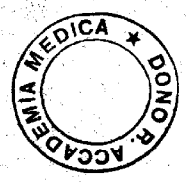


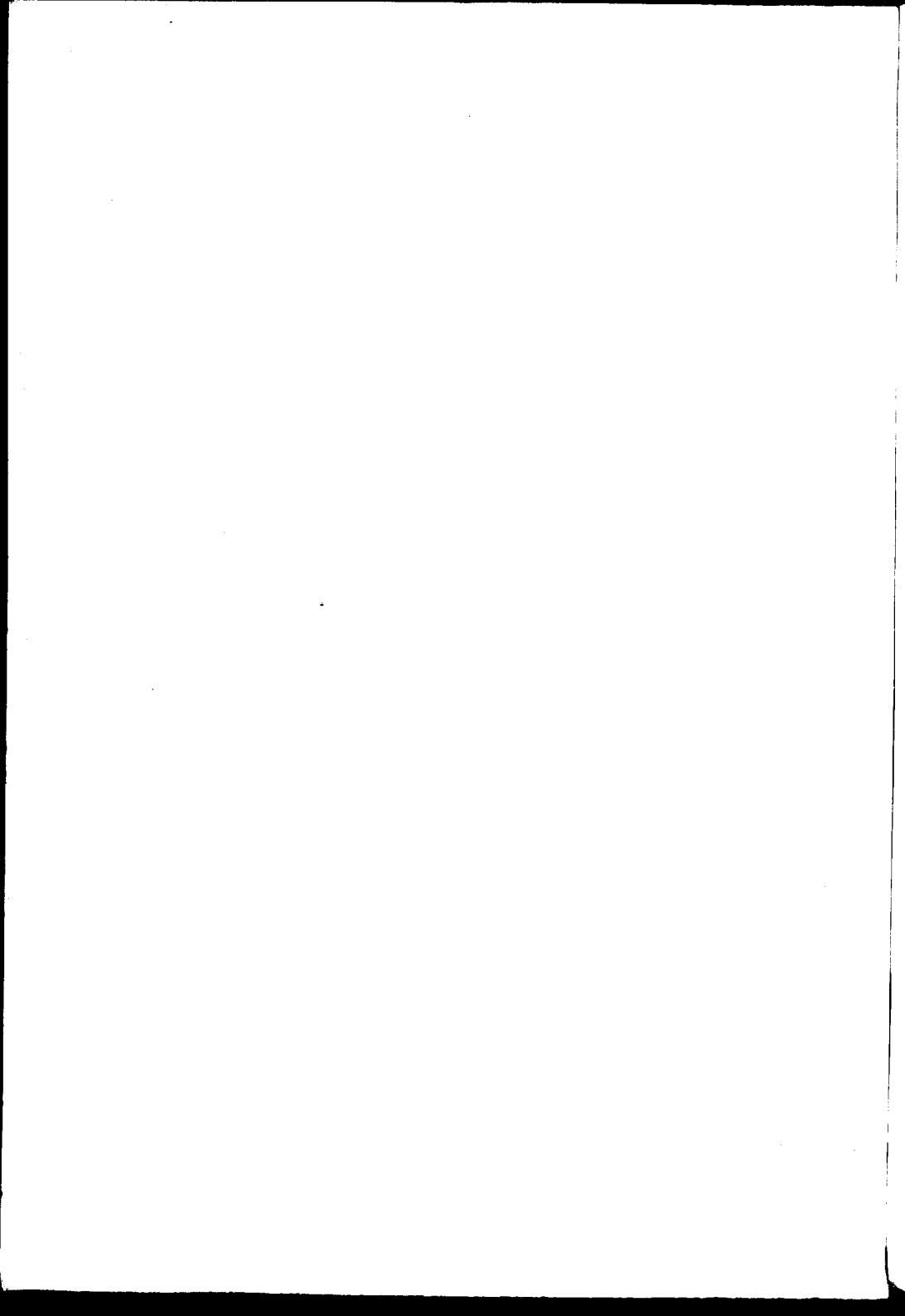


OVER DE BEREIDING

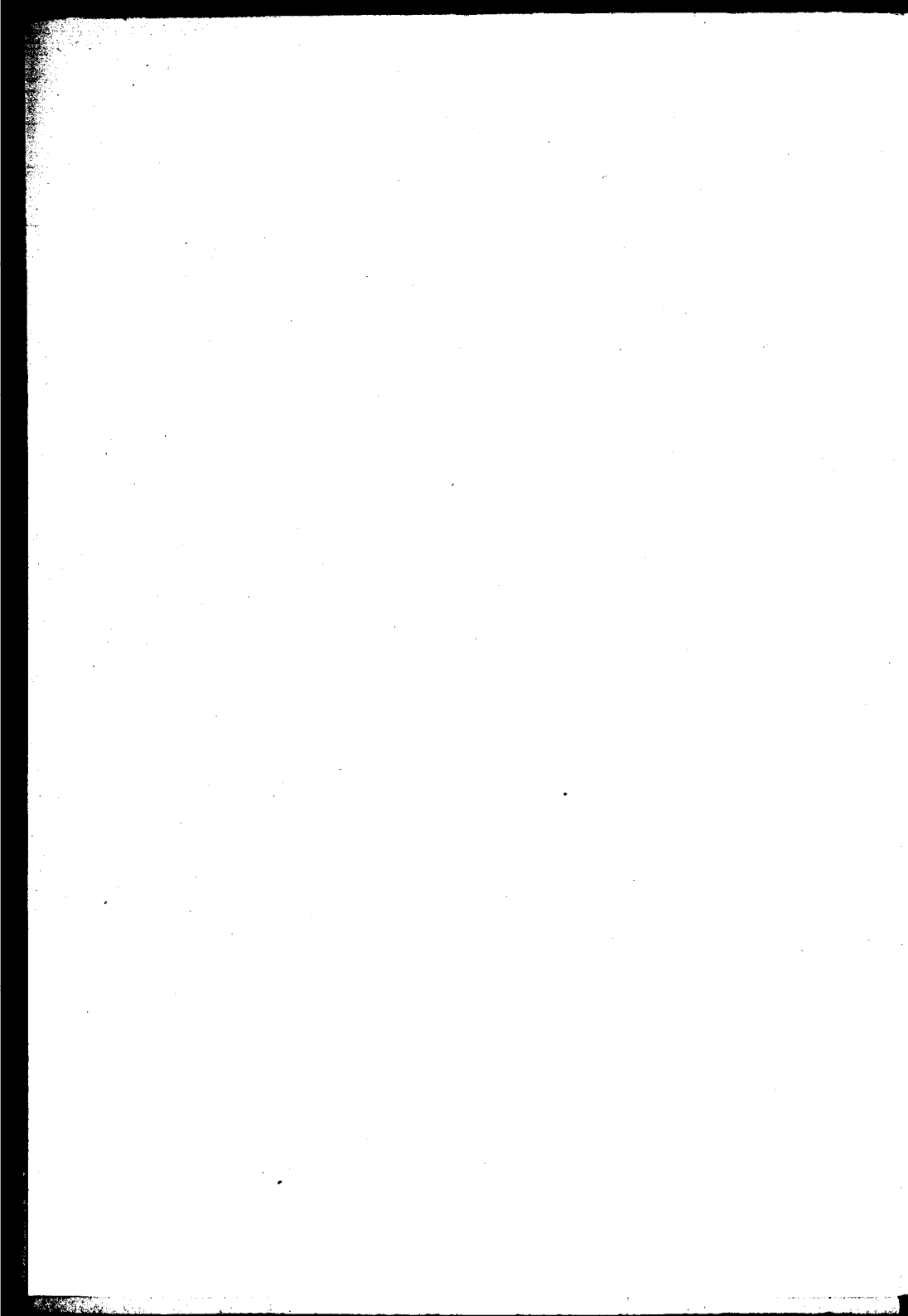
VAN DIPHTHERIEGIF.



