze behandeld als de virussuspensies, waarvan complementbindend antigeen was bereid.

*Bereiding van hemagglutinerend antigeen.* Voor de bereiding van hemagglutinerend antigeen werden dezelfde virusstammen gebruikt als voor de bereiding van complementbindend antigeen. Hemagglutinerend antigeen van bof- en Sendai-virus werd op dezelfde wijze bereid als de suspensies van deze virussen, die werden gebruikt voor de besmetting van caviae. De virussuspensies werden niet verhit. Ze werden gedurende maximaal 12 maanden bij  $-50^{\circ}$  C bewaard.

Hemagglutinerend antigeen van parainfluenzavirus type 1, 2 en 3 werd bereid in kweken van apeniercellen. Het was niet mogelijk voor deze proeven kweken van HeLa- of schildkliercellen te gebruiken, omdat er in deze celkweken onvoldoende virushemagglutininen werden gevormd. De celkweken werden beënt met ongeveer  $10^5$  TCD<sub>50</sub> virus. Het medium van de celkweek werd na de enting niet ververst. Op de vijfde dag na de enting werden de kweken drie maal bevoren en ontdooid. Het mengsel van celresten en medium werd gedurende 20 minuten bij kamertemperatuur gecentrifugeerd met een snelheid van 2000 omwentelingen per minuut. De bovenstaande vloeistof werd gebruikt als antigeen voor de hemagglutinatiereactie. De virussuspensie werd niet verhit. Ze werd gedurende maximaal 6 maanden bij  $-50^{\circ}$  C bewaard.

*Complementbindingsreactie.* De complementbindingsreactie werd uitgevoerd volgens de micromethode, die voor het eerst door TAKATSKY (1950) is beschreven en naderhand door SEVER (1962) verder is uitgewerkt. Bij deze methode wordt gebruik gemaakt van plastic plaatjes, die voorzien zijn van kommetjes. De belangrijkste voordelen boven de buisjesmethode en de semi-micromethode, die vóórdien in ons laboratorium werd toegepast, zijn besparing van serum en antigeen. Bij de micromethode wordt een volume-eenheid van slechts 0,025 ml gebruikt. Verdunningsreeksen van serum en antigeen worden in de kommetjes gemaakt met behulp van stalen spiraaltjes waarin 0,025 ml vloeistof wordt opgezogen. Vier spiraaltjes kunnen tegelijkertijd worden gehanteerd, zodat het mogelijk is door één handeling vier verschillende monsters serum te verdunnen.

Afgezien van de volumina der vloeistoffen verschilt de micromethode in wezen niet van de complementbindingsreactie volgens KOLMER (KOLMER e.m. 1951) in buisjes. Als verdunningsvloeistof werd een op pH 7,3-7,4 gebufferde veronaloplossing gebruikt, die de volgende samenstelling had:

Veronalnatrium	0,030 g
Veronal	0,046 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,252 g
NaCl	0,838 g
MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	0,010 g
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	0,002 g
Aqua bidest.	100 ml

De te onderzoeken sera werden 1:4 verdund in veronaloplossing in buisjes. De verdunde sera werden gedurende 30 minuten in een waterbad van 56° C geïnactiveerd. Daarna werden de sera in het antigeen (in de plaatjes) verdund in een verdunningsreeks van 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 en eventueel hoger (beginverdunning van het serum in één volume-eenheid). Antigeen en serumverdundingen werden gedurende 20 minuten bij kamertemperatuur geïncubeerd. Vervolgens werden twee exacte eenheden complement toegevoegd. Nadat de vloeistoffen waren gemengd, werden de plaatjes bij 4° C geplaatst. Na 16 uur werd hemolytisch systeem toegevoegd en gemengd met de reeds in de kommetjes aanwezige vloeistoffen. Vervolgens werden de plaatjes gedurende één uur in een waterbad van 37° C geïncubeerd; in het eerste half uur werden om de 10 minuten de erythrocyten opgeschud. Daarna werden de plaatjes bij 4° C geplaatst en gedurende 4 uur bij deze temperatuur bewaard teneinde de erythrocyten te laten bezinken. De reacties werden beoordeeld door de patronen af te lezen, die door gesedimenteerde erythrocyten waren gevormd. Al naar gelang de graad van hemolyse bleven er meer of minder, of in het geheel geen rode bloedcellen intact, die in een dikke of dunne punt uitzakten, respectievelijk geen sediment vormden. *De hoogste serumverdunding (beginverdunning van het serum in een volume-eenheid), waarbij al het complement was gebonden en volledige remming (4+) van de hemolyse was opgetreden, hebben wij als titer van complementbindende antistoffen aangenomen.*

Sera, die op verschillende tijdstippen bij een proefdier of bij een patiënt waren afgenomen, werden altijd gelijktijdig in één proef onderzocht. Iedere proef werd gecontroleerd door middel van titraties met een bekend positief en negatief serum.

*Hemagglutinatieremmingsreactie.* De hemagglutinatieremmingsreactie werd eveneens uitgevoerd volgens de micromethode van TAKATSKY (1950) en SEVER (1962). Als verdunningsvloeistof werd een op pH 7.2 gebufferde zoutoplossing gebruikt, die de volgende samenstelling had:

NaCl	0,8 g
KCl	0,02 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	0,115 g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,02 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
Aqua bidest.	100 ml

Aspecifieke remmers bleken geen belangrijk probleem te vormen bij het onderzoek op hemagglutineremmende antistoffen tegen de door ons gebruikte bofvirusstam en parainfluenzavirusstammen. Met het oog hierop werden de te onderzoeken sera niet voorbehandeld met cholerafilteraat of met andere stoffen, die aspecifieke remmers kunnen afbreken. De sera werden niet geïnactiveerd. De sera werden in fosfaatbuffer (in de plaatjes) verdund in een verdunningsreeks van 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 en eventueel hoger (beginverdunding van het serum in een volume-eenheid). Aan iedere serumverdunding werd een gelijk volume (0,025 ml) van een verdunde virussuspensie toegevoegd, die 4 hemagglutinerende eenheden bevatte. Onder één hemagglutinerende eenheid werd verstaan een hoeveelheid virus, die in staat was ongeveer 50% van een 0,25% suspensie van cavia-erythrocyten (uiteindelijke concentratie) te agglutineren. Door middel van een virustitratie in een plaatje werd bepaald, hoeveel hemagglutinerende eenheden een virus-suspensie bevatte en welke virusverdunding in de hemagglutineremingsreactie moest worden gebruikt. Na toevoeging van 4 hemagglutinerende eenheden virus aan de serumverdundingen werden de plaatjes gedurende 16 uur bij 4° C geïncubeerd. Vervolgens werd een 0,75% suspensie van cavia-erythrocyten (0,025 ml per kommetje) toegevoegd en gemengd met de reeds in de kommetjes aanwezige vloeistoffen. Het mengsel werd gedurende 4 uur bij 4° C geïncubeerd; na de eerste 30 minuten werden de erythrocyten opgeschud. Aan het einde van de incubatieperiode werden de bezinkingspatronen der erythrocyten afgelezen. *De hoogste serumverdunding (beginverdunding van het serum in een volume-eenheid), waarbij ongeveer 50% der erythrocyten niet was geagglutineerd, hebben wij als titer van hemagglutineremmende antistoffen aangenomen.* Indien er een scherpe overgang was en in twee opeenvolgende kommetjes respectievelijk in het geheel geen agglutinatatie en volledige agglutinatatie werd waargenomen, werd de serumverdunding van het kommetje, waarin geen agglutinatatie optrad, als titer aangenomen. Sera, die op verschillende tijdstippen bij een proefdier of bij een patiënt waren afgenomen, werden altijd gelijktijdig in één proef onderzocht. Iedere proef werd gecontroleerd door middel van titraties met een bekend positief en negatief serum.

*Hemadsorptieremmingsreactie.* De hemadsorptieremmingsreactie werd gebruikt voor de typering van virusstammen. De reactie werd uitgevoerd volgens de methode, die is beschreven door SMEUR (1961). In afwijking

van de werkwijze van SMEUR hebben wij de antisera niet voorbehandeld met cholerafilteraat.

*Precipitatiereactie.* De precipitatiereactie werd gebruikt voor een onderzoek naar de antigene structuur van parainfluenza 3 virus en naar de aanwezigheid van identieke antigene componenten bij parainfluenza 3 virus en Sendai-virus. Bij dit onderzoek werd gebruik gemaakt van antisera, die waren bereid bij konijnen. De konijnen waren geïmmuniseerd door 15 maal — met een interval van 3 of 4 dagen — 3 ml van een suspensie van parainfluenzavirus type 3 (stam 24.249) of van Sendai-virus intraveneus toe te dienen. De virussuspensie was op dezelfde wijze bereid als de suspensie, die was gebruikt voor de besmetting van caviae. Eén week na de laatste injectie werden de konijnen verbloed door middel van hartpunctie. De sera werden bewaard bij  $-20^{\circ}$  C.

De precipitatiereactie werd uitgevoerd volgens een micromethode op objectglazen, die is beschreven door CROWLE (1961). Een objectglas werd ondergedompeld in een 0,1% suspensie van agar (Noble agar, Difco in aqua destillata, die op  $60^{\circ}$  C was verwarmd. Het objectglas werd, nadat één zijde was schoon gewreven, gedroogd bij  $60^{\circ}$  C in een droogstoof. Vervolgens werden twee stroken transparante, waterbestendige plakband (Tesaflex 713) over de breedte van het objectglas geplakt op 3 cm van elkaar. Op deze stroken werd een dekplaatje van Perspex (dikte 3 mm) gelegd, dat voorzien was van vijf ronde gaatjes, die op dezelfde wijze waren gerangschikt als de stippen van het getal vijf op een dobbelsteen. De doorsnede van ieder gaatje was 4 mm. De afstand tussen het middelpunt van het middelste gaatje en het middelpunt van de hieromheen liggende gaatjes bedroeg 15 mm. Met een pipet Pasteur werd een 1% suspensie van agar (Noble agar, Difco) in aqua destillata, die op  $60^{\circ}$  C was verwarmd, tussen het dekplaatje en het objectglas gebracht. De agar verspreidde zich over het objectglas tussen de beide stroken plakband door capillaire werking. Nadat de agar vast was geworden, werden het dekplaatje en de twee stroken plakband verwijderd. Het dekplaatje werd nu rechtstreeks op de agar gedrukt. Er werd op gelet, dat er geen luchtbellens tussen beide oppervlakten werden gevormd. Door deze werkwijze kon worden voorkomen, dat er na enige tijd tengevolge van samentrekking van de agar spleten ontstonden tussen het agaroppervlak en het dekplaatje. De gaatjes in het dekplaatje dienden als kommetjes; de bodem hiervan werd gevormd door het oppervlak van de agar.

In het middelste kommetje werd antiserum gedruppeld, in de buitenste kommetjes antigeen. Ieder kommetje werd gevuld met ongeveer 0,1 ml vloeistof. Als antigeen werden de virussuspensies gebruikt, die ook waren gebruikt voor de immunisatie van de konijnen. De virussuspensies waren bij  $-50^{\circ}$  C bewaard. De antisera werden niet geïnactiveerd. Ze werden



onverdund en in een verdunning van 1:2 gebruikt. Nadat antigeen en antiserum in de kommetjes waren gedruppeld, werd het objectglas gedurende 24-48 uur bij 4° C geïncubeerd. De vloeistof, die nog in de kommetjes aanwezig was, werd vervolgens verwijderd door op het dekplaatje een vochtig filtreerpapiertje te leggen en het geheel om te keren. Het dekplaatje werd hierna onder water verwijderd. Ten slotte werd er onderzocht of er zich precipitaten hadden ontwikkeld met behulp van de kleuring met „amido-schwarz” volgens URIEL (1958). De kleurstof was op de volgende wijze samengesteld:

Amido-schwarz	100 mg
Azijnzuur 12%	45 ml
Natriumacetaat 1,6%	45 ml
Glycerol	10 ml

Voordat de kleurstof werd toegevoegd, werd het objectglas gedurende een nacht in water gelegd om de serumeiwitten, die niet waren geprecipiteerd, uit de agar te wassen. Hierna werd het objectglas gedurende 2 minuten ondergedompeld in de oplossing van „amido-schwarz”. De geprecipiteerde eiwitten werden gekleurd door „amido-schwarz”. Ten slotte werd het objectglas ondergedompeld in een 2% oplossing van azijnzuur om de overmaat kleurstof te verwijderen. De behandeling met azijnzuur werd voortgezet, tot er uit de agar geen kleurstof meer vrijkwam. Eventueel gevormde precipitaten waren te zien aan de aanwezigheid van blauwe lijnen tussen het middelste kommetje en de buitenste kommetjes.

Tabel 2. *Typing van parainfluenzavirusstammen met behulp van type-specifieke antisera*

Cavia-antisera tegen		Titers van complement-bindende antistoffen tegen			Titers van hemagglutinatieremmende antistoffen tegen			Uitkomsten van de hemadsorptieremmingsreactie <sup>***</sup>		
		Stam 1.264	Stam 26.615	Stam 24.249	Stam 1.264	Stam 26.615	Stam 24.249	Stam 1.264	Stam 26.615	Stam 24.249
		Sendai-virus	A <sup>*</sup>	<8	<8	<8	16	<16	<16	n.v.
	B	32	32	<8	32	<16	<16	n.v.	n.v.	n.v.
Parainfluenzavirus type 1 (prototype-stam)	A	<8	<8	<8	<16	<16	<16	—	—	—
	B	128	64	<8	64	128	16	+	+	—
Parainfluenzavirus type 2 (prototype-stam)	A	<8	<8	<8	<16	16	<16	—	—	—
	B	<8	<8	<8	<16	16	<16	—	—	—
Parainfluenzavirus type 3 (prototype-stam)	A	<8	<8	<8	<16	<16	<16	—	—	—
	B	<8	<8	128	<16	<16	256	—	—	+
SV <sub>5</sub> -virus (prototype-stam)	A	n.v. <sup>**</sup>	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
	B	<8	<8	<8	16	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
Bofvirus (Enders-stam)	A	<8	<8	<8	<16	n.v.	<16	n.v.	n.v.	n.v.
	B	<8	<8	<8	<16	n.v.	<16	n.v.	n.v.	n.v.

<sup>\*</sup> Serum A afgenomen voor infectie, serum B na infectie.

<sup>\*\*</sup> n.v. = niet verricht.

<sup>\*\*\*</sup> De sera werden gebruikt in een verdunning 1:8.

— = geen significante remming van de hemadsorptie.

+ = volledige remming van de hemadsorptie.

## HOOFDSTUK III

### ONDERZOEK BIJ DIEREN

Een onderzoek naar antigene verwantschap tussen parainfluenzavirussen onderling en tussen deze groep virussen en bofvirus werd verricht bij caviae. Uit de literatuur is bekend, dat heterotypische antistoffen vaker worden gevormd bij een secundaire immunologische reactie dan bij een primaire immunologische reactie; ook door middel van een anamnestiche reactie kan antigene verwantschap tussen virussen worden opgespoord (zie Hoofdstuk I). Het leek ons van belang van deze immunologische reacties gebruik te maken bij het onderzoek naar antigene verwantschap tussen parainfluenzavirussen. Tot nu toe is een dergelijk onderzoek met parainfluenzavirussen niet beschreven. Caviae werden tweemaal op verschillende tijdstippen besmet. Eén groep caviae werd tweemaal — met een interval van 31 dagen — besmet met hetzelfde virus; een andere groep caviae werd tweemaal — met een interval van 50 of 93 dagen — besmet met twee verschillende virussen. Vóór en na de eerste en de tweede besmetting werd bloed afgenomen. De sera werden onderzocht op homotypische en heterotypische antistoffen.