L. C. H. F. VAN TURENHOUT.



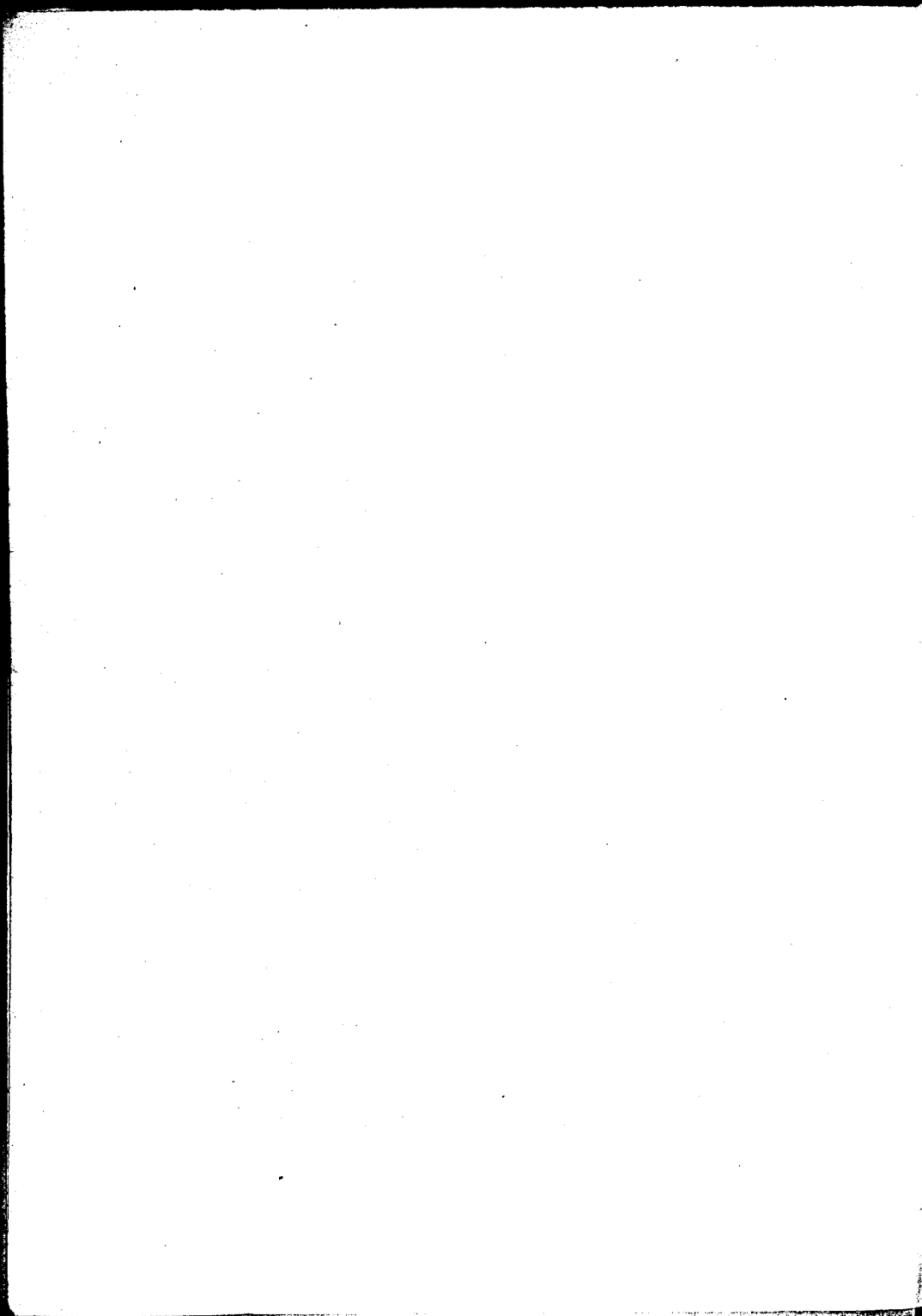




OVER DE BEREIDING

VAN

DIPHThERIEGIF.



OVER DE BEREIDING  
VAN  
DIPHTHERIEGIF.

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN

DOCTOR IN DE GENEESKUNDE

AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT,

NA MACTHIGING VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS

DR. H. C. DIBBITS,

Hoogleraar in de Faculteit der Wis- en Natuurkunde,

VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT

TEGEN DE BEDENKINGEN VAN

DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE

TE VERDEDIGEN

op Vrijdag 5 Juli 1895, des namiddags ten 1 ure,

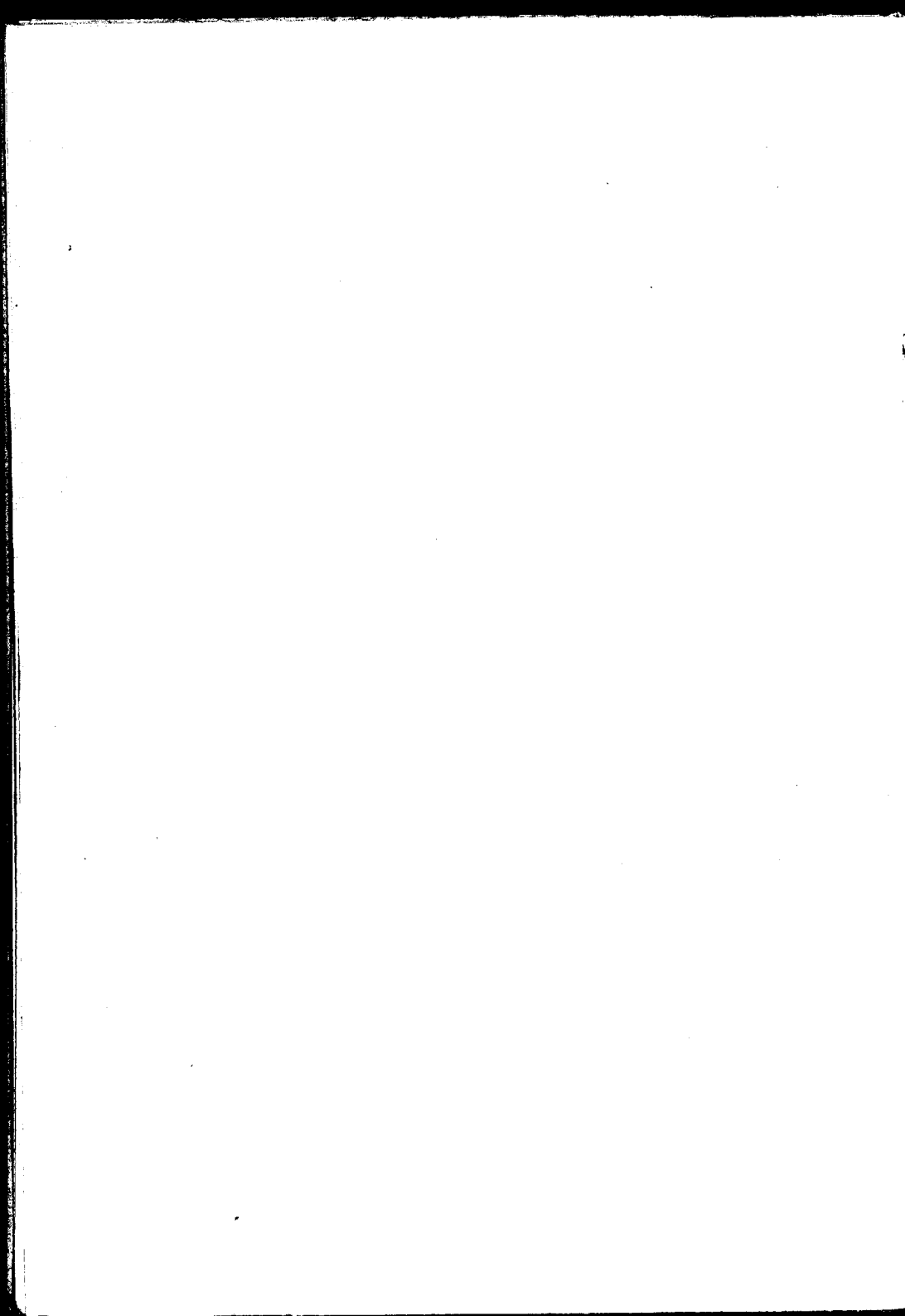
DOOR

LEONARDUS CORNELIS HENRICUS FRANCISCUS VAN TURENHOUT,

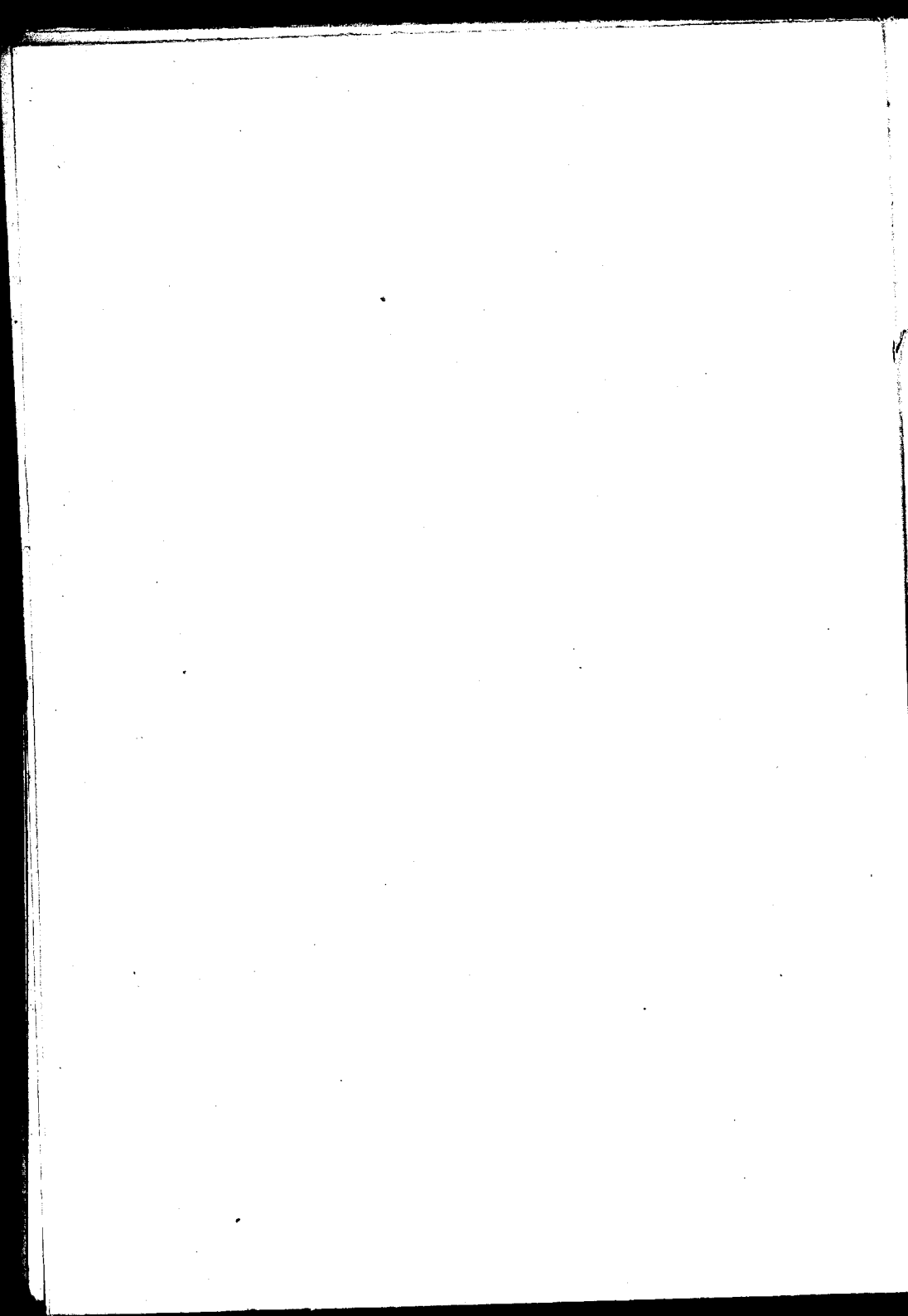
ARTS,  
geboren te Dinteloord.



UTRECHT.  
J. VAN BOEKHOVEN.  
1895.



AAN MIJNE OUDERS.