Voor de besmetting van caviae werd gebruik gemaakt van Sendai-virus, parainfluenzavirus type 1, parainfluenzavirus type 3 en bofvirus. De virussen waren niet gepasseerd in apeniercellen. Sendai en bofvirus waren gekweekt in de allantoïsholte van het bebroede kippe-ei. De gebruikte parainfluenzavirus type 1 en 3-stammen (respectievelijk stam 26.615 en stam 24.249) waren geïsoleerd en gepasseerd in HeLa-cellen.

Het is dus vrijwel zeker uitgesloten, dat de virusstammen waren verontreinigd met een „apevirus”. Onderzoek naar het voorkomen van anamnestiche reacties werd verricht bij caviae, die achtereenvolgens waren besmet met Sendai-virus en parainfluenzavirus type 3 en omgekeerd en bij caviae, die achtereenvolgens waren besmet met bofvirus en parainfluenzavirus type 3 en omgekeerd. De beide virussen van iedere serie waren gekweekt in cellen van verschillende gastheren (kip en mens). Een mogelijke invloed van antigenen van de gastheer op de anamnestiche reactie kon op deze wijze à priori worden uitgesloten.

Het onderzoek werd verricht bij albino-caviae. De caviae behoorden tot twee populaties, die elk bestonden uit 200 dieren en afkomstig waren van het proefdierenlaboratorium van TNO te Zeist. De dieren waren bij het begin van de proef ongeveer 3 maanden oud en wogen gemiddeld 300 gram. Na aankomst in het laboratorium werden de caviae genummerd met oormerken en vervolgens aselekt ingedeeld in groepen aan de hand van tabellen met aselecte getallen. Voor het onderzoek van de primaire en secundaire immunologische reactie werden groepen van 20 caviae gekozen, voor het onderzoek van de anamnestiche reactie groepen van 40 caviae. Van iedere cavia werd vóór en na de besmetting op van te voren vastgestelde tijdstippen bloed verzameld door middel van hartpunctie. Tengevolge van het grote aantal hartpuncties, dat bij ieder dier werd verricht, was de sterfte aanzienlijk. Slechts 20% van de dieren, die tweemaal waren besmet en waarbij tienmaal bloed was afgenomen, overleefden de proef. Op enkele uitzonderingen na, die in de tekst afzonderlijk zijn vermeld, werd het serologisch onderzoek beperkt tot de caviae, waarvan volledig materiaal beschikbaar was; caviae, die tijdens de proef overleden, werden niet in het onderzoek opgenomen.

De sera werden onderzocht met de complementbindingsreactie en de hemagglutineringsreactie. De reacties werden verricht met antigenen van de volgende virusstammen (zie ook Hoofdstuk II, blz. 25, 26): Sendai-virus, parainfluenzavirus type 1 (stam 1264), parainfluenzavirus type 2 (stam Greer), parainfluenzavirus type 3 (stam 24.249) en bofvirus (stam Enders). Alle sera werden onderzocht op de aanwezigheid van antistoffen tegen ieder van deze virussen, met uitzondering van bofvirus. Onderzoek op antistoffen tegen bofvirus werd uitsluitend verricht bij caviae, die met bofvirus waren besmet en bij caviae, die tweemaal met Sendai-virus of parainfluenzavirus type 3 waren besmet.

Een viervoudige of grotere titerstijging van antistoffen werd als significant beschouwd; hieronder werd ook verstaan een stijging van de titer van de complementbindende antistoffen van  $<1 : 8$  tot tenminste  $1 : 16$  en een stijging van de titer van de hemagglutinerende antistoffen van  $<1 : 16$  tot tenminste  $1 : 32$ . Wanneer in de tekst of in tabellen van dit onderzoek wordt gesproken over vorming of ontwikkeling van antistoffen, of over caviae met antistoffen, doelen wij op dieren, waarbij een significante titerstijging van antistoffen is aangetoond.

## RESULTATEN

### *Primaire immunologische reactie*

Caviae werden intrasasaal besmet met Sendai-virus, parainfluenzavirus type 1, parainfluenzavirus type 3 of bofvirus. De uitkomsten van het onderzoek op de vorming van homologe antistoffen bij deze dieren zijn weergegeven in tabel 3 en in de figuren 1, 2, 3, 4 (zie blz. 35, 37, 41, 42). Uit tabel 3 blijkt, dat alle caviae, één uitgezonderd, antistoffen vormden tegen het virus, waarmee zij waren besmet; één van de 39 caviae, die met bofvirus waren besmet, ontwikkelde geen homologe antistoffen.

Tabel 3. *Vorming van homologe antistoffen bij 78 caviae na besmetting met parainfluenzavirus type 1 of type 3, Sendai-virus of bofvirus (primaire immunologische reactie)*

Aantal dagen na besmetting	Aantal dieren met antistoffen tegen								
	Parainfluenza type 1		Parainfluenza type 3		Sendai		Bof		
	CB	HAR	CB	HAR	CB	HAR	CB	HAR	
—3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
+3*	0	0	0	1	0	0	1	0	0
7	0	0	0	2	3	0	2	8	0
14	5	1	20	14	13	2	26	27	0
21	6	4	20	17	13	11	36	31	0
28	6	5	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	38	37	0
90	n.o.	n.o.	9	20	13	13	n.o.	n.o.	0
Aantal onderzochte dieren	6		20		13		39		0

CB: Complementbindende antistoffen.

HAR: Hemagglutinatieremmende antistoffen.

n.o.: niet onderzocht.

\*: +4 voor de dieren, die besmet waren met parainfluenzavirus type 1 of bofvirus.

De primaire immunologische reactie was type-specifiek. De dieren vormden uitsluitend antistoffen tegen het type, dat voor de besmetting was gebruikt. Heterotypische antistoffen werden niet ontwikkeld. Slechts één dier vormde een uitzondering hierop. Het betrof een caviae, die met bofvirus was besmet en daarna naast homologe antistoffen ook antistoffen ontwikkelde tegen parainfluenzavirus type 2; de heterotypische antistoffen

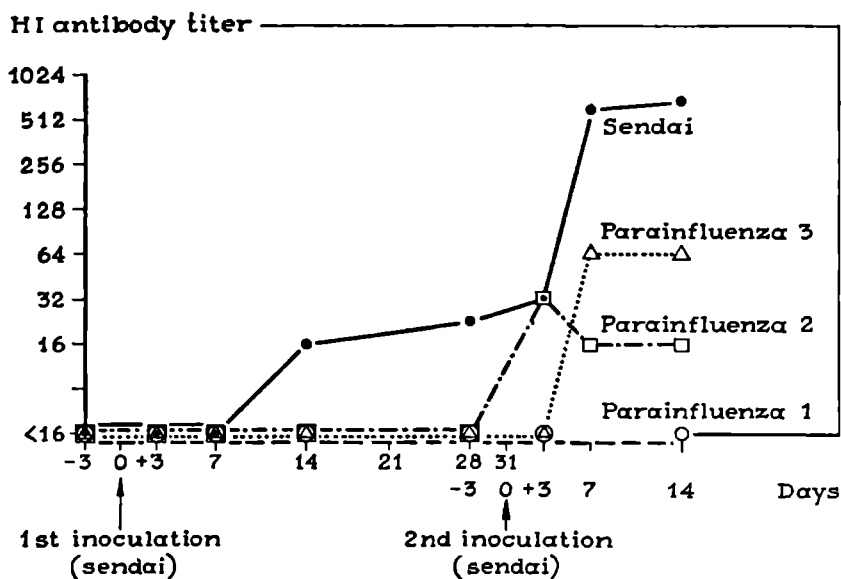
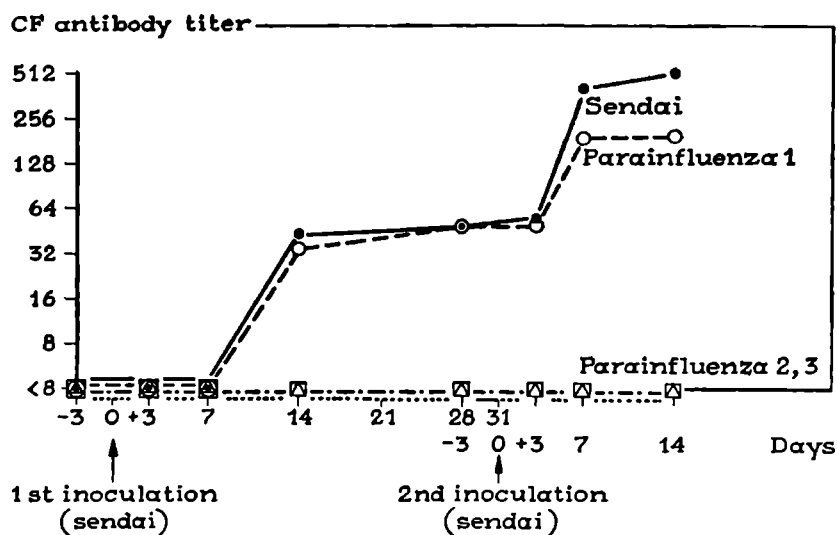


Fig. 1. Primaire en secundaire immunologische reactie bij 5 caviae, die waren besmet met Sendai-virus.

Meetkundige gemiddelden van de antistoftiters.

CF = complementbinding. HI = hemagglutinatieremming.

waren alleen aantoonbaar met de complementbindingsreactie. Er werden wel kruisreacties waargenomen tussen Sendai-virus en parainfluenzavirus type 1. Dit is echter geen heterotypische reactie, omdat beide virussen tot hetzelfde type worden gerekend (zie Hoofdstuk I). Het bleek, dat alle caviae, die met Sendai-virus waren besmet, antistoffen ontwikkelden tegen parainfluenzavirus type 1; deze antistoffen waren alleen met de complementbindingsreactie aantoonbaar. Omgekeerd vormde geen van de caviae, die met parainfluenzavirus type 1 waren besmet, antistoffen tegen Sendai-virus. Er werden dus kruisreacties in één richting gevonden tussen Sendai-virus en parainfluenzavirus type 1.

Uit de figuren 1, 2, 3, 4 (zie blz. 41, 42) en uit tabel 3 blijkt, dat de antistoffen vrij laat na de besmetting werden gevormd. Bij ongeveer 80% van de caviae waren op de 7e dag na de besmetting nog geen antistoffen aantoonbaar. Dertien van de 78 caviae vormden antistoffen tussen de 4e en 7e dag na de besmetting, 2 caviae vóór de 4e dag. In het algemeen is dus het verloop van de antistoftiters kenmerkend voor een primaire immunologische reactie. Complementbindende antistoffen werden in de regel eerder gevormd dan hemagglutinatieremmende antistoffen. Het verschil in het verloop van de titers van de beide soorten antistoffen werd vooral gezien bij caviae, die met één van de parainfluenzavirussen besmet waren. Er werd geen noemenswaardig verschil gevonden bij caviae, die met bofvirus waren besmet.

De controleproeven waren negatief. Bij de caviae, die met virus waren besmet, werden in geen enkel geval complementbindende antistoffen gevonden tegen controle-antigenen, die van onbeënte weefselkweken en van normale allantoïsvloeistof waren bereid. Acht caviae werden „besmet” met controlevloeistof: 4 met weefselkweekvloeistof en 4 met allantoïsvloeistof. Bij géén van deze caviae werden complementbindende antistoffen gevonden tegen de vloeistoffen, die voor de „besmetting” waren gebruikt, of tegen één van de virusantigenen.

### *Secundaire immunologische reactie*

Caviae werden tweemaal met een tussenpoos van 31 dagen besmet met hetzelfde virus. Het virus werd beide malen intranasaal toegediend. De proeven werden verricht met Sendai-virus, parainfluenzavirus type 1, parainfluenzavirus type 3 en bofvirus. De uitkomsten van het onderzoek op de vorming van homologe antistoffen bij deze dieren zijn weergegeven in tabel 4 en in de figuren 1, 2, 3 en 4 (zie blz. 38, 41, 42). Uit tabel 4 blijkt, dat alle caviae, die met parainfluenzavirus type 1 of 3, of met Sendai-virus waren besmet, homologe antistoffen vormden na de tweede besmetting. Dit was echter niet het geval bij 2 van de 5 caviae, die met bofvirus waren besmet.





Tabel 4. *Vorming van homologe antistoffen bij 23 caviae na herbesmetting met parainfluenzavirus type 1 of type 3, Sendai-virus of bofvirus (secundaire immunologische reactie)*

Aantal dagen na herbesmetting	Aantal dieren met antistoffen tegen							
	Parainfluenza type 1		Parainfluenza type 3		Sendai		Bof	
	CB	HAR	CB	HAR	CB	HAR	CB	HAR
—3	0	0	0	0	0	0	0	0
+3*	0	0	0	0	0	0	0	0
7	4	6	7	7	5	5	2	1
14	4	5	7	7	5	5	2	3
21	n.o.	n.o.	7	7	5	5	3	3
Aantal onderzochte dieren	6		7		5		5	

CB: Complementbindende antistoffen.

HAR: Hemagglutinatieremmende antistoffen.

n.o.: niet onderzocht.

\*: +4 voor de dieren, die besmet waren met parainfluenzavirus type 1 of bofvirus.

Evenals na een eerste besmetting werden ook na herbesmetting kruisreacties waargenomen tussen Sendai-virus en parainfluenzavirus type 1 (tabel 5, 6 en 9; figuur 1 en 2). Alle caviae (5 dieren), die voor de tweede maal met Sendai-virus waren besmet, ontwikkelden complementbindende antistoffen tegen parainfluenzavirus type 1, 3 ervan tevens hemagglutinatieremmende antistoffen. Na herbesmetting werden — in tegenstelling met de primaire immunologische reactie — ook kruisreacties in omgekeerde richting waargenomen (tabel 9). Alle caviae, die voor de tweede maal met parainfluenzavirus type 1 waren besmet, vormden antistoffen tegen Sendai-virus; deze antistoffen waren alleen met de complementbindingsreactie aantoonbaar. Uit het serologische reactiepatroon bij caviae, die tweemaal zijn besmet, blijkt opnieuw, dat Sendai-virus en parainfluenzavirus type 1 immunologisch nauw verwant zijn.

Na de tweede besmetting werd eerder ontwikkeling van antistoffen waargenomen dan na de eerste besmetting. Bij bijna 90% van de caviae werd op de 7e dag na de tweede besmetting een titerstijging van homologe antistoffen waargenomen (tabel 4). Daarentegen hadden slechts 20% van de caviae, die voor de eerste maal waren besmet, op de 7e dag antistoffen ontwikkeld (tabel 3). Complementbindende antistoffen werden na de tweede besmetting ongeveer even snel gevormd als hemagglutinatieremmende antistoffen. De antistoftiters liepen na de tweede besmetting op tot hogere waarden dan na de eerste besmetting. Het ver-

loop van de antistoftiters bij caviae, die voor de tweede maal waren besmet, is dus kenmerkend voor een secundaire immunologische reactie. Dit geldt niet alleen voor de vorming van homologe antistoffen, maar ook voor de ontwikkeling van heterologe en heterotypische antistoffen. In totaal werd na de tweede besmetting bij 18 dieren een titerstijging van heterologe of heterotypische antistoffen waargenomen. In 90% van de gevallen werd de titerstijging reeds op de 7e dag na de besmetting vastgesteld.

Tabel 5. *Vorming van heterotypische complementbindende antistoffen bij 5 caviae na besmetting en herbesmetting met Sendai-virus*

Aantal dagen na		Aantal dieren met antistoffen tegen		
Eerste besmetting	Tweede besmetting	Parainfluenza type 1	Parainfluenza type 2	Parainfluenza type 3
-3		0	0	0
+14		5	0	0
28	-3	5	0	0
34	+3	5*	0	0
38	7	5	0	0
45	14	5	0	0

\* Opnieuw viervoudige titerstijging van antistoffen.

Tabel 6. *Vorming van heterotypische hemagglutinerremmende antistoffen bij 5 caviae na besmetting en herbesmetting met Sendai-virus*

Aantal dagen na		Aantal dieren met antistoffen tegen		
Eerste besmetting	Tweede besmetting	Parainfluenza type 1	Parainfluenza type 2	Parainfluenza type 3
-3		0	0	0
+14		0	0	0
28	-3	0	0	0
34	+3	0	1	0
38	7	0	1	2
45	14	3	1	2

De controleproeven waren negatief. Bij géén van de caviae werden na de tweede besmetting complementbindende antistoffen gevonden tegen controle-antigenen, die van onbeënte weefselkweken en van normale allantoïsvloeistof waren bereid. Bij één cavia, die tweemaal met Sendai-virus was besmet, werden weliswaar complementbindende antistoffen tegen normale allantoïsvloeistof gevonden, maar deze uitslag mag niet als een positieve controleproef worden beschouwd, omdat het onderzoek negatief uitviel, toen het controle-antigeen in dezelfde verdunning werd gebruikt als het Sendai-virusantigeen. Acht caviae werden tweemaal „besmet” met controlevloeistoffen: 4 met weefselkweekvloeistof en 4 met allantoïsvloeistof. Géén van de caviae ontwikkelde antistoffen tegen de vloeistoffen, die voor de „besmetting” waren gebruikt of tegen één van de virusantigenen.

Tabel 7. *Vorming van heterotypische complementbindende antistoffen bij 7 caviae na besmetting en herbesmetting met parainfluenzavirus type 3*

Aantal dagen na		Aantal dieren met antistoffen tegen		
Eerste besmetting	Tweede besmetting	Parainfluenza type 1	Sendai	Parainfluenza type 2
—3		0	0	0
+14		0	0	0
28	—3	0	0	0
34	+3	0	0	0
38	7	3	4	1
45	14*	(4)	(3)	(2)

\* Op dit tijdstip was niet van alle dieren bloed afgenomen.

Tabel 8. *Vorming van heterotypische hemagglutinatieremmende antistoffen bij 7 caviae na besmetting en herbesmetting met parainfluenzavirus type 3*

Aantal dagen na		Aantal dieren met antistoffen tegen		
Eerste besmetting	Tweede besmetting	Parainfluenza type 1	Sendai	Parainfluenza type 2
—3		0	0	0
+14		0	0	0
28	—3	0	0	0
34	+3	0	1	0
38	7	0	3	0
45	14*	(0)	(2)	(1)

\* Op dit tijdstip was niet van alle dieren bloed afgenomen.

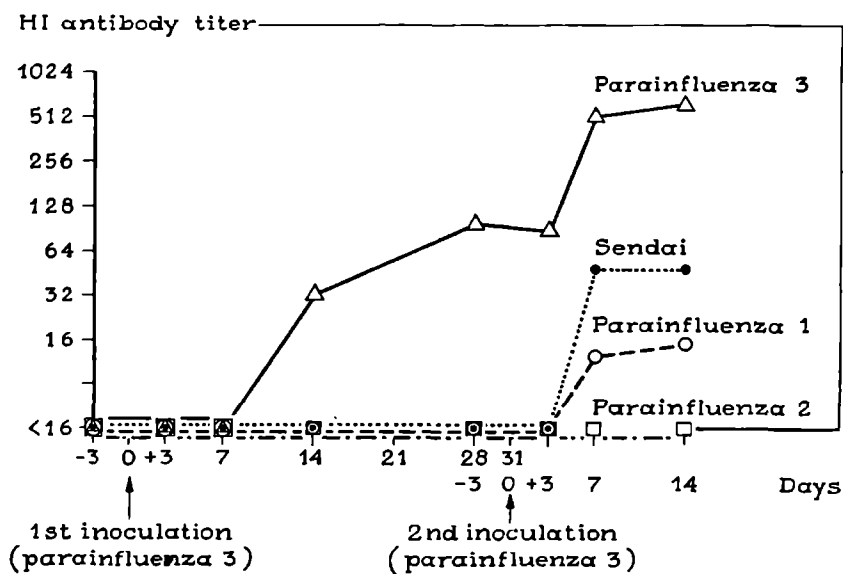
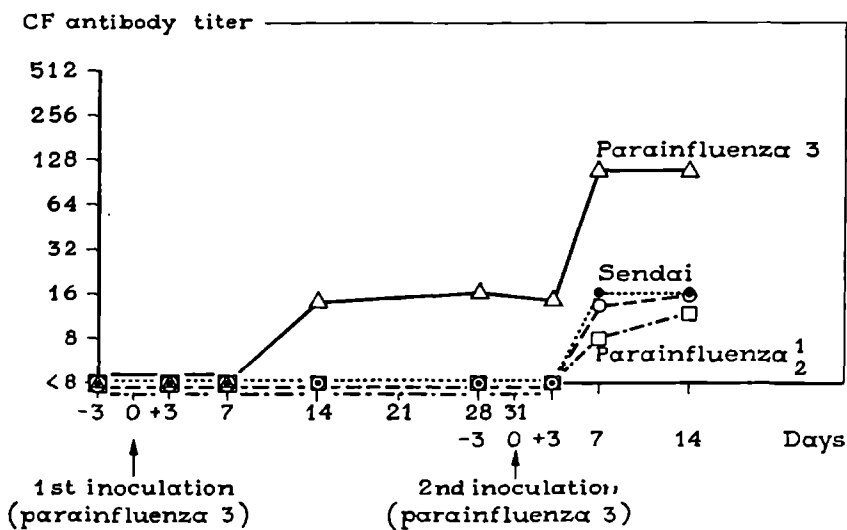


Fig. 3. Primaire en secundaire immunologische reactie bij 7 caviae, die waren besmet met parainfluenzavirus type 3.  
 Meetkundige gemiddelden van de antistoftiters.  
 CF = complementbinding. HI = hemagglutinatieremming.

Tabel 9. *Vorming van antistoffen tegen Sendai-virus bij 6 caviae na besmetting en herbesmetting met parainfluenzavirus type 1*

Aantal dagen na		Aantal dieren met antistoffen tegen Sendai-virus	
Eerste besmetting	Tweede besmetting	Complementbindende antistoffen	Hemagglutinatie-remmende antistoffen
-3		0	0
+14		0	0
28	-3	0	0
38	+7	6	0
59	28	6	0

De secundaire immunologische reactie werd ook onderzocht bij caviae, die op een andere wijze waren geïmmuniseerd. De dieren werden eerst intranasaal met virus besmet. Dertig dagen later werden ze opnieuw met hetzelfde virus geïmmuniseerd door vijfmaal — met een tussenpoos van één dag — 1 ml virus intraperitoneaal toe te dienen. Het onderzoek werd verricht met Sendai-virus en parainfluenzavirus type 3. Drie dagen vóór de intranasale besmetting en 7 dagen na de laatste intraperitoneale injectie werd bloed afgenomen voor serologisch onderzoek. De uitkomsten van het onderzoek op de vorming van homologe en heterologe antistoffen bij deze dieren zijn weergegeven in tabel 10 en 11. Uit proeven met controle-antigenen bleek, dat er na de parenterale toediening van Sendai-virus complementbindende antistoffen tegen normale allantoïis-

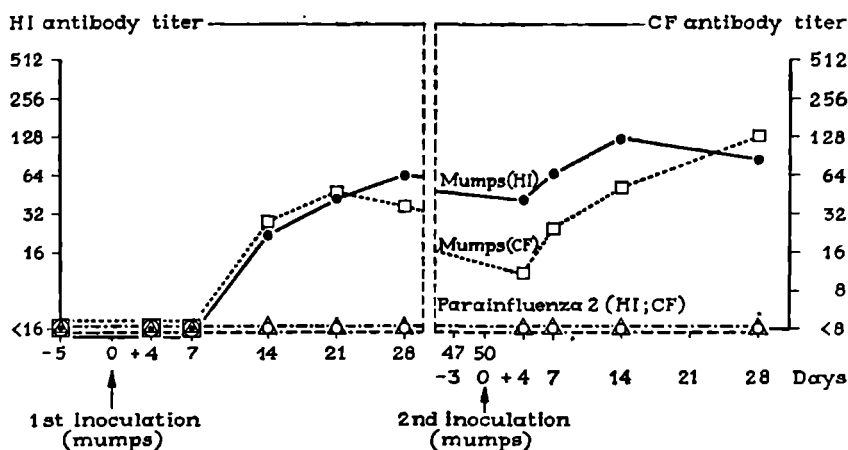


Fig. 4. *Primaire en secundaire immunologische reactie bij 5 caviae, die waren besmet met bofvirus.*

*Meetkundige gemiddelden van de antistoftiters.*

*CF = complementbinding. HI = hemagglutinatie-remming.*

Tabel 10. *Vorming van hemagglutinatieremmende antistoffen bij 8 caviae na intranasale en intraperitoneale toediening van parainfluenzavirus type 3 of Sendai-virus*

Hyperimmunisatie met	Aantal dieren met antistoffen tegen			
	Sendai	Parainfluenza type 1	Parainfluenza type 2	Parainfluenza type 3
Parainfluenzavirus type 3	6	5	2	8
Sendai-virus	8	6	3	7

Tabel 11. *Vorming van complementbindende antistoffen bij 8 caviae na intranasale en intraperitoneale toediening van parainfluenzavirus type 3 of Sendai-virus*

Hyperimmunisatie met	Aantal dieren met antistoffen tegen			
	Sendai	Parainfluenza type 1	Parainfluenza type 2	Parainfluenza type 3
Parainfluenzavirus type 3	4	n.o.	n.o.	n.o.
Sendai-virus	n.o.	8	0	0

vloeistof waren gevormd en na toediening van parainfluenzavirus type 3 complementbindende antistoffen tegen normale weefselkwekvlloeistof. In verband hiermee is geen onderzoek verricht op complementbindende antistoffen tegen het homologe virus en tegen de heterologe virussen, die op dezelfde wijze (in kippenembryo's of in weefselkweken) waren gekweekt als het homologe virus.

Tabel 10 laat zien, dat alle caviae, die met Sendai-virus of parainfluenzavirus type 3 waren geïmmuniseerd, homologe antistoffen vormden. Een vrij groot aantal dieren ontwikkelde tevens heterotypische antistoffen (tabel 10 en 11); hemagglutinatieremmende antistoffen werden vaker gevormd dan complementbindende antistoffen. De titers van de heterotypische hemagglutinatieremmende antistoffen waren in de meeste gevallen laag (1:32 of 1:64). Uit dit onderzoek blijkt, dat hyperimmunisatie van vroeger besmette caviae door middel van intraperitoneale toediening van virus ongeveer dezelfde uitwerking heeft als besmetting van caviae voor de tweede maal. In beide gevallen werden door een aantal dieren heterotypische antistoffen gevormd. Het onderzoek geeft de indruk, dat herhaalde intraperitoneale toediening van virus een sterkere immuniserende werking heeft ten aanzien van heterologe typen dan een intranasale besmetting voor de tweede maal.

### *Anamnestiche reactie*

Caviae werden eerst besmet met Sendai-virus en 93 dagen later met parainfluenzavirus type 3 en omgekeerd. Een andere groep caviae werd achtereenvolgens — met een interval van 50 dagen — besmet met bof-virus en parainfluenzavirus type 3 en omgekeerd. Het virus werd in alle gevallen intranasaal toegediend. Na de eerste besmetting ontwikkelden alle dieren homologe antistoffen, geen enkel dier heterotypische antistoffen.

Tabel 12. *Vorming van antistoffen bij 13 caviae na besmetting met achtereenvolgens parainfluenzavirus type 3 en Sendai-virus*

Aantal dagen na besmetting met Sendai-virus	Aantal dieren, dat antistoffen ontwikkelde tegen			
	Complementbindende antistoffen		Hemagglutinatieremmende antistoffen	
	Parainfluenza type 3	Sendai	Parainfluenza type 3	Sendai
—3	0	0	0	0
+3	0	0	1	0
7	7	5	5	3
14	7	8	8	6
21	7	8	9	7

Tabel 13. *Vorming van antistoffen bij 15 caviae na besmetting met achtereenvolgens Sendai-virus en parainfluenzavirus type 3*

Aantal dagen na besmetting met parainfluenzavirus type 3	Aantal dieren, dat antistoffen ontwikkelde tegen			
	Complementbindende antistoffen		Hemagglutinatieremmende antistoffen	
	Sendai	Parainfluenza type 3	Sendai	Parainfluenza type 3
—3	0	0	0	0
+3	0	0	1	0
7	1	0	4	3
14	10	11	12	13
21	13	13	13	13

De uitkomsten van het onderzoek op de vorming van antistoffen bij de dieren, die voor de tweede maal met Sendai-virus of parainfluenzavirus type 3 waren besmet, zijn weergegeven in tabellen 12 en 13 en in de figuren 5 en 6 (blz. 46, 47). Alle caviae ontwikkelden antistoffen tegen het virus, waarmee ze de tweede maal waren besmet. Wel waren deze antistoffen in een deel der gevallen slechts door middel van één serologische reactie aantoonbaar. Het serologische reactiepatroon na de tweede besmetting bleek te verschillen van dat na een primaire immunologische reactie. Naast homologe antistoffen werden ook heterologe antistoffen gevormd tegen het type, waarmee de dieren drie maanden tevoren waren besmet. Deze anamnestiche reactie werd waargenomen bij 22 van de 28 caviae. De immunologische reactie na de tweede besmetting bleef beperkt tot de ontwikkeling van homologe antistoffen en van antistoffen tegen het virus, waarmee het dier vroeger geïnfecteerd was. Door geen enkel dier werden antistoffen gevormd tegen parainfluenzavirus type 2. Caviae, die eerst met Sendai-virus waren besmet en daarna met parainfluenzavirus type 3, toonden echter in enkele gevallen niet alleen een anamnestiche reactie tegen Sendai-virus maar ook tegen het hieraan nauw verwante parainfluenzavirus type 1; 3 van de 13 dieren, die antistoffen tegen Sendai-virus vormden, ontwikkelden tevens antistoffen tegen type 1. De anamnestiche reactie lijkt dus type-specifiek te zijn.

De anamnestiche reactie ontwikkelde zich vrij spoedig na de tweede besmetting. Bij 22 caviae werd een titerstijging van heterotypische antistoffen waargenomen. In 12 gevallen (55%) werd de titerstijging reeds op de 7e dag na de besmetting vastgesteld. Homologe antistoffen werden na de tweede besmetting niet veel sneller gevormd dan bij een primaire immunologische reactie. Door 28 caviae werden na de tweede besmetting homologe antistoffen gevormd; 9 dieren (ongeveer 32%) hadden op de 7e dag antistoffen ontwikkeld. Bij de primaire immunologische reactie tegen Sendai-virus en parainfluenzavirus type 3 werd bij 3 (ongeveer 23%) van de 13 onderzochte dieren homologe antistoffen gevonden op de 7e dag na de besmetting (tabel 3).