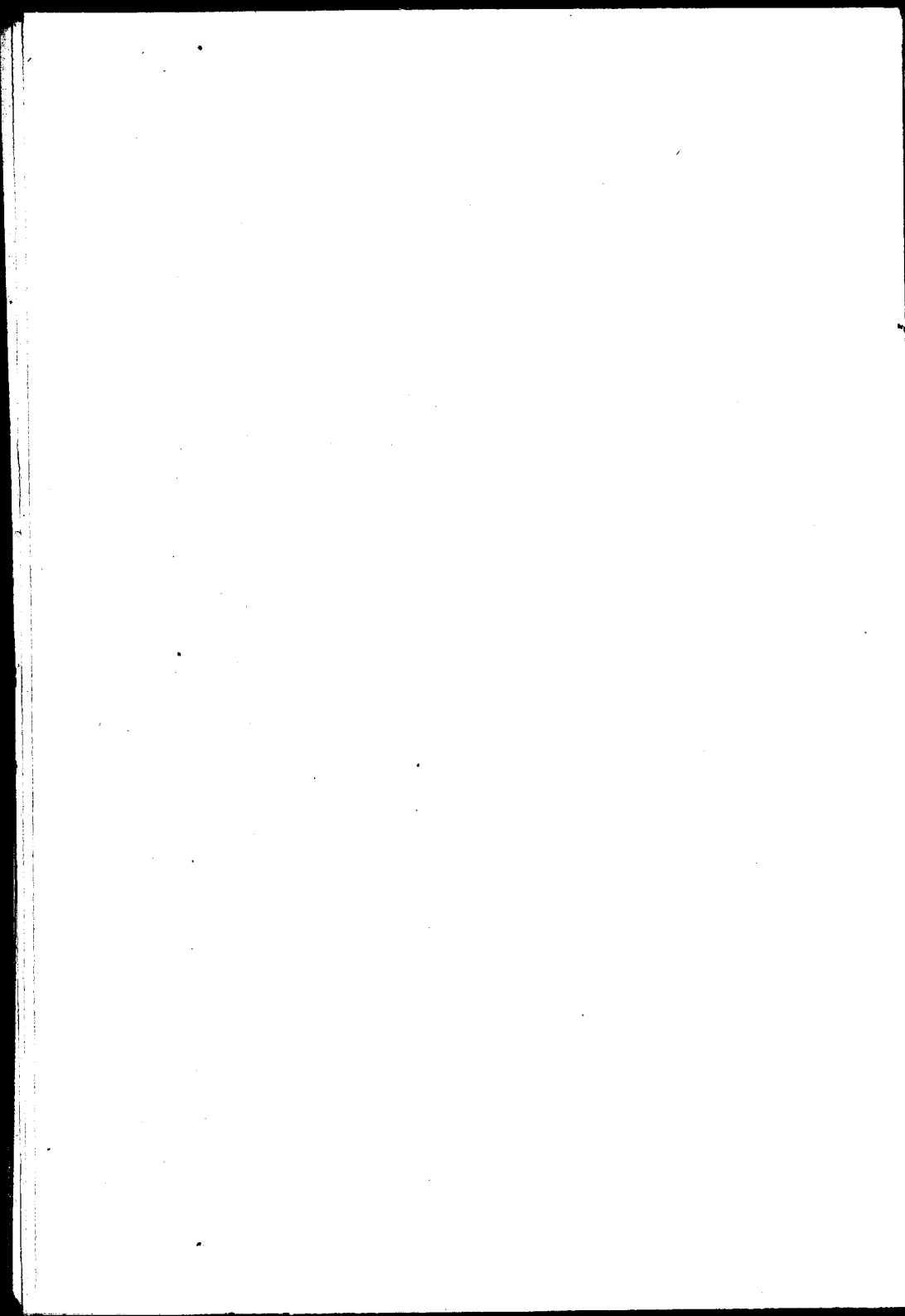


*Bij het eindigen van mijn academischen studietijd is het mij een zeer aangename plicht, U, Hooggeleerde Heeren Professoren en Zeergeleerde Heeren Lectoren der Medische en Philosophische Faculteiten, mijn dank te betuigen voor al hetgeen Gij tot mijne vorming hebt bijgedragen.*

*Voor al aan U, Hooggeleerde SPRONCK, Hooggeachte Promotor, gevoel ik mij ten zeerste verplicht voor de groote bereidwilligheid, waarmede Gij de leiding mijner proeven op U naamt, voor den zeer gewaardeerden raad en steun, dien Gij mij zoo ruimschoots verleendet, voor het vele en nuttige, wat ik nog in den laatsten tijd op Uw laboratorium van U mocht leeren.*

*Dat alles blijve mij steeds in dankbare herinnering.*

---



# INHOUD.

---

Inleiding . . . . .	Bldz. 1
---------------------	---------

## HOOFDSTUK I.

Litteratuur-overzicht . . . . .	5
---------------------------------	---

## HOOFDSTUK II.

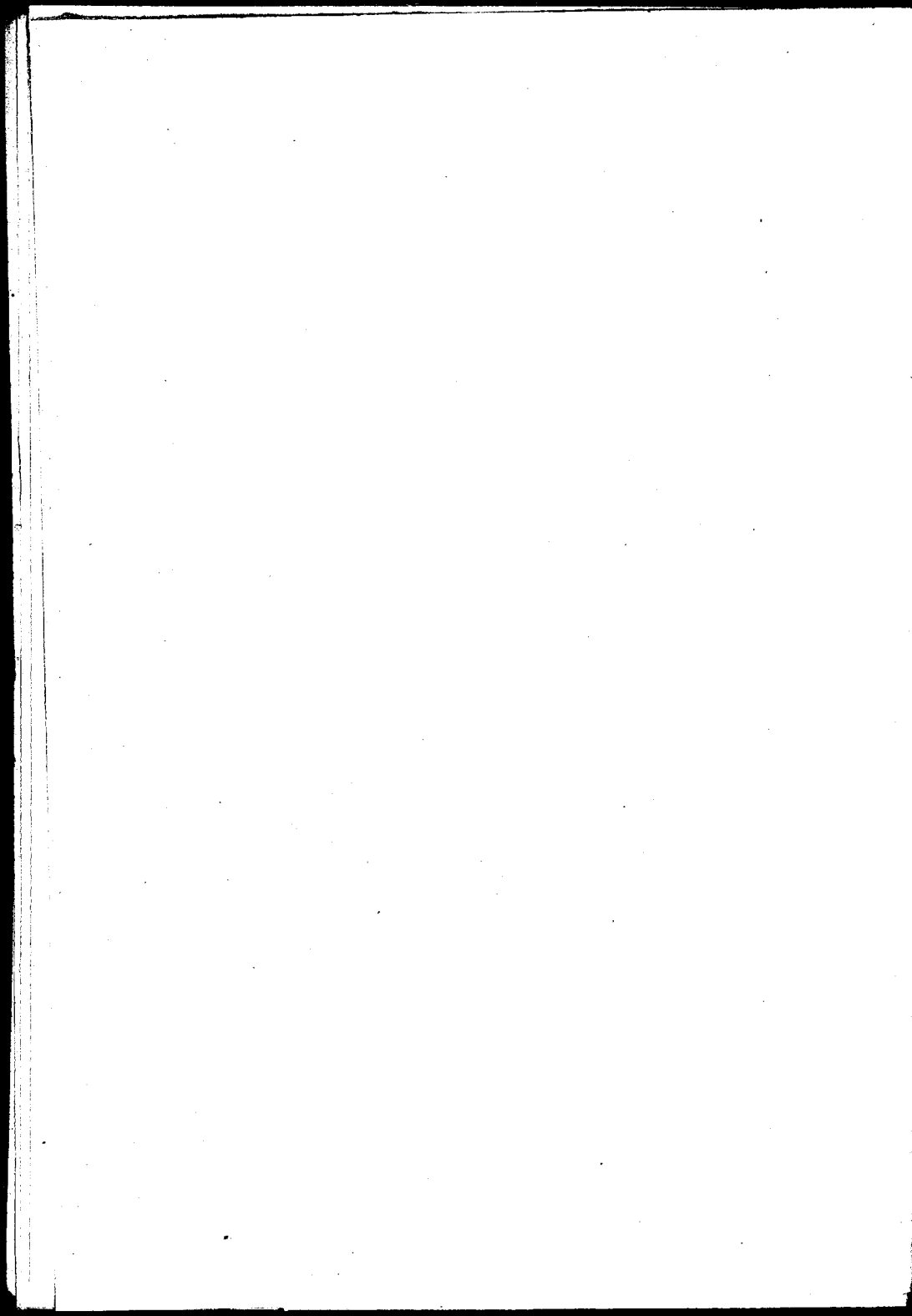
Proeven over de reactie-verandering van diphtherie-bouilloncultures . . . . .	20
Reactie-verandering van cultures in urine . . . . .	40
Reactie-verandering van glycerinehoudende bouillons . . . . .	43
Reactie-verandering in cultures onder afsluiting der zuurstof . . . . .	47
Proeven met bouillon uit versch en oud vleesch . . . . .	52
Proeven over het alkalisch houden van cultures in willekeurige bouillons . . . . .	55

## HOOFDSTUK III.

Reactie-verandering der bouilloncultures van den pseudo-diphtherie-bacillus . . . . .	65
---	----

## HOOFDSTUK IV.

Proeven over de gifproductie in diphtherie-bouilloncultures . . . . .	75
Résumé . . . . .	91
Protocols . . . . .	98
Stellingen. . . . .	117



## INLEIDING.

---

Nadat door KLEBS in 1883 het eerst op den diphtherie bacillus was gewezen en LOEFFLER dezen bacil nader had bestudeerd en zuiver gekweekt, namen, vooral aangespoord door de klassieke onderzoekingen van Roux en YERSIN, talrijke bacteriologen dit onderwerp ter hand. Men zocht in talrijke gevallen van diphtherie naar den nieuwen bacillus, kweekte hem op verschillende bodems, liet hem daarin zijn gif produceeren, experimenteerde daarmede en onderzocht den bacil microscopisch. Zoo kwam men dan ook weldra in het bezit van eene menigte feiten omtrent de biologische en morphologische eigenschappen van den diphtheriebacil en is hij aldus geworden tot een der best bekenden onder de pathogene microben.