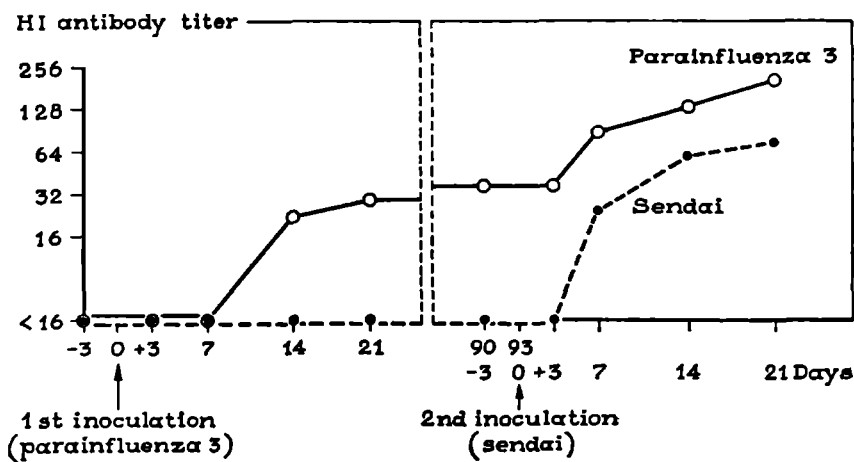
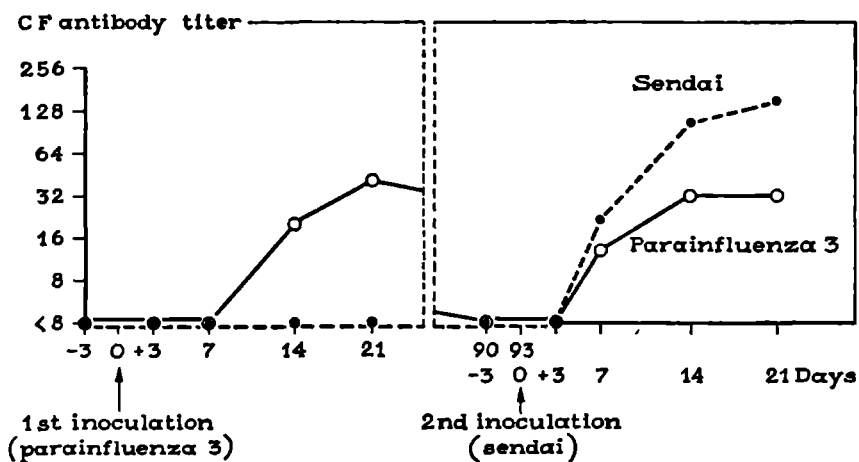


Fig. 5. Vorming van antistoffen bij 13 caviae, die achtereenvolgens met parainfluenzavirus type 3 en Sendai-virus waren besmet. Meetkundige gemiddelden van de antistoftiters. CF = complementbinding. HI = hemagglutinatieremming.

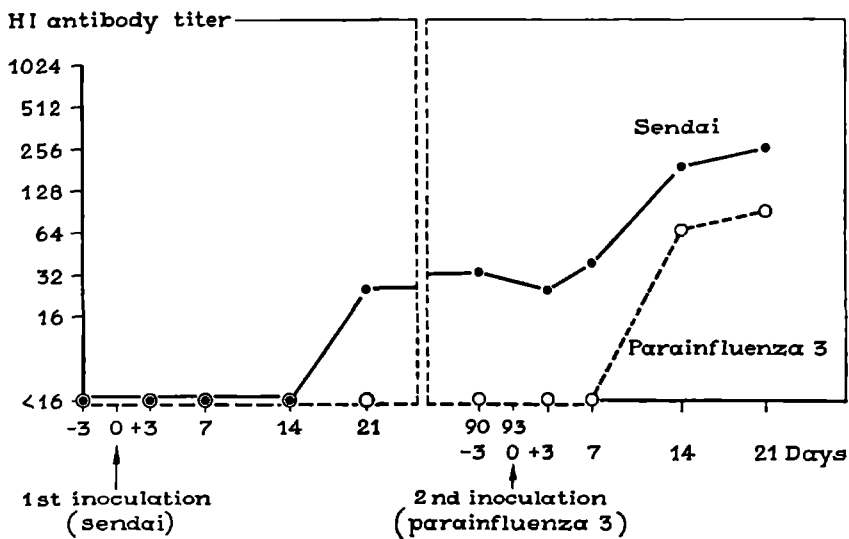
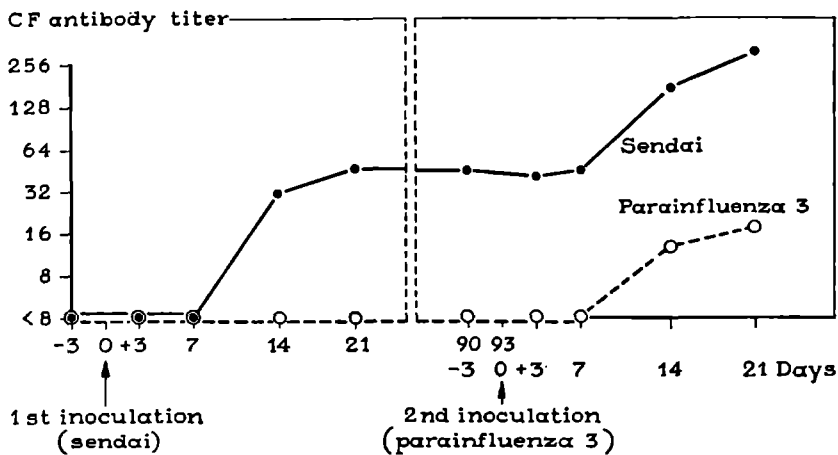


Fig. 6. *Vorming van antistoffen bij 15 caviae, die achtereenvolgens met Sendai-virus en parainfluenzavirus type 3 waren besmet. Meetkundige gemiddelden van de antistoftiters.*

*CF = complementbinding. HI = hemagglutinatie-remming.*

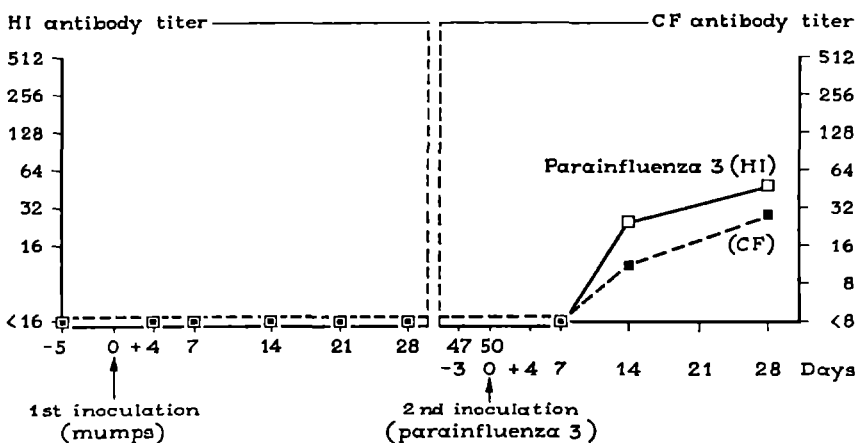
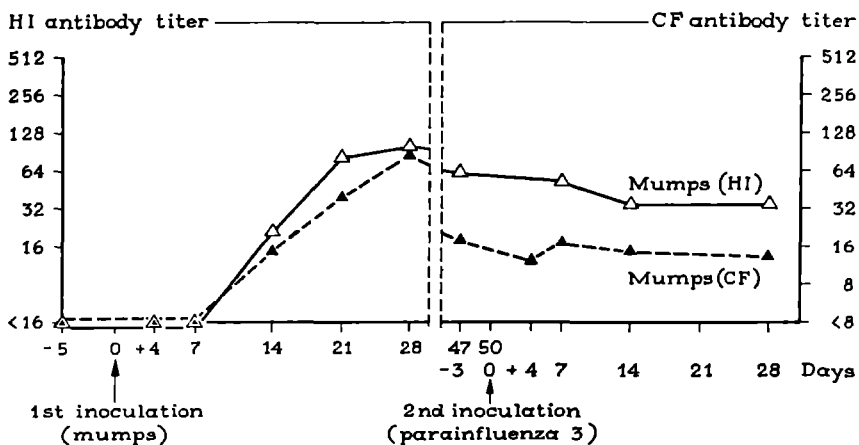


Fig. 7. Vorming van antistoffen bij 11 caviae, die achtereenvolgens met bofvirus en parainfluenzavirus type 3 waren besmet.  
 Meetkundige gemiddelden van de antistoftiters.  
 CF = complementbinding. HI = hemagglutinatieremming.

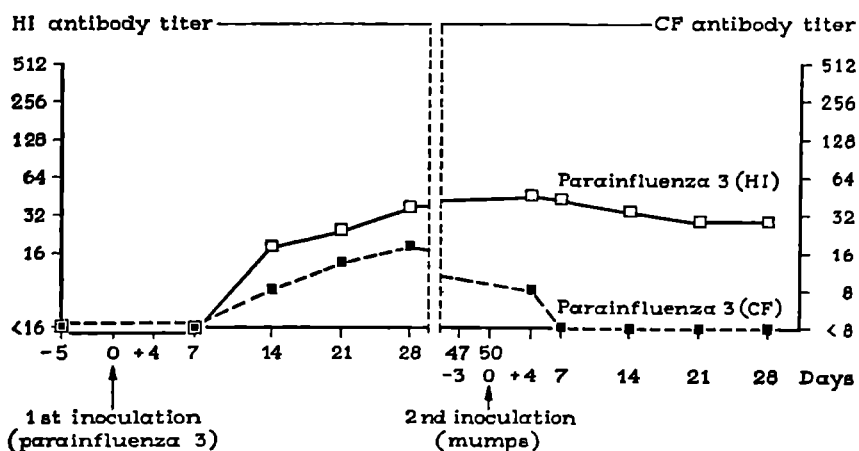
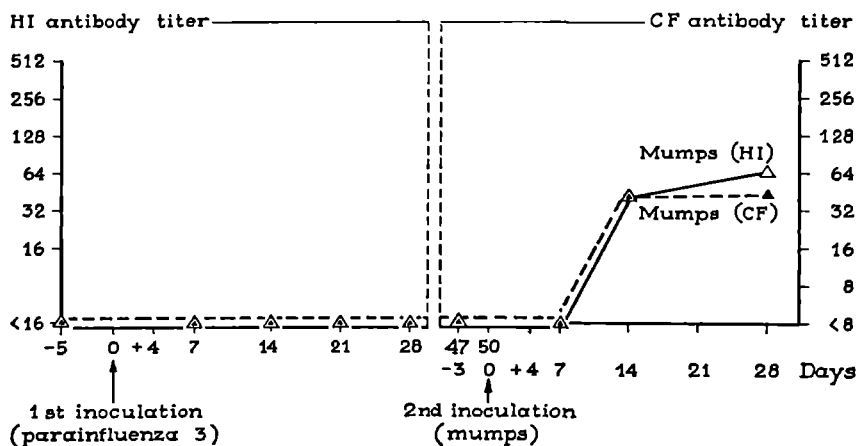


Fig. 8. *Vorming van antistoffen bij 15 caviae, die achtereenvolgens met parainfluenzavirus type 3 en bofvirus waren besmet. Meetkundige gemiddelden van de antistoftiters. CF = complementbinding. HI = hemagglutinatieremming.*

De uitkomsten van het onderzoek op de vorming van antistoffen bij dieren, die eerst met bofvirus en later met parainfluenzavirus type 3 en omgekeerd, waren besmet, zijn weergegeven in de tabellen 14 en 15 en in de figuren 7, 8 en 9. Alle caviae ontwikkelden antistoffen tegen het virus, waarmee ze de tweede maal waren besmet. In geen enkel geval werd echter een anamnestiche reactie waargenomen. Wel vormden 16 van de 26 onderzochte caviae na de tweede besmetting antistoffen tegen parainfluenzavirus type 2; de titers van de heterotypische antistoffen waren laag. Het titerverloop van de heterotypische antistoffen hield het midden tussen dat van een secundaire immunologische reactie en dat van een primaire immunologische reactie. Wel waren bij 8 (50%) van de 16 dieren al op de 4e dag heterotypische antistoffen aantoonbaar.

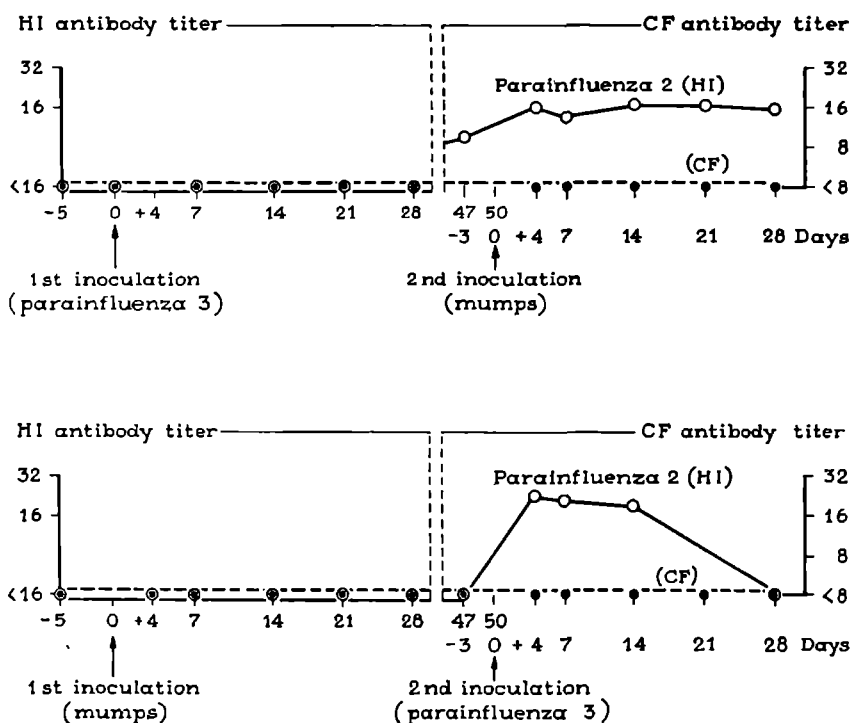


Fig. 9. Vorming van antistoffen tegen parainfluenzavirus type 2 bij 26 caviae, die achtereenvolgens met bofvirus en parainfluenzavirus type 3, en omgekeerd, waren besmet.

Meetkundige gemiddelden van de antistoftiters.

CF = complementbinding. HI = hemagglutinatieremming.

Het is moeilijk deze bevindingen te interpreteren. Bij de primaire immunologische reactie tegen bofvirus werd door slechts één van de 39 onderzochte caviae heterotypische antistoffen tegen parainfluenzavirus type 2 gevormd, bij de secundaire reactie door twee van de 5 onderzochte caviae. Bij de primaire en secundaire immunologische reactie tegen parainfluenzavirus type 3 werden door respectievelijk géén van de 20 en twee van de 7 onderzochte dieren antistoffen tegen parainfluenzavirus type 2 ontwikkeld.

Tabel 14. *Vorming van antistoffen bij 15 caviae na besmetting met achtereenvolgens parainfluenzavirus type 3 en bofvirus*

Aantal dagen na besmetting met bofvirus	Aantal dieren, dat antistoffen ontwikkelde tegen			
	Complementbindende antistoffen *		Hemagglutineremmende antistoffen *	
	Bof	Parainfluenzavirus type 2	Bof	Parainfluenzavirus type 2
—5	0	0	0	1
+4	0	0	1	5
7	2	3	7	6
14	15	4	15	7
28	15	4	15	7

\* Geen van de dieren ontwikkelde antistoffen tegen parainfluenzavirus type 1, Sendai-virus en parainfluenzavirus type 3 na besmetting met bofvirus.

Tabel 15. *Vorming van antistoffen bij 11 caviae na besmetting met achtereenvolgens bofvirus en parainfluenzavirus type 3*

Aantal dagen na besmetting met parainfluenzavirus type 3	Aantal dieren, dat antistoffen ontwikkelde tegen			
	Complementbindende antistoffen *		Hemagglutineremmende antistoffen *	
	Parainfluenzavirus		Parainfluenzavirus	
	type 3	type 2	type 3	type 2
— 5	0	0	0	0
+4	0	0	0	3
7	0	0	1	5
14	11	3	9	8
28	11	3	11	3

\* Geen van de dieren ontwikkelde antistoffen tegen parainfluenzavirus type 1, Sendai-virus en bofvirus na besmetting met parainfluenzavirus type 3.

De controleproeven waren negatief. Het onderzoek met controle-antigenen was negatief. Zeven caviae werden eerst met parainfluenzavirus type 3 en vervolgens met normale allantoïsvloeistof „besmet”. Acht caviae werden achtereenvolgens met Sendai-virus en normale kweekvloeistof besmet. Twee caviae werden eerst met bofvirus en vervolgens met normale kweekvloeistof besmet. Bij geen van deze dieren werd na de tweede „besmetting” een ontwikkeling van complementbindende antistoffen tegen de controle-vloeistoffen of een anamnestiche reactie waargenomen.

## BESCHOUWINGEN

Uit het onderzoek blijkt, dat Sendai-virus en parainfluenzavirus type 1 immunologisch nauw verwant zijn. Dit kwam bij de secundaire immunologische reactie sterker tot uiting dan bij de primaire immunologische reactie. Deze bevindingen vormen een krachtige steun voor de opvatting, dat Sendai-virus en parainfluenzavirus type 1 tot eenzelfde immunologisch type behoren. Kruisreacties tussen beide virussen werden vaker gevonden bij caviae, die met Sendai-virus waren besmet, dan bij dieren, die met parainfluenzavirus type 1 waren besmet. Dit zou kunnen worden verklaard door aan te nemen, dat eenzelfde antigene component(en) op beide virussen voorkomt, maar op Sendai-virus rijker vertegenwoordigd is dan op parainfluenzavirus type 1. Het is ook denkbaar, dat de structuur en de lokalisatie van deze component niet gelijk is voor beide virussen en dat tengevolge hiervan het vermogen om antistoffen op te wekken of om met antistoffen te reageren, enigszins verschilt.

Het onderzoek heeft verder aangetoond, dat verschillende typen parainfluenzavirussen immunologisch aan elkaar verwant zijn. Kruisreacties tussen parainfluenzavirus type 3 enerzijds en Sendai-virus of parainfluenzavirus type 1 anderzijds werden vaker waargenomen dan die tussen andere typen. Toch was de verwantschap tussen type 3 en Sendai-virus, c.q. type 1, niet zo sterk als die tussen Sendai-virus en parainfluenzavirus type 1. Kruisreacties tussen de eerstgenoemde virussen werden alleen bij een secundaire immunologische reactie gevonden, niet bij een primaire reactie. Het ligt dus voor de hand type 1 en type 3 als afzonderlijke typen te blijven beschouwen.

De antigene verwantschap tussen parainfluenzavirus type 3 en Sendai-virus, c.q. parainfluenzavirus type 1, berust vermoedelijk op de aanwezigheid van eenzelfde antigene component(en) bij beide virussen. Wij hebben een poging gedaan deze component aan te tonen door middel van de diffusie-precipitatie methode volgens Ouchterlony. Hierbij werd gebruik gemaakt van antisera, die bereid waren bij konijnen. De methode is beschreven in Hoofdstuk II. In het antiserum tegen Sendai-virus was één soort antistoffen aantoonbaar, die waren gericht tegen het homologe virus. In het antiserum tegen parainfluenzavirus type 3 werden twee soorten antistoffen tegen het homologe virus gevonden. Het gelukte niet antistoffen aan te tonen, die waren gericht tegen een antigene component, die bij beide virussen voorkomt.

Er werden geen aanwijzingen gevonden voor een antigene verwantschap tussen bofvirus en parainfluenzavirus type 3, evenmin voor een verwantschap tussen bofvirus en parainfluenzavirus type 1 of Sendai-virus. Daarentegen werden er wel kruisreacties waargenomen tussen bofvirus en parainfluenzavirus type 2. De kruisreacties werden slechts éénmaal waargenomen bij dieren met een primaire immunologische reactie tegen bofvirus, echter betrekkelijk vaak bij dieren, die tweemaal met bofvirus waren besmet of die achtereenvolgens met bofvirus en parainfluenzavirus type 3 en omgekeerd, waren besmet. Het is mogelijk, dat de kruisreacties berusten op de aanwezigheid van eenzelfde antigene component(en) in bofvirus, parainfluenzavirus type 2 en parainfluenzavirus type 3; de hoeveelheid, de kwaliteit en de lokalisatie van de antigene component in deze virussen zou kunnen verschillen. Het is ook denkbaar, dat de kruisreacties het gevolg zijn van een vroegere infectie van de gebruikte caviae met SV<sub>5</sub>-virus. In Hoofdstuk I is erop gewezen, dat SV<sub>5</sub>-virus nauw verwant is aan parainfluenzavirus type 2. Indien men verder aanneemt, dat bofvirus in geringe mate verwant is aan SV<sub>5</sub>-virus, dan zou er na besmetting van caviae met bofvirus een anamnestiche reactie tegen SV<sub>5</sub>-virus kunnen ontstaan, die gepaard zou gaan met de ontwikkeling van antistoffen tegen parainfluenzavirus type 2.

In verband met het bovenstaande hebben wij achteraf een onderzoek ingesteld naar het voorkomen van infecties met SV<sub>5</sub>-virus bij caviae, die in onze studie waren betrokken. Het onderzoek werd verricht bij 200 caviae. Sera, die bij deze dieren waren afgenomen, voordat ze voor het eerst met virus waren besmet, werden onderzocht op de aanwezigheid van hemagglutinatieremmende en complementbindende antistoffen tegen SV<sub>5</sub>-virus. Bij géén van de dieren werden hemagglutinatieremmende antistoffen gevonden. Slechts bij drie dieren werden complement-



bindende antistoffen aangetroffen: de titers waren laag (1:16, 1:16, 1:32). Het antigeen, dat voor de complementbindingsreactie werd gebruikt, was niet anti-complementair. Dit wijst erop, dat er in het serum van de caviae, die dienden als donores van complement, evenmin antistoffen tegen SV<sub>5</sub>-virus aanwezig waren. Op grond van de uitkomsten van deze proeven en op grond van het feit, dat de onderzochte caviae slechts ongeveer 3 maanden oud waren, mag worden aangenomen, dat de door ons gebruikte caviae niet — of slechts bij zeer hoge uitzondering — waren geïnfecteerd met SV<sub>5</sub>-virus, voordat ze in de proef werden opgenomen. Het is natuurlijk niet uitgesloten, dat de dieren naderhand in het verloop van de studie met SV<sub>5</sub>-virus werden geïnfecteerd. Het is echter van belang er in dit verband op te wijzen, dat er tijdens de periode van het onderzoek in ons laboratorium géén experimenten met SV<sub>5</sub>-virus werden verricht; het serologisch onderzoek op SV<sub>5</sub>-virus werd gedaan na afloop van de proeven op dieren.

In tegenstelling met de uitkomsten van onze studie vonden CHANG en HSIUNG (1962) en VON EULER e.a. (1963) veelvuldig antistoffen tegen SV<sub>5</sub>-virus in sera van caviae. Deze onderzoekers maakten gebruik van de DA-virusstam, die serologisch identiek is aan SV<sub>5</sub>-virus. De sera werden onderzocht op hemagglutinatieremmende en neutraliserende antistoffen. Het was niet mogelijk de complementbindingsreactie toe te passen vanwege de aanwezigheid van antitoffen tegen SV<sub>5</sub>-virus in complement. Het verschil tussen onze bevindingen en die van de bovengenoemde Amerikaanse onderzoekers berust waarschijnlijk op het verschil in herkomst van de caviae en waarschijnlijk ook op het feit, dat wij jonge caviae hebben gebruikt voor onze proeven en bij het bereiden van complement. De kant op infecties, inclusief infectie met SV<sub>5</sub>-virus, neemt toe met de leeftijd.

Uit het voorgaande volgt, dat de kruisreacties tussen bofvirus en parainfluenzavirus type 2 vermoedelijk niet berusten op een anamnestiche reactie van de gebruikte caviae tegen SV<sub>5</sub>-virus. De antigenetiekingen tussen deze virussen kunnen waarschijnlijk verder worden opgehelderd door middel van serologische onderzoeken bij caviae, die achtereenvolgens met bofvirus en parainfluenzavirus type 2 en omgekeerd, worden besmet. Wij hebben geen nader onderzoek over dit onderwerp verricht.

Uit de studie blijkt, dat serologisch onderzoek bij caviae met een primaire immunologische reactie een weinig gevoelige methode is voor het opsporen van antigenetiekingen tussen parainfluenzavirussen. Caviae met een secundaire immunologische reactie tengevolge van herhaalde besmetting of van herhaalde intraperitoneale toediening van virus, tonen veel vaker kruisreacties. Hyperimmunisatie door middel van intraperitoneale toediening van betrekkelijk grote doses virus heeft het nadeel, dat antistoffen kunnen worden opgewekt tegen celantigenen, die

in het viruspreparaat aanwezig zijn, en dat tengevolge hiervan ongewenste kruisreacties ontstaan. Daarom verdient het de voorkeur caviae te immuniseren door intranasale besmetting met een kleine dosis virus. Men mag aannemen, dat de besmetting tot een infectie bij de gastheer leidt en dat antistoffen, die na de besmetting aantoonbaar zijn, zijn opgewekt door virus, dat tijdens de infectie is gevormd. Onderzoek op anamnestiche reacties bij caviae, die achtereenvolgens met twee verschillende virussen worden besmet, is een zeer gevoelige methode om antigene verwantschap op te sporen. Het verdient aanbeveling deze methode op uitgebreidere schaal toe te passen bij de analyse van de antigene structuur van virussen.

Het is uit deze studie en uit andere onderzoeken (zie Hoofdstuk I) duidelijk, dat door herhaalde infecties van een gastheer met hetzelfde virus of met verwante virussen een breder spectrum van antistoffen wordt opwekt. Van dit fenomeen zou gebruik kunnen worden gemaakt bij de toepassing van vaccins tegen virusziekten. Aan de andere kant vormt de verbreding van het antistofspectrum een beperking van de mogelijkheden van de serologische diagnostiek van virusinfecties; in verband met het vóórkomen van kruisreacties is het in vele gevallen niet geoorloofd alleen op grond van de uitkomsten van het serologisch onderzoek een specifieke etiologische diagnose te stellen. Het is van belang ook bij de bereiding van type-specifieke antisera bij dieren rekening te houden met de verbreding van het antistofspectrum na hyperimmunisatie. Het verdient aanbeveling voor de typering van virustammen uitsluitend gebruik te maken van antisera, die zijn afgenomen tijdens een primaire immunologische reactie.

## HOOFDSTUK IV

### VORMING VAN ANTISTOFFEN TEGEN PARAINFLUENZAVIRUSSEN BIJ PATIËNTEN

Bij 18 patiënten, die met parainfluenzavirus waren geïnfecteerd, werd een onderzoek verricht naar de vorming van homotypische en heterotypische antistoffen. Bij alle patiënten was parainfluenzavirus uit de keel geïsoleerd. Het type van de geïsoleerde virusstam was bepaald door middel van de hemadsorptieremmingsreactie, de hemagglutinatieremmingsreactie en (of) de complementbindingsreactie met type-specifieke antisera. De patiënten waren kinderen. Ze waren in 1962 of 1963 wegens een acute aandoening van de luchtwegen en (of) de longen in een van de volgende ziekenhuizen opgenomen: St. Elisabeth-Ziekenhuis te Tilburg, Sanatorium Dekkerswald, St. Canisius-Ziekenhuis en St. Radboud-Ziekenhuis te Nijmegen. Bij de patiënten was in de eerste dagen van de ziekte en in de tweede of derde week na het begin van de ziekte bloed afgenomen.

Verder werd serologisch onderzoek op parainfluenzavirussen verricht bij 50 patiënten met mononucleosis infectiosa; 25 van hen waren jonger dan 10 jaar, 25 ouder. Ze waren in de jaren 1957 tot en met 1962 gedurende enige tijd opgenomen in het St. Elisabeth-Ziekenhuis te Tilburg. Bij de patiënten was in de eerste week van de ziekte en twee of meer weken later bloed afgenomen. Alle patiënten hadden antistoffen tegen schapenerythrocyten ontwikkeld, die niet werden geadsorbeerd door een suspensie van cavia-nierweefsel. Dit was aangetoond met de reactie van Paul-Bunnell. Voordat de sera werden onderzocht met de complementbindingsreactie, werden de antistoffen tegen schapenerythrocyten verwijderd door de sera te behandelen met gewassen schapenerythrocyten. Deze behandeling had géén invloed op de titers van antistoffen tegen parainfluenzavirussen. Het bleek, dat de antistoftiters van antisera, die bij caviae waren bereid en met schapenerythrocyten waren behandeld, vóór en na de behandeling even hoog waren. Voor het onderzoek op hemagglutinatieremmende antistoffen werden onbehandelde sera gebruikt.

De serumparen van de patiënten met parainfluenzavirusinfectie en van de lijders aan mononucleosis infectiosa werden onderzocht op complementbindende en hemagglutinatieremmende antistoffen tegen parainfluenzavirus type 1, 2, 3 en Sendai-virus.

Tabel 16. *Vorming van antistoffen bij 18 patiënten, bij wie parainfluenzavirus geïsoleerd is*

Geïsoleerd virus	Totaal aantal gevallen	Aantal patiënten, dat antistoffen ontwikkelde tegen							
		Sendai-virus		Parainfluenzavirus					
				type 1		type 2		type 3	
		CB**	HAR**	CB	HAR	CB	HAR	CB	HAR
Parainfluenzavirus type 1	9	5	1	8	4	0	0	2	3
Parainfluenzavirus type 2	4	0	1	0	0	3	2	0	0
Parainfluenzavirus type 3	5	1	2	1	0	0	0	4	3

\* Viervoudige of grotere titerstijging.

\*\* CB: Complementbindende antistoffen.

HAR: Hemagglutinatieremmende antistoffen.

Tabel 17. *Ontwikkeling van antistoffen tegen parainfluenzavirussen bij 50 patiënten met mononucleosis infectiosa*

Significante titerstijging van antistoffen tegen	Aantal serologisch positieve patiënten	Positieve serologische reacties		
		HAR-reactie* alleen	CB-reactie* alleen	Beide reacties
Parainfluenza type 1	0	0	0	0
Sendai	3	3	0	0
Parainfluenza type 2	2	2	0	0
Parainfluenza type 3	2	2	0	0
Parainfluenza type 2 en 3	1	1	0	0
Totaal	8	8	0	0

\* HAR: Hemagglutinatieremming.