Edoch, toen het er op aankwam in betrekkelijk korten tijd diphtheriegif van constante sterkte in groote hoeveelheid te verkrijgen, zooals men dit noodig heeft voor het immuniseeren bij de bereiding van het antidiphtherisch serum, toen ondervonden ook de grondleggers dier therapie, BEHRING en Roux, dat men het verkrijgen

van het gewenschte vergif lang niet in de hand heeft. Zoo zeide BEHRING <sup>1)</sup> nog verleden jaar: „Das Diphtheriegift wird, wie das Tetanusgift, aus Bouillonculturen gewonnen. Die Culturen müssen jedoch, um eine nennenswerthe Ausbeute an Gift zu gewähren, lange Zeit wachsen. Während das Maximum der Tetanusgiftansammlung schon in 8 Tagen erreicht ist, dauert es 2 bis 4 Monate, bis man die Diphtherieculturen zum Zweck der Giftgewinnung verarbeitet.“ Iets verder nog: „Ich selbst bin auf einen bloss noch kleinen Rest einer anfänglich grossen Quantität vom Normalgift angewiesen, welchen ich vor 1½ Jahre durch die verdienstvolle Mitwirkung des Sanitätsrath O. BOER erhalten habe. Derselbe fand unter Hunderten von Litern anscheinend gleich behandelte Diphtherieculturen nur 5 Liter heraus, welche dem Normaldiphtheriegiftwerth entsprachen. Seit dem haben wir uns sehr grosse Mühe gegeben, gleich wirksame Culturen wieder zu bekommen, aber erst in neuerer Zeit, nachdem wir die Temperatur, bei welcher die Diphtherieculturen gezüchtet werden, auf 35° heruntersetzten, glauben wir Aussicht zu haben dieses Ziel regelmässig erreichen zu können.“

Roux heeft, om constant en in betrekkelijk korten tijd (ongeveer 1 maand) vrij sterk diphtheriegif te krijgen, aanbevolen bouilloncultures van den diphtheriebacil aan te leggen in Fernbachsche ballons en arbeidt, sinds hij antidiphtherisch genees-serum op groote schaal fabricceert, met een tweetal groote broedkamers, van kostbare

<sup>1)</sup> BEHRING. Bekämpfung der Infectionskrankheiten. Infection und Desinfection, Leipzig, G. THEME 1894, p. 172 en p. 174.

inrichtingen voorzien, om voortdurend vochtige, steriele lucht over de cultures te doen strijken.

Bij een vergelijkende proef, in het pathologisch instituut alhier genomen, bleek eenzelfde diphtheriebacil, gekweekt in denzelfden bouillon en in dezelfde broedstoof, bij aanvoer van lucht merkwaardiger wijze een zwakker vergif te produceeren dan zonder dien toevoer. Dat feit trok zeer de aandacht, en daar nergens eenige fout viel te ontdekken, moest wel worden aangenomen, dat de omstandigheden, waaronder de bacil zijn vergif produceert, nog op verre na niet voldoende zijn bekend. Bovendien was prof. SPRONCK gebleken, dat volstrekt niet altijd maanden noodig waren, om diphtheriegif te verkrijgen; zoo bleken bv. bouilloncultures in gewone kolven gekweekt, die slechts 17 dagen oud waren, een filtraat te leveren, waarvan de giftigheid 5 malen grooter was dan die van het normaalgif van BEHRING (1894).

Eindelijk was het prof. SPRONCK opgevallen, dat de aanvankelijk zwak alkalisch reageerende bouilloncultures geenszins constant na zekeren tijd een zure reactie aannamen, terwijl alle andere onderzoekers het er over eens zijn, dat die wijziging van de reactie een karakteristiek verschijnsel is, dat de diphtheriebacil bij zijn groei in bouillon teweegbrengt en sommigen zelfs zoover zijn gegaan, om het uitblijven van die reactie-wisseling te beschouwen als een eigenaardigheid, die den pseudo-diphtheriebacil kenmerkt.

Naar aanleiding van die goed geconstateerde feiten, geheel in strijd met de ervaringen van zoo betrouwbare onderzoekers als BEHRING en ROUX, stelde prof. SPRONCK mij voor een onderzoek in te stellen naar de oorzaken

dier tegenstrijdigheden, en de wisselvalligheid, die bij de productie van diphtheriegif op groote schaal zoo ontzettend storend is, zoo mogelijk aan banden te leggen.

Dat wij tot zekere hoogte daarin zijn geslaagd, moge uit de volgende hoofdstukken blijken.

## HOOFDSTUK I.

### Litteratuur Overzicht.

In het jaar 1884 verscheen van de hand van LOEFFLER <sup>1)</sup> een uitvoerige verhandeling: „Ueber die Bedeutung der Mikroorganismen für die Entstehung der Diphtherie beim Menschen, bei der Taube und beim Kalbe.“ Hij vond in vele gevallen de door KLEBS <sup>2)</sup> in 1883 het eerst aangegeven bacillen en het gelukte hem die zuiver te kweeken. Met de reïncultures deed hij talrijke entingen en infectie-proeven bij verschillende dieren, die er alle op wezen, dat de staafjes dezelfde werking uitoefenden als het diphtherie-contagium bij den mensch. Het afdoende bewijs daarvan kon hij echter nog niet leveren. Hij kweekte de zuivere cultures op vleeschinfuus-pepton-gelatine en ontdekte de voortreffelijkheid van het ook nu nog algemeen gebruikte vleeschinfuus-pepton-glucose-serum, welke cultuurbodem naar hem wordt genoemd.

<sup>1)</sup> LOEFFLER. Mittheilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. II 1884, S. 421.

<sup>2)</sup> KLEBS. Verhandlungen des Congresses für inn. Medicin. II. Abtheil. Wiesbaden 1883, S. 139.

In zijn tweede mededeeling, <sup>1)</sup> in het jaar 1887, en in de mededeelingen der onderzoekers in de eerste jaren na 1884, nl. EMMERICH, BABES, SÖRENSEN, D'ESPIE, PENZOLDT, vindt men voornamelijk de actiologische beteekenis van den bacil en zijn morphologische eigenschappen bestudeerd, terwijl VON HOFMANN-WELLENHOF <sup>2)</sup> een, geheel met den diphtheriebacil overeenkomende microbe leerde kennen, die echter avirulent was.