CB: Complementbinding.

## RESULTATEN

De uitkomsten van de onderzoeken bij patiënten met parainfluenza-virusinfectie zijn in tabel 16 weergegeven. Vijftien van de 18 patiënten vormden antistoffen tegen één of meer parainfluenzavirussen. Het serologisch onderzoek liet in 3 gevallen in de steek. Alle patiënten, bij wie het serologisch onderzoek positief was, ontwikkelden antistoffen tegen het virus, dat de infectie had veroorzaakt. Zes van hen vormden bovendien antistoffen tegen een ander type virus (Sendai-virus en parainfluenzavirus type 1 werden als variëteiten van één type beschouwd). De gemiddelde titerstijging van homotypische complementbindende en hemagglutineremmende antistoffen tegen type 3 bij patiënten met infectie door dit virus was respectievelijk viervoudig en zestienvoudig. De gemiddelde titerstijging van heterotypische antistoffen tegen type 3 bij patiënten met infectie door type 1 was zowel voor de complementbindende als voor de hemagglutineremmende antistoffen viervoudig. Alleen bij het onderzoek door middel van de hemagglutineremmingsreactie werd dus een verschil gevonden in de mate waarin homotypische en heterotypische antistoffen werden gevormd. Het is van belang er op te wijzen, dat deze getallen berusten op de bevindingen bij enkele patiënten. Zoals te verwachten was, op grond van de nauwe antigenewantschap tussen parainfluenzavirus type 1 en Sendavirus, viel het onderzoek op antistoffen tegen Sendai-virus bij patiënten met infectie door type 1 vrij vaak positief uit; ontwikkeling van complementbindende antistoffen tegen Sendai-virus werd vaker waargenomen dan die van hemagglutineremmende antistoffen.

De complementbindingsreactie leek een gevoeliger methode om een infectie met parainfluenzavirus aan te tonen dan de hemagglutineremmingsreactie. In 15 van de 18 onderzochte gevallen werd met de eerstgenoemde reactie de ontwikkeling van homologe antistoffen aangetoond; de hemagglutineremmingsreactie was positief in 9 van de 16 onderzochte gevallen.

De uitkomsten van de onderzoeken bij patiënten met mononucleosis infectiosa zijn in tabel 17 weergegeven. Acht van de 50 patiënten ontwikkelden antistoffen tegen een of twee parainfluenzavirussen. Bij 6 van hen werd slechts een 4-voudige titerstijging waargenomen; bij een patiënt werd een 8-voudige titerstijging van antistoffen tegen parainfluenzavirus type 3 aangetoond, bij een andere patiënt een 16-voudige titerstijging van antistoffen tegen Sendai-virus. Deze antistoffen waren alleen aantoonbaar met de hemagglutineremmingsreactie. Bij géén van de patiënten werd een ontwikkeling van complementbindende antistoffen gezien.

## BESCHOUWINGEN

Onderzoek op de ontwikkeling van antistoffen bleek een vrij gevoelige methode te zijn om een infectie met parainfluenzavirus aan te tonen bij de door ons onderzochte patiënten. Slechts in 3 van de 18 gevallen liet het onderzoek in de steek. Het betrof patiënten, die jonger dan 4 jaar waren. Bij één patiënt, bij wie parainfluenzavirus type 2 was geïsoleerd, werd weliswaar geen 4-voudige, maar wel een 2-voudige titerstijging van complementbindende antistoffen waargenomen. Bij een andere patiënt, bij wie parainfluenzavirus type 3 was geïsoleerd, werd direct na opname in het ziekenhuis een hoge titer van homologe antistoffen gevonden. Het is mogelijk, dat het eerste serum betrekkelijk laat na het begin van de ziekte is afgenomen en dat tengevolge hiervan geen titerstijging werd waargenomen.

De complementbindingsreactie was gevoeliger dan de hemagglutinatieremmingsreactie. CHANOCK e.m. (1960) vonden, dat de complementbindingsreactie ongeveer even gevoelig was als de hemagglutinatieremmingsreactie voor het opsporen van infecties met parainfluenzavirus type 3, maar veel minder gevoelig was voor het opsporen van infecties met type 1. Uit het onderzoek van SMEUR (1961) bleek, dat beide reacties ongeveer even gevoelig waren. Bij dit onderzoek werd echter geen parainfluenzavirus geïsoleerd, zodat het niet mogelijk was vast te stellen met welk type virus de patiënt was geïnfecteerd. Het is moeilijk de uitkomsten van verschillende studies met elkaar te vergelijken, omdat de vorming van antistoffen van diverse factoren afhangt. Zo spelen bijvoorbeeld de leeftijd van de patiënten, de ernst van de ziekte en eventuele vroegere infecties met parainfluenzavirus een rol. Bovendien kunnen er verschillen optreden tengevolge van variaties in de methodiek van de serologische reacties.

Verschillende patiënten met parainfluenzavirusinfectie ontwikkelden heterotypische antistoffen. Dit stemt overeen met de bevindingen van andere onderzoekers (zie blz. 14, Hoofdstuk I). Misschien reageerden patiënten sterker op zwakke antigene componenten dan caviae en ontwikkelden zij tengevolge hiervan al bij een eerste infectie met parainfluenzavirus in een deel der gevallen heterotypische antistoffen. Het is ook mogelijk, dat er tijdens de ziekte van de patiënten meer virus werd gevormd dan tijdens infecties van caviae, die zonder ziekteverschijnselen verliepen, en dat als gevolg hiervan de antigene stimulans, ook die van zwakke antigene componenten, bij de mens sterker was. Het is echter ook denkbaar, dat de vorming van heterotypische antistoffen berustte op een voorafgaande infectie of infecties met één of meer typen parainfluenzavirussen en dat op grond hiervan een anamnestiche reactie optrad en het spectrum van de antistoffen werd verbreed. In het algemeen waren de homologe antistoftiters van post-infectieuze sera van

mensen hoger dan die van caviae. Dit wijst op een krachtige antigene stimulans tijdens de infectie en (of) op een groot reactievermogen van de patiënten. Er zijn echter ook aanwijzingen, dat voorafgaande infecties met parainfluenzavirussen van betekenis zijn geweest. Bij 12 van de 18 patiënten werden in het serum, dat tijdens de acute fase van de ziekte was afgenomen heterotypische antistoffen tegen één of meer parainfluenzavirussen gevonden. Bij 4 van hen werd een titerstijging van heterotypische antistoffen waargenomen. De uitkomsten van een Amerikaans onderzoek (CHANOCK e.m. 1960) wijzen er ook op, dat de vorming van heterotypische antistoffen op een anamnestiche reactie kan berusten. Patiënten met parainfluenzavirusinfectie, bij wie aan het begin van de ziekte antistoffen tegen een heteroloog type waren gevonden, bleken vaker antistoffen tegen dit type te vormen dan patiënten, bij wie in het begin van de ziekte geen heterotypische antistoffen werden aangetoond. Het is onwaarschijnlijk, dat de vorming van antistoffen tegen verschillende parainfluenzavirussen bij één patiënt berustte op een gelijktijdige infectie met twee typen parainfluenzavirussen. Bij géén der patiënten werd meer dan één type geïsoleerd.

De resultaten van ons onderzoek wijzen op een mogelijke antigene verwantschap tussen de verwekker van mononucleosis infectiosa en parainfluenzavirussen. Bij 8 van de 50 patiënten werd een significante titerstijging van hemagglutineremmende antistoffen tegen één of twee van de parainfluenzavirussen vastgesteld. Deze bevinding komt overeen met de uitkomsten van een Amerikaanse studie (DEMEIO en WALKER 1958). De Amerikaanse onderzoekers hebben bij 13 van 110 lijders aan mononucleosis infectiosa een titerstijging van hemagglutineremmende en neutraliserende antistoffen tegen Sendai-virus waargenomen. Het is mogelijk, dat de verwekker van mononucleosis infectiosa tot de groep der parainfluenzavirussen behoort of een myxovirus is, dat hieraan verwant is.

## SAMENVATTING

Er werd een onderzoek ingesteld naar antigene verwantschap van parainfluenzavirussen onderling en van virussen uit de parainfluenzagroep met bofvirus en de verwekker van mononucleosis infectiosa.

Het onderzoek werd verricht bij caviae. De dieren werden intranasaal besmet met een kleine hoeveelheid virus en vervolgens onderzocht op de ontwikkeling van homotypische en heterotypische antistoffen. Voor het serologische onderzoek werd gebruik gemaakt van de complement-bindings- en hemagglutinatieremmingsreactie. Sommige groepen caviae werden tweemaal met een tussenpoos van 31 dagen besmet met hetzelfde virus: parainfluenzavirus type 1 of type 3, Sendai-virus of bofvirus. Andere groepen caviae werden tweemaal besmet met verschillende virussen: parainfluenzavirus type 3 en Sendai-virus of omgekeerd, of parainfluenzavirus type 3 en bofvirus of omgekeerd. Het interval tussen beide besmettingen bedroeg respectievelijk 93 en 50 dagen.

Caviae, die voor de eerste maal waren besmet, vormden uitsluitend antistoffen tegen het virus, dat voor de besmetting was gebruikt met uitzondering van één dier, dat met bofvirus was besmet en naast antistoffen tegen bofvirus antistoffen tegen parainfluenzavirus type 2 vormde. De primaire immunologische reactie was dus type-specifiek. Er werden wel kruisreacties in één richting gevonden tussen Sendai-virus en parainfluenzavirus type 1. Dit pleit niet tegen de type-specificiteit van de primaire immunologische reactie, omdat beide virussen tot één type worden gerekend.

Caviae, die voor de tweede maal met hetzelfde virus waren besmet, ontwikkelden niet alleen homotypische antistoffen, maar in een deel der gevallen ook heterotypische antistoffen. Kruisreacties tussen parainfluenzavirus type 3 enerzijds en Sendai-virus of parainfluenzavirus type 1 anderzijds werden vaker waargenomen dan die tussen parainfluenzavirus type 1 of 3 en type 2. Na de tweede besmetting werden eerder antistoffen gevormd dan na de eerste besmetting. Dit gold zowel voor homotypische als voor heterotypische antistoffen. De titers van homotypische antistoffen liepen na de tweede besmetting op tot hogere waarden dan na de eerste besmetting. Het verloop van de antistoftiters bij caviae, die voor de tweede maal waren besmet, was dus kenmerkend voor een secundaire immunologische reactie. Uit het serologische reactie-



patroon bij de secundaire immunologische reactie bleek opnieuw dat Sendai-virus en parainfluenzavirus type 1 immunologisch nauw verwant zijn. Enkele groepen caviae werden eerst intranasaal met virus besmet en 3 weken later opnieuw geïmmuniseerd met hetzelfde virus door middel van herhaalde intraperitoneale toediening van virus. Het onderzoek werd verricht met Sendai-virus en parainfluenzavirus type 3. Het bleek dat dieren, die op deze wijze waren geïmmuniseerd, in een groot aantal gevallen heterotypische antistoffen vormden.

Caviae, die achtereenvolgens met Sendai-virus en parainfluenzavirus type 3 waren besmet of omgekeerd, vormden na de tweede besmetting niet alleen homotypische antistoffen, maar in een groot deel der gevallen ook antistoffen tegen het virus, dat voor de eerste besmetting was gebruikt. Deze reactie wordt anamnestiche reactie genoemd. Er werden geen antistoffen tegen parainfluenzavirus type 2 gevormd. De anamnestiche reactie ontwikkelde zich sneller dan de primaire immunologische reactie, maar langzamer dan de secundaire immunologische reactie. Caviae, die achtereenvolgens met bofvirus en parainfluenzavirus type 3 waren besmet of omgekeerd, vormden na de tweede besmetting wel homotypische antistoffen, maar toonden geen anamnestiche reactie. Daarentegen werden door een aantal van deze dieren wel heterotypische antistoffen tegen parainfluenzavirus type 2 gevormd. Het onderzoek naar anamnestiche reacties bevestigt de waarneming, dat Sendai-virus en parainfluenzavirus type 1 immunologisch verwant zijn aan parainfluenzavirus type 3. Verder wijst dit onderzoek erop, dat bofvirus verwant is aan parainfluenzavirus type 2. Er werden geen aanwijzingen gevonden voor een antigene verwantschap tussen bofvirus en parainfluenzavirus type 3. De kruisreacties tussen bofvirus en parainfluenzavirus type 2 berustten vermoedelijk niet op een anamnestiche reactie van de gebruikte caviae tegen het aan type 2 verwante SV<sub>5</sub>-virus, dat van nature bij caviae kan voorkomen. Slechts bij 3 van 200 caviae, die voor de in dit proefschrift beschreven onderzoeken waren gebruikt, werden in het bloed, dat voor de eerste besmetting was afgenomen, antistoffen tegen SV<sub>5</sub>-virus aangetroffen.

Er werd verder serologisch onderzoek op parainfluenzavirussen verricht bij 18 patiënten met een acute aandoening van de luchtwegen en (of) longen, bij wie parainfluenzavirus uit de keel was geïsoleerd. Vijftien patiënten ontwikkelden homotypische antistoffen, 6 van hen bovendien heterotypische antistoffen. De complementbindingsreactie was vaker (13 van de 18 onderzochte gevallen) positief dan de hemagglutineringsreactie (7 van de 16 onderzochte gevallen).

Tenslotte werd serologisch onderzoek op parainfluenzavirussen verricht bij 50 patiënten met mononucleosis infectiosa, bij wie een positieve

reactie van Paul-Bunnell was gevonden. Acht patiënten ontwikkelden antistoffen tegen één of twee parainfluenzavirussen. De antistoffen waren aantoonbaar met de hemagglutinatieremmingsreactie. Deze bevinding wijst op antigene verwantschap tussen de verwekker van mononucleosis infectiosa en parainfluenzavirussen.

## S U M M A R Y

A study was made of the antigenic relationships between various para-influenza viruses and also between viruses of the para-influenza group on the one hand and mumps virus and the agent of infectious mononucleosis on the other.

The investigation was carried out in guinea-pigs. The animals were infected intranasally with a small quantity of virus and subsequently examined for the development of homotypical and heterotypical antibodies. For the serological examination, the complement fixation and the haemagglutination inhibition tests were used. Certain groups of guinea-pigs were infected twice at an interval of 31 days with the same virus: para-influenza virus type 1 or type 3, Sendai virus or mumps virus. Other groups of guinea-pigs were infected twice with different viruses: first with para-influenza virus type 3 and then with Sendai virus or vice versa, or else initially with para-influenza virus type 3 and then with mumps virus or vice versa. The interval between the two infections amounted to 93 and 50 days, respectively.

Guinea-pigs infected for the first time, produced only antibodies to the virus that had been used for the infection, with the exception of one animal which had been infected with mumps virus and which, in addition to antibodies for mumps virus, also produced antibodies to para-influenza virus type 2. In other words, the primary immunological reaction was type-specific. Non-reciprocal cross reactions between Sendai virus and para-influenza virus type 1 were observed, but this does not constitute an argument against the type-specificity of the primary immunological reaction, since the two viruses are considered to belong to a single type.

Guinea-pigs infected for the second time with the same virus produced not only homotypical antibodies, but in some of the cases heterotypical antibodies as well. Cross-reactions between para-influenza virus type 3 on the one hand and Sendai virus or para-influenza virus type 1 on the other were observed more often than those between para-influenza virus type 1 or 3 and type 2. Following the second infection, development of antibodies began earlier than after the first. This was true both of homotypical and heterotypical antibodies. The titres of homotypical antibodies attained higher values after the second infection than after the first. In

other words, the development of the antibody titres in guinea-pigs that had been infected for the second time showed the characteristic features of a secondary immunological reaction. The serological reaction pattern in the secondary immunological reaction once more showed that Sendai virus and para-influenza virus type 1 are closely related immunologically. A few groups of guinea-pigs were first infected intranasally with virus, and three weeks later they were again immunized with the same virus by means of repeated intraperitoneal administration of virus. The investigation was carried out with Sendai virus and with para-influenza virus type 3. It was found that in a large number of cases animals which had been immunized in this manner produced heterotypical antibodies.

Guinea-pigs which had been infected successively with Sendai virus and with para-influenza virus type 3 or with the same viruses but in the reverse order, produced after the second infection not only homotypical antibodies, but in many cases also antibodies to the virus that had been used for the first infection. This reaction is called the anamnestic reaction. No antibodies to para-influenza virus type 2 were produced. The anamnestic reaction developed more rapidly than the primary immunological reaction, but more slowly than the secondary immunological reaction.

Guinea-pigs which had been infected successively with mumps virus and with para-influenza virus type 3 or with these same viruses in the reverse order, did produce homotypical antibodies after the second infection, but they exhibited no anamnestic reaction. On the other hand, a number of these animals did produce heterotypical antibodies to para-influenza virus type 2. The study of the anamnestic reactions confirms the observation that Sendai virus and para-influenza virus type 1 are related immunologically to para-influenza virus type 3. The findings further suggest that mumps virus is related to para-influenza virus type 2. No evidence of an antigenic relationship between mumps virus and para-influenza virus type 3 was obtained. The cross reactions between mumps virus and para-influenza virus type 2 are probably not due to an anamnestic reaction of the guinea-pigs to SV<sub>5</sub> virus, which may be present naturally in guinea-pigs and which is related to type 2. In only 3 of 200 guinea-pigs used for the investigations described in this thesis, were antibodies to SV<sub>5</sub> virus detected in the blood samples taken prior to the first infection.

Further, a serological examination for para-influenza viruses was carried out in 18 patients with acute respiratory disease, in whom para-influenza virus had been isolated from the throat. Fifteen patients produced homotypical antibodies, and 6 of them produced heterotypical antibodies as well. The complement fixation reaction was more often positive (13 cases out of 18 examined) than the haemagglutination inhibition test (7 positive cases out of 16 examined).

Finally, a serological examination for para-influenza viruses was carried out in 50 patients with infectious mononucleosis, in whom a positive Paul-Bunnell test had been found. Eight patients produced antibodies against one or two para-influenza viruses. The antibodies were demonstrable with the haemagglutination inhibition reaction. This finding suggests an antigenic relationship between the agent of infectious mononucleosis and para-influenza viruses.

## GERAADPLEEGDE LITERATUUR

Abinanti F. R., Huebner R. J.

The serological relationships of strains of parainfluenza 3 virus isolated from humans and cattle with respiratory disease. *Virology* 8, 391 (1959).

Abinanti F. R., Byrne R. J., Watson R. L., Poelma L. J., Lucas F. R., Huebner R. J.

Observations on infections of cattle with myxovirus parainfluenza 3. *Am. J. Hyg.* 71, 52 (1960).

Abinanti F. R., Chanock R. M., Cook M. K., Wong D., Warfield M.

Relationship of human and bovine strains of myxovirus parainfluenzae 3. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 106, 466 (1961).

Andrewes C. H., Worthington G.

Some new or little known respiratory viruses. *Bull. WHO* 20, 435 (1959).

Bakos K., Dinter Z.

Identification of a bovine mucosal-disease virus isolated in Sweden as Myxovirus parainfluenzae 3. *Nature* 185, 549 (1960).

Bakos K., Dinter Z.

Antikörperreaktion des Rindes auf die Infektion mit dem Virus der Parainfluenza 3. *Zbl. Bakt. Abt I Orig.* 180, 1 (1960).

Bang F. B., Foard M.

The serology of Newcastle disease virus infection. II The antigenic relationships of Newcastle virus. *J. Immunol.* 76, 348 (1956).

Bloom H. H., Johnson K. M., Jacobsen R., Chanock R. M.

Recovery of parainfluenzaviruses from adults with upper respiratory illnesses. *Am. J. Hyg.* 74, 50 (1961).

Bukrinskaya A. G.

Antigenic relations in the parainfluenzavirus group. *Problems of Virology* 5, 4, 485. *Vopr. virusol.* 5, 449 (1960).

Bukrinskaya A. G.

Sensitivity of various tissues to parainfluenza viruses and certain aspects of the serodiagnosis of parainfluenza diseases. *Problems of Virology* 5, 810 (1960).

Bukrinskaya A. G., Paktoris E. A.

An outbreak of pneumonia caused by type 1 hemadsorption virus. *Acta Virol.* 4, 184 (1960).

Bukrinskaya A. G., Ho Yun De, Gorbunova A. S.

Further investigations on the antigenic relationships between parainfluenza 1 and Sendai virus. *Acta Virol.* 6, 352 (1962).

Burnet F. M., Anderson S. G.

Modification of human red cells by virus action. II Agglutination of modified human red cells by sera from cases of infectious mononucleosis. *Brit. J. Exp. Path.* 27, 236 (1946).

Buthala D. A., Soret M. G.

Parainfluenza type 3 infection in hamsters: virologic, serologic, pathologic studies. *J. of Inf. Dis.* 114, 3, 226 (1964).

Casals J.

Relationships among arthropod-borne animal viruses determined by cross-

- challenge tests. *The Am. J. Trop. Med. Hyg.* 12, 4, 587 (1963).
- Chang P., Hsiung G. D.  
VIII International Congress for microbiology. Abstract 1962-, 95 (1962).
- Chanock R. M.  
Association of a new type of cytopathogenic myxovirus with infantile croup. *J. Exp. Med.* 104, 555 (1956).
- Chanock R. M.  
Recovery of a new type of myxovirus from infants with croup. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 67, 287 (1957).
- Chanock R. M., Parrott R. H., Cook K., Andrewes B. E., Bell J. A., Reichelderfer T., Kapikian A. Z., Mastrotta F. M., Huebner R. J.  
Newly recognized myxoviruses from children with respiratory diseases. *New Eng. J. Med.* 258, 207 (1958).
- Chanock R. M., Parrott R. H., Bell J. A., Rowe W. P., Huebner R. J.  
New viruses observed in children with respiratory diseases. *Publ. Health Rep.* 73, 193 (1958).
- Chanock R. M., Vargosko A., Luckey A., Cook M. K., Kapikian A. Z., Reichelderfer T., Parrott R. H.  
Association of hemadsorption viruses with respiratory illness in childhood. *JAMA* 169, 548 (1959).
- Chanock R. M.  
The contribution of detectable viruses to the croup syndrome. *A.M.A. J. Dis. Child.* 98, 626 (1959).
- Chanock R. M., Wong D. C., Huebner R. J., Bell J. A.  
Serologic response of individuals infected with parainfluenzaviruses. *Am. J. Publ. Health* 50, 1858 (1960).
- Chanock R. M., Johnson K. M., Cook M. K., Wong D. C., Vargosko A.  
The hemadsorption technique with special reference to the problem of naturally occurring Simian parainfluenzavirus. *Am. Rev. Resp. Dis.* 83, 125 (1961).
- Chanock R. M., Johnson K. M.  
Infectious diseases: respiratory viruses. *Ann. Rev. Med.* 12, 1 (1961).
- Chanock R. M., Bell J. A., Parrott R. H.  
Natural history of parainfluenza infection. *Perspectives in Virology* 2, 126 (1961).
- Chanock R. M., Parrott R. H., Johnson K. M., Kapikian A. Z., Bell J. A.  
Myxoviruses: Parainfluenza. *Am. Rev. Resp. Dis.* 153 (1962) Conference on newer Resp. Dis. Viruses.
- Chany C., Daniel P., Robbe-Fossat F., Vialatte J., Lépine P., Lelong M.  
Isolement et étude d'un virus syncytial non identifié, associé à des affections respiratoires aiguës du nourrisson. *Ann. Inst. Past.* 95, 721 (1958).
- Chany C., Robbe-Fossat F., Couvreur M. J.  
Enquête sérologique sur le rôle épidémiologique d'un virus respiratoire nouvellement reconnu: souche AE102 de myxovirus parainfluenzae type 3. *Bull. Acad. Nat. Med.* 143, 106 (1959).
- Clarke S. K. R., Saynor R.  
Hemagglutination inhibition test against CA virus. *Archiv. Ges. Virusf.* 9, 288 (1959).
- Cohen S. M.  
Production of parainfluenza antisera in ferrets and cultivation of viruses in FL-cells. N.Y. State Dep. of Health. *Ann. Rep. of the Div. of Lab. and Res.* 27 (1959).
- Cook M. K., Andrewes B. E., Fox H. H., Turner H. C., James W. D., Chanock R. M.

- Antigenic relationships among the „newer” Myxoviruses (parainfluenza). *Am. J. Hyg.* 69, 250 (1959).
- Cook M. K., Chanock R. M.  
In vivo antigenic studies of parainfluenza viruses. *Am. J. Ryg.*, 77, 2, 150 (1963).
- Craighhead J., Cook M. K., Chanock R. M.  
Infection of hamsters with parainfluenza 3 viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104, 301 (1960).
- Cramblett H. G.  
Isolation of a cytopathogenic agent resembling the CA virus from a infant with croup. *Pediatrics* 22, 56 (1958).
- Cramblett H. G., Kasel F. A., Utz F. P.  
Respiratory illness in children simultaneously infected with hemadsorption virus type 1 and a newly recognized HeLa enterovirus (H.E.) *Pediatrics* 24, 234 (1959).
- Crowle A. J.  
Immunodiffusion. *Acad. Press. Inc. N.Y. en Londen* (1961).
- DeMeio J. L., Walker D. L.  
Demonstration of antigenic relationships between mumps virus and hemagglutinating virus of Japan. *J. Immunol.* 78, 465 (1957).
- DeMeio J. L., Walker D. L.  
Sendai virus antibody in acute respiratory infections and infectious mononucleosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 98, 453 (1958).
- DeMeio J. L., Adaptation of parainfluenza 2 (CA) to the embryonated hens' egg. *J. of Bact.* 85, 4, 943 (1963).
- Dick E. C., Mogabgab W. J., Holmes B.  
Characteristics of parainfluenza 1 (HA<sub>2</sub>) virus. I. Incidence of infection and clinical features in adults. *Am. J. Hyg.* 74, 3, 263 (1961).
- Dick E. C., Holmes B.  
Characteristics of parainfluenza 1 (HA<sub>2</sub>) virus. *Am. J. Hyg.* 74, 3, 304 (1961).
- Dick E. C., Mogabgab W. J.  
Characteristics of parainfluenza 1 (HA<sub>2</sub>) virus. III Antigenic relationships, growth, interaction with erythrocytes and physical properties. *J. Bact.* 83, 561 (1962).
- Dinter Z., Hermodsson S., Bakos K.  
Studies on variants of a bovine strain of parainfluenza 3 virus. I Isolation and growth characteristics. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 49, 485 (1962).
- Dowling H. F., Lefkowitz L. B.  
Clinical syndromes in adults caused by respiratory viruses. *Am. Rev. Resp. Dis.* 62 (1962). Conference on Newer Respiratory Disease Viruses.
- Emery J. B., York C. J.  
Occurrence of a hemadsorption virus in normal monkey tissue culture. *Virology* 11, 313 (1960).
- Euler L. von, Kantor F. S., Hsiung G. D., Isacson P., Tucker G.  
Studies of parainfluenzaviruses. I Clinical, pathological and virological observations. *Yale J. Biol. Med.* 35, 6, 523 (1963).
- Evans A. S.  
Infections with hemadsorption virus in University of Wisconsin students. *New Engl. J. Med.* 263, 233 (1960).
- Frothingham T. E., Sanyakorn C. K.  
Parainfluenzaviruses in Southern Louisiana. *Publ. Health. Rep.* 76, 765 (1961).
- Fukumi H., Nishikawa F., Kitayama.  
Pneumotropic virus from mice causing hemagglutination. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 7, 345 (1954).



- Fukumi H., Nishikawa F., Sugiyama T., Yamaguchi Y., Nauba J., Marsuura T., Oikawa R.  
An epidemic due to HA<sub>2</sub> virus in an elementary school in Tokyo. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 12, 307 (1959).
- Fukumi H.  
Studies on Sendai virus infection in laboratory mice. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 15, 4, 153 (1962).
- Fukumi H., Nishikawa F., Noriki H.  
Sero-epidemiological studies of myxovirus parainfluenzae 3 infection. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 16, 2, 93 (1963).
- Gale C., King N. B.  
Isolation of a virus from clinical Shipping Fever in cattle. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 138, 5, 235 (1961).
- Gardner P. S.  
Serologic evidence of infection with Sendai virus in England. *Brit. Med. J.* 1, 1143 (1957).
- Gardner P.S., Stanfield J. P., Wright A. E., Court S. D. M., Green C. A.  
Viruses, bacteria and respiratory disease in children. *Brit. Med. J.* 1, 1077 (1960).
- Graighead J. E., Cook M. K., Chanock R. M.  
Infection of hamsters with parainfluenza 3 virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104, 301 (1960).
- Harboe A., Reenaas R., Juul K.  
Influenza A<sub>2</sub> strains against A and A<sub>1</sub> strains in cross-hemagglutination inhibition tests. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 48, 231 (1960).
- Harboe A.  
The hemagglutination inhibiting antibodies in ferrets crossinfected with influenza A<sub>2</sub> virus and strains of the other A-types. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 49, 224 (1960).
- Harboe A.  
The heterologues, anamnestic HI-antibody increase resulting from cross-infection with influenza A<sub>2</sub> and Dutch 56 A<sub>1</sub> strains. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 55, 415 (1962).
- Harboe A.  
An anamnestic antibody increase in ferrets cross-infected with influenza A<sub>2</sub> virus after myxoviruses belonging to the A group. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 55, 425 (1962).
- Harboe A.  
The influenza virus hemagglutination inhibition by antibody to host material. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 57, 3, 317 (1963).
- Harboe A.  
The normal allantoic antigen which neutralizes the influenza virus HI-antibody to host material. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 57, 4, 488 (1963).
- Heath R. B., Tyrrell D. A. J., Peto S.  
Serological studies with Sendai virus. *Brit. J. Exp. Path.* 43, 4, 444 (1962).
- Henle W., Lief F. S.  
The Broadening of antibody spectra following multiple exposures to influenza viruses. *Am. Rev. Resp. Dis.* 379 (1962). Conference on Newer Respiratory Disease Viruses.
- Hermodsson S., Dinter Z., Bakos K.  
Studies on variants of a bovine strain of parainfluenza 3 virus. II Hemagglutinating activity. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 51, 75 (1960).
- Hilleman M. R.