Een zeer belangrijke bijdrage tot de kennis van de diphtherie en de beteekenis van den KLEBS-LOEFFLERSCHEN bacil als oorzaak dier ziekte, leverden ROUX en YERSIN <sup>3)</sup> in 1888 door de ontdekking van het diphtheriegif. Achtereenvolgens in 1888, '89 en '90 verschenen in de „Annales de l'Institut Pasteur” de resultaten hunner uitgebreide, nauwkeurige onderzoekingen. Wegens de groote beteekenis, welke die voor mijn onderwerp hebben, zal ik enkele gedeelten daaruit citeeren. Zoo zeggen zij in hun eerste mededeeling van 1888 van den diphtheriebacil: „Il pousse abondamment dans les milieux liquides; le bouillon de veau légèrement alcalin préparé avec une partie de viande pour deux parties d'eau nous a surtout servi dans ces recherches. Après quelques jours de culture, le bouillon primitivement

---

<sup>1)</sup> LOEFFLER. Ergebnisse weiterer Untersuchungen über die Diphtheriebacillen. Centralblatt f. Bacteriologie u. Parasitenkunde. Bd. II. 1887, N<sup>o</sup>. 4.

<sup>2)</sup> v. HOFMANN-WELLENHOF. Untersuchungen über den Klebs-Loeffler'schen Bacillus der Diphtherie und seine pathogene Bedeutung. Wien. medic. Wochenschr. 3 u. 4. 1888.

<sup>3)</sup> ROUX et YERSIN. Contribution à l'étude de la diphtérie. Ann. de l'Inst. Pasteur T. II 1888, N<sup>o</sup>. 12.

alcalin est devenu acide; cette acidité persiste assez longtemps, puis elle est remplacée par une réaction alcaline si l'air à libre accès dans la culture. Le développement dans le bouillon se fait sous forme de petits grumeaux qui se fixent sur la paroi des vases. A l'abri de l'air, dans la vide, le bacille se cultive facilement, mais moins énergiquement cependant qu'à l'air; dans ce cas le bouillon devient également acide et conserve cette réaction. L'acidité est plus prononcée dans les cultures faites dans le bouillon glyceriné que dans le bouillon simple; dans ce milieu, qui devient bientôt d'une acidité exagérée, le bacille perd sa vitalité. Il en est de même quand il croît sur le sérum glyceriné, qui prend alors une réaction acide, ce qui ne s'observe pas avec le sérum ordinaire."

Wanneer zij de bouilloncultures door een Chamberland filter persten en aldus geheel van microorganismen be-roofden, verkregen zij een filtraat, dat bij injectie in staat bleek dieren te doden onder dezelfde verschijn-selen, als bij enting met de reincultuur der bacillen werd waargenomen. Blevden de dieren verscheidene dagen in leven, dan vertoonden ze typische verlam-mingsverschijnselen, welke LOEFFLER tevergeefs had ge-tracht te voorschijn te roepen door injectie of enting van reincultures.

Zij toonden aan, dat het filtraat van oudere cultures een veel sterkere toxische werking had, dan dat van jongere, verder, dat het gif zich vormt, zoowel in cultures gekweekt zonder toetreding van lucht, als in cultures aan de lucht, en dat het gif sneller werkt bij intra-veneuze injectie, dan bij subcutane.

KOLISKO en PALTAUF <sup>1)</sup> in Weenen, die, ongeveer gelijktijdig met ROUX en YERSIN, proeven namen met gefiltreerde reïncultures van den diphtheriebacil, zagen geen enkele hunner cavia's bezwijken na injectie van 1 cm<sup>3</sup> filtraat eener 14 dagen oude bouilloncultuur. Wel vertoonden de dieren oedeem met opvolgende necrose en ulceratie op de plaats van injectie. Intusschen gelukte het ook dien onderzoekers later zich een zeer werkzaam gif te verschaffen.

In de tweede mededeeling van ROUX en YERSIN, <sup>2)</sup> welke in Juni 1889 verscheen, beschrijven zij de resultaten hunner verdere proefnemingen met gefiltreerde bouilloncultures en deelen zij nadere bijzonderheden mede omtrent den aard van het diphtheriegif. Met betrekking tot mijn onderwerp is bijzonder belangrijk: „Les cultures du bacille de la diphthérie n'ont des propriétés toxiques énergiques que lorsqu'elles sont devenues alcalines. Tant que la réaction est acide, il faut des doses notables de liquide filtré pour produire un effet sur les animaux. La réaction alcaline du liquide est due sans doute à l'oxydation de la matière azotée du bouillon, car elle ne se produit pas dans les cultures faites à l'abri de l'air; de plus dans les cultures anciennes, il se forme au bout de plusieurs mois des cristaux de phosphate ammoniaco-magnésien. Nous ne saurions dire encore si l'ammoniaque est la seule base qui prenne naissance dans les cultures à l'air.”

<sup>1)</sup> KOLISKO und PALTAUF. Zum Wesen des Group's und der Diphtherie. Wien. Klin. Wochensch. 1889, n<sup>o</sup>. 8.

<sup>2)</sup> Ann. de l'Inst. Past. n<sup>o</sup>. 6, 1889.

Zij vonden, dat het gif in het filtraat vernietigd wordt door verhitting boven  $60^{\circ}$ , dat het niet oplosbaar is in alcohol, dat het meegeslept wordt door verschillende praecipitaten, die zich in de vloeistof vormen, zoo van phosphas calcis, van klei-aarde. Deze eigenschappen in verband met de sterke werking van het gif in zeer kleine doses, maakten het waarschijnlijk, dat het diphtheriegif nadert tot de fermenten. Onder deze vindt men er ook, zooals het pancreasferment, die onwerkzaam zijn in een zure vloeistof. Roux en Yersin gingen verder na, of de toevoeging van zuren aan een sterk giftig, alkalisch filtraat, de schadelijke werking daarvan ook verminderde. Dit bleek inderdaad het geval te zijn. Was, de reactie door toevoeging van acidum lacticum of acidum tartaricum duidelijk zuur gemaakt, dan was  $1 \text{ cm}^3$  van die vloeistof niet meer in staat cavia's bij subcutane injectie te dooden, die nu slechts een licht oedeem vertoonden en weldra geheel hersteld waren, terwijl een contrôlecavia, na injectie van  $0,5 \text{ cm}^3$  van het alkalische filtraat, snel succombeerde. Neutraliseert men de zuur gemaakte vloeistof, dan herkrijgt ze weder een groot gedeelte harer vroegere werkzaamheid. Hoe langer het contact met het zuur geduurd heeft, des te meer blijkt ze echter van haar giftigheid verloren te hebben. Zelfs zeer geringe hoeveelheden zuur hebben een merkbaaren invloed op de werkzaamheid van het gif.

Acidum phenicum, acidum boricum, biboras sodae bij het toxisch filtraat gevoegd, vertragen de werking daarvan, zonder evenwel den dood der proefdieren te verhinderen.

Volgens de onderzoekingen van ROUX en YERSIN zou derhalve de alkalische bouillon, waarin diphtheriebacillen gekweekt worden, regelmatig een zure reactie aannemen, om na eenigen tijd weer alkalisch te worden, terwijl deze reactieverandering in hooge mate van invloed is op de toxiciteit van het filtraat.

Uit de door hen ontdekte feiten, dat het filtraat van een diphtheriebouillon haast onwerkzaam is zolang de bouillon nog zuur reageert, terwijl de giftigheid pas voor den dag komt na verloop van eenigen tijd, wanneer de bacteriën hebben opgehouden zich te vermenigvuldigen en de alkalische reactie is ingetreden, en dat de giftigheid stijgt evenredig aan den duur van die reactie, leidt GAMALEIA <sup>1)</sup> eene hypothese af, volgens welke het gif zou besloten zijn in de lichamen der bacteriën en daaruit slechts langzaam door het alkalische vocht zoude uitge-loogd worden.