- The parainfluenza viruses of man. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 101, 2, 564 (1962).
- Ho Yun De, Gorbunova A. S.  
Antigenic structure of 24 strains of Sendai-Type 1 Parainfluenza viruses. *Problems of Virology* 6, 2, 750 (1961).
- Ho Yun De  
Antigenic variants of parainfluenza Sendai virus. *J. Hyg. Epidemiol., microbiol., immunol.* 6, 2, 154 (1962).
- Hoerlein A. B., Mansfield M. E., Abinanti F. R., Huebner R. J.  
Studies in Shipping Fever of cattle. I Parainfluenza 3 virus antibodies in feeder calves. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 135, 153 (1959).
- Holland W. W., Tanner E. J., Pereira M. S., Taylor C. E. D.  
A study of the etiology of respiratory disease in a general hospital. *Brit. Med. J.* 1, 1917 (1960).
- Hosaka Y., Hosakawa Y., Fukai K.  
A new device for preparing subunits of myxovirus. *Bikens J.* 2, 4, 367 (1959).
- Hosaka Y.  
Structural components of Newcastle disease virus. I Differentiation of subunits by physical and chemical techniques. *Bikens J.* 3, 3, 229. (1960).
- Hosaka Y., Hosokawa Y., Fukai K.  
The structure of HVJ. I Two kinds of subunits of HVJ. *Bikens J.* 3, 27 (1960).
- Hosaka Y., Nishi Y., Fukai K.  
The structure of HVJ. II The fine structure of the sub-units. *Bikens J.* 4, 4, 243 (1961).
- Hosaka Y.  
Characteristics of growth of HVJ in PS cells. *Bikens J.* 5, 2, 121, (1962).
- Hosaka Y.  
Structural components of Newcastle disease virus. Differentiation of sub-units by physical and chemical techniques. *Bikens J.* 3, 3, 229 (1963).
- Hsiung G. D., Isacson P., McCollum R. W.  
Studies of a myxovirus isolated from human blood. I Isolation and properties. *J. Immunol.* 88, 3, 284 (1962).
- Hsiung G. D.  
Discussion. *Am. Rev. Resp. Dis.* 189 (1962). Conference on Newer Respiratory Disease Viruses.
- Hsiung G. D., Isacson P., Tucker G.  
Studies of parainfluenzaviruses. III Serologic interrelationships in Humans. *Yale J. of Biol. Med.* 35, 6, 534 (1963).
- Hull R. N., Minner J. R., Smith J. W.  
New viral agents recovered from tissue cultures of monkey kidney cells. *Am. J. Hyg.*, 63, 204 (1956).
- Hull R. N., Minner J. R.  
New viral agents recovered from tissue cultures of monkey kidney cells. II Problems of isolation and identification. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 67, 413 (1957).
- Hull R. N., Minner J. R., Mascoli C. C.  
New viral agents recovered from tissue cultures of monkey kidney cells. III Recovery of additional agents both from cultures of monkey tissues and directly from tissues and excreta. *Am. J. Hyg.* 68, 31 (1958).
- Isacson P., McCollum R. W., Hsiung G. D.  
Studies of a myxovirus isolated from human blood. *J. Immunol.* 88, 3, 291 (1962).
- Isacson P., McCollum R. W., Hsiung G. D.  
Studies of a myxovirus isolated from human blood. III Serological reactions in persons with viral hepatitis. *J. Immunol.* 88, 3, 300 (1962).

- Jenssen K. E., Minuse E., Ackermann W.  
Serological evidences of American experience with NPV type Sendai. *J. Immunol.* 75, 71 (1955).
- Jenssen K. E., Peeler B. E., Dulworth W. G.  
Immunization against parainfluenza infections. Antigenicity of egg adapted types 1 and 3. *J. of Immunol.* 89, 216 (1962).
- Hummeler K.  
Relationship of animal virus structures to their immunological properties as determined by electron microscopy. *Bact. Rev.* 27, 4, 381 (1963).
- Inaba Yuji  
Parainfluenza 3 virus isolated from Japanese cattle. *Jap. J. Exp. Med.* 33, 5, 313 (1963).
- Johnson K. M., Chanock R. M., Cook M. K., Huebner R. J.  
Studies of a new hemadsorption virus. I Isolation properties and characterization. *Am. J. Hyg.*, 71, 81 (1960).
- Jordan W. S., Feller A. E.  
The relationships of complement fixing and anti-hemagglutinating factors against the viruses of mumps and Newcastle disease. *J. Lab. Clin. Med.* 36, 369 (1950).
- Kapikian A. Z., Chanock R. M., Bell J. A., Reichelderfer T. E., Huebner R. J.  
A study of the hemadsorption viruses (parainfluenzae) and other viruses in children with and without respiratory disease. *Pediatrics* 26, 243 (1960).
- Kapikian A. Z., Chanock R. M., Reichelderfer T. E., Ward T. G., Huebner R. J., Bell J. A.  
Inoculation of human volunteers with parainfluenzavirus type 3. *JAMA* 178, 6, 537 (1961).
- Kapikian A. Z.  
An outbreak of parainfluenza 2 (CA) virus infection. Association with acute undifferentiated febrile illness in children. *JAMA* 183, 324 (1963).
- Ketler A., Hamparian V., Hilleman M. R.  
Laboratory and field investigations of bovine myxovirus parainfluenza 3 and vaccine 1. Properties of the SF<sub>4</sub> (Shipping Fever) strain. *J. Immunol.* 87, 126 (1961).
- Kilham L., Jungherr E., Luginbuhl R. E.  
Anti-hemagglutinating and neutralizing factors against Newcastle disease virus (NDV) occurring in sera of patients convalescent from mumps. *J. Immunol.* 63, 37 (1949).
- Kim H. W., Vargosko A. J., Chanock R. M., Parrott R. H.  
Parainfluenza 2 etiological association with croup. *Pediatrics* 28, 614 (1961).
- Kok G. J. P. C. M.  
Aandoeningen der luchtwegen bij recruten door adenovirussen. Virologisch en serologisch onderzoek met behulp van de methodiek van de weefselkweek. Proefschrift - Nijmegen (1957).
- Kolmer J. A., Spaulding E. H., Robinson H. W.  
Approved laboratory technic. 5th ed. N.Y. Appleton 1951 (oorspronkelijk 1938). (1951).
- Kuroya M., Ishida N.  
Newborn virus pneumonitis (type Sendai). II Isolation of a new virus possessing hemagglutinating activity. *Yokohama Med. Bull.* 4, 217 (1953).
- Lennette E. H., Jensen F. W., Guenther R. W., Magoffin R. L.  
Serologic responses to parainfluenzaviruses in patients with mumps virus infection. *J. Lab. Clin. Med.* 61, 5, 780 (1963).
- Lewis F. A., Lehmann N. J., Ferris E. A.

- The hemadsorption viruses in laryngo-tracheo-bronchitis. *Austral. Med.* 2, 929 (1961).
- McDonald J. C., Zuckermann A. J., Pereira M. S.  
Coe (Coxsackie A21) virus, parainfluenzavirus and other virus infections in the R.A.F. 1958-1960. *J. Hyg. (Camb.)* 60, 235 (1962).
- McKinney R. W., England B. L., Froede S.  
Studies with hemadsorption virus type 1. I Recovery from two cases of influenza-like disease in military personnel and related investigations. *Am. J. Hyg.* 70, 280 (1959).
- McLean D. M., Roy T. E., O'Brien J. M., Wylie J. C., McQueen E. J.  
Parainfluenzaviruses in association with acute laryngo-tracheo-bronchitis. *Canad. Med. Ass. J.* 85, 290 (1961).
- McLean D. M., Edwards H. E., McQueen E. J., Petite H. E.  
Myxovirus infections in acute laryngo-tracheo-bronchitis. *Canad. Med. Ass. J.* 87, 19, 999 (1962).
- Meenan P. U., Clarke M., Tyrrell D. A. J.  
Isolation of hemadsorption virus from a naturally infected adult. *Lancet* 2, 98 (1959).
- Mogabgab W. J., Dick E. C., Holmes B.  
Parainfluenza 2 (CA) virus in young adults. *Am. J. Hyg.* 74, 304 (1961).
- Petersen K. B., von Magnus K.  
Isolation of a new virus from a child with an influenza-like disease. *Danish. Med. Bull.* 5, 157 (1958).
- Petersen K. B.  
Studies on the properties of a new cytopathogenic and hemagglutinating virus (Copenhagen 222). *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 45, 213 (1959).
- Pierson M., de Lavergne E., Gilgenkrantz S., Worms A. M.  
Aspect clinique et epidemiologique de quelques cas d'infection à myxovirus parainfluenza 3 (EA-102). *Archiv. ges. Virusf.* 13, 1, 257 (1963).
- Price W. H.  
A sequential immunization procedure against certain group B arboviruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 12, 4, 624 (1963).
- Reed L. J., Muench H.  
A simple method of estimating fifty per cent end-points. *Am. J. Hyg.* 27, 493 (1938).
- Reichelderfer T. E., Chanock R. M., Graighead J. E., Huebner R. J., Turner H. C., James W. D., Ward T. G.  
Infection of human volunteers with type 2 hemadsorption virus. *Sci.* 128, 779 (1958).
- Reisinger R. C., Heddleston K. L., Manthei C.  
A myxovirus (SF-4) associated with Shipping Fever of cattle. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 135, 147 (1959).
- Reisinger R. C.  
Parainfluenza 3 virus in cattle. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 101, 2, 576 (1962).
- Robinson R. Q., Hoshiwara J., Schaeffer M., Gorrie R. H., Kaye H. S.  
A survey of respiratory illnesses in a population. 1 Viral studies. 2 Fluorescent antibody aspects. *Am. J. Hyg.* 75, 1 (1962).
- Rott R., Waterson A. P., Reda I. M.  
Characterization of „Soluble“ antigens derived from cells infected with Sendai and Newcastle disease viruses. *Virology* 21, 4, 663 (1963).
- Rott R., Reda I. M.  
Nachweis und Reinigung eines löslichen Antigens aus Newcastle disease infizierte Gewebe. *Ztschr. Veterinär. Med.* 10, 57 (1963).

- Schiøtt R., Hyldgaard Jensen C.  
A mouse pathogenic strain of parainfluenzavirus type 3 isolated from cattle. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 56, 479 (1962).
- Schiøtt R.  
Antibody in man against a bovine strain of parainfluenza type 3 virus. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 59, 2, 239 (1963).
- Schiøtt R., Hyldgaard Jensen C.  
Antibodies in Danish cattle against myxovirus parainfluenza type 3 (strain KO-23). *Acta Vet. Scand.* 4, 60 (1963).
- Schultz E. W., Habel K. J.  
SA virus- a new member of the myxovirus group. *J. Immunol.* 82, 274 (1959).
- Sever J. L.  
Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J. Immunol.* 88, 3, 320 (1962).
- Shelokov A., Vogel J. E., Chi L.  
Hemadsorption (adsorption-hemagglutination) test for viral agents in tissue culture with special reference to influenza. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 97, 802 (1958).
- Smadel J. E.  
Summary of Symposium on immunization against arbovirus infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 12, 4, 639 (1963).
- Smeur F. A. A. M.  
Infecties met parainfluenzavirussen bij kinderen. Proefschrift - Nijmegen (1961).
- Starck J. E., Heath R. B., Peto S.  
A study of the antibodies against parainfluenzaviruses in children's sera. *Archiv. ges. Virusf.* 14, 2, 160 (1964).
- Takatsky G.  
Kiserl. Orvostud. bes. 2, 393 (1950) zie Sever L. J.
- Takatsky G.  
*Acta Microbiol. Hung.* 3, 191 (1955) zie Sever L. J.
- Taylor-Robinson D., Bynoe M. L.  
Parainfluenza 2 virus infections in adult volunteers. *J. Hyg.* 61, 4, 407 (1963).
- Tyrrell D. A. J., Bynoe M. L., Petersen K. B., Sutton R. N. P., Pereira M. S.  
Inoculation of human volunteers with parainfluenzaviruses type 1 and 3 (HA<sub>2</sub> and HA<sub>1</sub>). *Brit. Med. J.* 2, 909 (1959).
- Tyrrell D. A. J.  
Human inoculation with Parainfluenzaviruses. *Brit. Med. J.* 1, 347 (1960). Correspondence.
- Uriel J.  
*Bull. soc. chim. biol.* 40, 277 (1958). Zie boek van Crowle A. J. (1961).
- Veen J. van der, Smeur F. A. A. M.  
Infections with parainfluenzaviruses in children with respiratory illnesses in Holland. *Am. J. Hyg.* 74, 3, 326 (1961).
- Versteeg J.  
Antistoffen tegen het Sendai-virus bij de Nederlandse bevolking. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 105, 2458 (1961).
- Vogel J., Shelokov A.  
Adsorption-hemagglutination test for influenza virus in monkey kidney tissue culture. *Sci.* 126, 358 (1957).
- Waterson A. P., Hurrell J. M. W.  
The fine structure of the parainfluenza viruses. *Archiv. ges. Virusf.* 12, 138 (1962).

White D. O.

Hemadsorption by uninoculated cultures of monkey kidney epithelium. *Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 35, 523 (1962).

Zhdanov V., Bukrinskaya A. G.

Further considerations on nomenclature of parainfluenzaviruses. *Virology* 10, 146 (1960).









## STELLINGEN

### I

De verbreding van het antistofspecrum tengevolge van voorafgaande infecties met hetzelfde virus of een verwant virus vormt een beperking van de mogelijkheden van de serologische diagnostiek van virusinfecties.

### II

Het verdient aanbeveling bij de bereiding van type-specifieke antisera gebruik te maken van virusstammen, die uitsluitend in continue cellijnen of celstammen zijn gekweekt.

### III

Sendai-virus en parainfluenzavirus type 1 behoren tot één immunologisch type.

### IV

Van de verbreding van het antistofspecrum bij secundaire of anamnestiche reacties kan waarschijnlijk gebruik worden gemaakt bij de vaccinatie tegen virusziekten.

(Smadel J. E., *Am. J. Trop. Med. Hyg* 12, 4, 639 (1963)).

### V

Het is in individuele gevallen moeilijk zo niet onmogelijk alleen op grond van het histo-pathologische beeld cholangiolitische (primaire biliare) hepatitis te onderscheiden van extra-hepatische afsluiting van de galwegen.

(Baggenstoss A. H. e.m., *Am. J. Clin. Path.* 42, 259 (1964)).

### VI

Studie van de functie en immunologische eigenschappen van nieren van pasgestorvenen kan een belangrijke bijdrage vormen voor de toepassing van niertransplantaties.

(Hamburger J., voordracht — Nijmegen (1964)).

### VII

Het is niet geoorloofd bij de bepaling van het plasma-minutenvolume van de nier de uitscheiding van para-amino-hippuurzuur bij zuigelingen van 0 tot 3 maanden zonder meer te vergelijken met de uitscheiding van deze stof bij volwassenen.

(Calcagno P. L., Rubin M. J., *J. of Chin. Invest.* 42, 2, 1632 (1963)).



## VIII

Echo-encephalografie kan een waardevol hulpmiddel zijn bij het vaststellen van verdringing in de voorste of middelste schedelgroeve.

(M. De Vlieger, *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 108, 1,5 (1964)).

## IX

De scalenusspieren spelen een grotere rol bij de ademhaling dan in het algemeen wordt aangenomen.

(Basmajian J. V., *Muscles Alive* 180. Williams & Wilkins — Baltimore (1962)).

## X

Bij de behandeling met peritoneale dialyse van vergiftigingen met barbituraten, verdient het overweging om albumine aan de spoelvloeistof toe te voegen.

(Berman L. B., Vogelsang P., *New. Eng. J. Med.* 270, 2, 77 (1964)).