ZARNIKO <sup>2)</sup> vermeldt, dat zijn zwak alkalisch gemaakte bouillon, (die hij aldus samenstelde: op 100 vleeschin-fuus, 1,0 pepton, 1,0 dextrose, 0,5 keukenzout) meermal reeds in den loop van den tweeden dag zuur werd.

Bovendien bemerkte hij, dat na koken van een zoo-danigen zuren bouillon de reactie onveranderd blijft; ze wordt dus niet door koolzuur veroorzaakt, ten minste niet alleen daardoor.

---

<sup>1)</sup> GAMALEIA. Les poisons bactériens. Paris. RUEFF et Cie 1892. Bibliothèque médicale publiée sous la direction de Charcot et Debove.

<sup>2)</sup> ZARNIKO. Beitrag zur Kenntnis des Diphtheriebacillus. Inaug.-dissert. Kiel 1889 en Centralblatt für Bacteriol. u. Parasitenkunde. Bd. VI. 1889. No. 6--8.

Omtrent den groei in zijn bouillon zegt hij: na 18 uren bemerkt men reeds witte klompjes, die gedeeltelijk op den bodem liggen, gedeeltelijk aan den wand van het glas kleven. Met den microscoop ziet men, dat deze klompjes koloniën zijn, in welke de bacteriën door een zich intensief kleurende massa, worden samengehouden. De verbinding is vrij vast, alleen door voortgezet, sterk schudden is een voorbijgaande troebelheid van den bouillon door verbrokkeling der klompjes te verkrijgen. Spontaan zou de bouillon gewoonlijk nooit troebel worden. Alleen bij zeer weligen groei zou een kortdurende, spontane troebelheid kunnen ontstaan, maar altijd zinken de cellen toch weldra weder op den bodem en laten een volkomen heldere vloeistof boven zich. Evenals ROUX en YERSIN vond hij den groei bij zuurstofafsluiting iets verminderd.

Ook heeft hij den grooten invloed van de reactie van den voedingsbodem op den groei waargenomen. Op alkalische aardappelen groeit de bacil veel beter dan op zure; evenzoo is dit onderscheid zeer sterk bij gelatine.

Die bevindingen omtrent den groei vermeld ik, omdat ik meen door mijne proefnemingen ze nader te kunnen verklaren.

D'ESPINE en DE MARIGNAC <sup>1)</sup> deelen mede, dat de bacil welig groeit in bouillon, samengesteld volgens de formule van LOEFFLER (500 grm. versch rundvleesch gedurende 24 uur gemacereerd in 1 L. water, daarna er aan toegevoegd 10 grm. droge pepton, 5 grm. keukenzout en

<sup>1)</sup> D'ESPINE et de MARIIGNAC. Recherches expérimentales sur le bacille diphthérique. Revue médicale de la Suisse Romande 1890. N<sup>o</sup>. 1 et 2.

7 à 8 grm. glucose, vervolgens alkalisch gemaakt). 24 uren na de uitzaaiing is de bouillon reeds licht zuur, wanneer de hoeveelheid niet grooter is dan 5 tot 6 cm<sup>3</sup>, na 2 dagen echter is de aciditeit altijd duidelijk. Den groei in bouillon beschrijven ze juist als ZARNIKO.

Het eerst toonden ook die schrijvers de mogelijkheid aan, om den bacil te kweken in urine van den mensch. Dat gelukte hun zoowel in urine, die de gewone normale zure reactie had, als in urine, die vooraf was geneutraliseerd. Of deze laatste urine onder invloed van den bacil ook zuur werd, geven zij echter niet aan.

Bij zuurstofafsluiting vonden zij voldoende groei, maar alleen in cultures in vloeibare media. Op een vasten cultuurbodem kwam niets op; maar lieten ze na 3, 6 of zelfs 28 dagen de lucht in de serumbuisjes toetreden, dan begon de cultuur zich nog te ontwikkelen. Zij nemen aan, dat onder deze omstandigheden het virus niet afsterft, maar latent blijft, omdat zij meestal zagen, dat de kolonies bij toetreding der lucht weer opschoten.

Wanneer zij reeds flink opgekomen cultures op LOEFFLERSCH serum, gedurende 8—10 dagen onder de klok van BUCHNER plaatsten, constateerden zij een sterke verzwakking der virulentie, waarschijnlijk het gevolg van het afsterven van een groot gedeelte der bacillen. Deze virulentieafname was echter niet duurzaam, na enkele dagen aan de lucht gestaan te hebben, waren de cultures weer even virulent als vroeger.

Dr. VAN DEN BRINK,<sup>1)</sup> wiens onderzoekingen in het

<sup>1)</sup> J. A. VAN DEN BRINK. Bijdrage tot de kennis van de werking van het diphtherieferment. Proefschrift. Utrecht 1890.

pathologisch laboratorium alhier verricht, in 1890 verschenen, kon de resultaten van ROUX en YERSIN omtrent reactieverandering der diphtherie-bouilloncultures en omtrent den invloed der reactie op de giftigheid geheel bevestigen.

Een hoogst gewichtige studie, vooral voor de kennis van het diphtheriegif, leverde in 1892 GUINOCHET <sup>1)</sup>. Zooals reeds door d'ESPINE en de MARIGNAC was gedaan, kweekte hij den bacil in urine, maar hij nam daarvoor volkomen eiwitvrije urine, ten minste een zoodanige, waarin alle gewone eiwitreacties negatief uitvielen. Hij toonde aan, dat ook in dergelijke urine diphtheriegif geproduceerd werd. En wat vooral van gewicht is, hij vond dat, evenals bij bouillon, de urine, die eerst alkalisch was, zuur werd en later weer alkalisch, en dat ze alleen dan toxisch was, wanneer ze voor de tweede maal alkalisch reageerde. Hij gebruikte voor deze proeven de urines van vier normale personen.

In het uitgebreide werk van ESCHERICH <sup>2)</sup> over aetiologie en pathogenese der diphtherie zegt deze, door zijn studies over diphtherie algemeen bekende onderzoeker, dat hij de zure reactie in zijn bouilloncultures dikwijls reeds na 30 uur zag ontstaan, maar meestal was ze den derden dag duidelijk aan te toonen en nam in de volgende dagen nog in intensiteit toe. De omslag in de alkalische reactie trad bij hem op zijn vroegst op:

<sup>1)</sup> GUINOCHET. Contribution à l'étude de la toxine du bacille de la diphthérie. Archiv. de médecine experim. et d'anat. patholog. T. IV. 1892. p. 487.

<sup>2)</sup> ESCHERICH. Aetiologie und Pathogenese der epidemischen Diphtherie. I. Der Diphtheriebacillus A. HÖLDER. Wien. 1894.

7 weken na de enting; in het grootste getal der in die richting onderzochte cultures echter pas in de 3<sup>de</sup> of 4<sup>de</sup> maand. De alkalische reactie bleef dus bij hem veel langer uit dan bij ROUX en YERSIN, want, hoewel deze laatsten niet direct aangeven, wanneer bij hen de omkeer der reactie plaats greep, valt toch uit hunne opgaven af te leiden, zooals ESCHERICH opmerkt, dat hun bouillon na 23—42 dagen weer alkalisch was geworden.

De omkeer bleef ook bij ESCHERICH uit, wanneer de bouilloncultuur van de lucht was afgesloten. Ze trad veel sneller in (reeds op den 5<sup>den</sup> dag), wanneer lucht werd doorgeleid, zooals dit door middel van de door FERNBACH aangegeven ballons mogelijk is. Was er glycerine in den bouillon, dan bleef de omslag in de alkalische reactie ook uit.

Hij gebruikte bouillon bestaande uit: vleeschinfuus met pepton 1%, keukenzout 0,5% en met of zonder druivensuiker, want, zegt hij, druivensuiker wordt door den bacil niet in merkbare mate omgezet en heeft, aan den voedingsbodem toegevoegd, geen invloed op den groei.

Den groei in bouillon beschrijft hij als ZARNIKO, maar merkt op, dat niet alleen de soort van bouillon, maar ook de hoedanigheid en de reactie van den voedingsbodem en het vegetatievermogen van de cultuur daarop wel van invloed zijn.

TSIKLINSKY <sup>1)</sup> uit zich over groei en reactieverandering van diphtherie-bouilloncultures aldus: „La culture sur

---

<sup>1)</sup> M<sup>lle</sup> P. TSIKLINSKY. La diphthérie. Etat actuel de nos connaissances bactériologiques. Revue générale des sciences pures et appliquées. N<sup>o</sup>. 23. 1894.

bouillon offre un aspect spécifique: le liquide reste clair, tandis qu'à la surface apparaît un voile qui se colle aux parois: ce voile est formé de bacilles diphtériques enchevêtrés. Si l'on abandonne la culture à elle-même, le milieu devient acide au bout de 15 jours à peu près; après quoi il redevient alcalin."

KUPRIANOW, <sup>1)</sup> die in het vorige jaar in het laboratorium van LOEFFLER een onderzoek verrichtte over immuniteit bij diphtherie, ondervond ook de moeielijkheid verbonden aan het bereiden van een diphtheriegif van constante sterkte, dat hij noodig had, om de immuniseerende kracht van bloeds serum te bepalen.

Hij onderzocht de giftigheid van cultures in peptonbouillon (aldus samengesteld: bouillon 100, pepton 1.0, keukenzout 0,5, met carbon. natrie. zwak alkalisch gemaakt) 2, 4 en 6 maanden na de enting. Het filtraat van de 2 maanden oude cultuur doodde, in een hoeveelheid van 1 cm<sup>3</sup> bij een cavia van 180 grm. ingespoten, dit dier niet. Er ontstond alleen licht oedem op de plaats van injectie en later necrose.

Het filtraat van de 4 maanden oude cultuur was nog zwakker en dat van 6 maanden zelfs zóó zwak, dat het in de hoeveelheid van 5 cm<sup>3</sup> niet in staat was een cavia te doden. Hij kon dus op deze manier geen gif verkrijgen, dat sterk genoeg was voor zijn doel.

Ongeveer even ontmoedigende resultaten, wat gifproductie aangaat, verkreeg hij door filtratie van 6 en 8

<sup>1)</sup> J. KUPRIANOW. Experimentelle Beitrage zur Frage der Immunität bei Diphtherie. Centralblatt f. Bacteriol. u. Parasitenk. 1894. Bd. XVI. N<sup>o</sup>. 10/11.

weken oude cultures in bloedserum, naar een door hem aangegeven methode.

Op voorstel van LOEFFLER nam hij daarom de volgende proeven. Hij maakte pepton-bouillon vrij sterk alkalisch met kaliloog, voegde nu aan gelijke gedeelten van dezen bouillon normaal zoutzuur toe in de hoeveelheden van 10, 20, 30, en 40 cm<sup>3</sup> pro liter, terwijl hij bij één gedeelte niets deed. Op deze wijze verkreeg hij dus 5 verschillende bouillons. De bouillon, waaraan geen zoutzuur was toegevoegd, reageerde vrij sterk alkalisch, die waaraan 10‰ was toegevoegd, neutraal, de overige meer of minder zuur voor lakmoespapier. Al deze proeven werden met dezelfde diphtheriebacillen goënt. Ze tierden het best in die met 10‰ zoutzuur, voldoende in die met 20‰ zoutzuur en in die zonder zoutzuur, terwijl die met 30‰ en 40‰ slechts zeer zwakken groei vertoonden. Het filtraat van de cultuur in bouillon met 10‰ zoutzuur had na 2 weken zoo sterke toxiciteit, dat 0,16 de dosis letalis minima pro kilo cavia vormde. Het filtraat der 3 weken oude bouilloncultuur met 20‰ zoutzuur had slechts een zeer geringe toxiciteit. Daarentegen was het filtraat der 3 weken oude cultuur, waaraan geen zoutzuur was toegevoegd, zoo sterk giftig dat 0,01 cm<sup>3</sup> een cavia van 500 grm. in 2-3 dagen doodde, dus minstens 8 malen sterker dan het filtraat van den bouillon met 10‰ zoutzuur; het was bijna even sterk als een 2 dagen oude levende cultuur.

De proeven met 30‰ zoutzuur werden niet op hare gifproductie onderzocht.

Merkwaardig is het feit, dat de sterkste gifproductie niet had plaats gegrepen in den bouillon, waarin de

sterkste groei was. De schrijver zegt dan ook: „Nach den vorstehenden Versuchen hat es den Anschein, als ob, abgesehen von der Virulenz der Kultur, der Grad der Alkalescenz der Bouillon das ausschlaggebende Moment bei der Giftbildung sei.”

Toen hij voor een latere proef weer een sterkwerkend gif noodig had, nam hij dus een, nauwkeurig als de bovenbeschreven vervaardigden, peptonbouillon, dien hij evenzoo met kaliloog alkalisch maakte, maar tegen alle verwachting verkreeg hij toen een veel zwakker gif. Hij had het dus nog lang niet in de hand. Intusschen leverde hem een, met carbonas natricus zwak gealkaliseerde, peptonbouillon, weer een zeer werkzaam gif.

Verdere studies over gifproductie in bouillon, schijnt KUPRIANOW, daar het met zijn onderzoek niet in direct verband stond, niet gemaakt te hebben.

Als een doorslaand bewijs van de onbekendheid, waarin men verkeert omtrent de voorwaarden, onder welke de bacil zijn gif produceert en men het kan verkrijgen, en het, uit die onbekendheid voortsputtende, sterk uiteenloopen van de meeningen der onderzoekers, wil ik hier de opvatting van SCHEURLLEN weergeven, zooals hij die onlangs heeft bekend gemaakt in een referaat van zijne hand in het Centralblatt für die medicinischen Wissenschaften <sup>1)</sup>. Hij zegt daar: „Die Darstellung des Diphtheriegiftes, das zur möglichst starken Schutzimpfung

<sup>1)</sup> SCHEURLLEN. Centralblatt f. die med. Wissenschaften. 1895. N<sup>o</sup>. 5. blz. 78. Ref.: Sur la sérumthérapie au nom d'une Commission Composée de M. M. BERGERON, CADET DE GASSICOURT, PROUST et STRAUSS rapporteur. Bullet. de l'acad. de med. Paris. 1894. N<sup>o</sup>. 42 en Le Progrès médic. 1894. N<sup>o</sup>. 42.

gebraucht wird, geschieht auf die Weise, dass man eine 24 stündige Diphtherie-kolonie in einen Kolben mit alkalischer Peptonbouillon bringt, und dann die Kolben in den Brutofen stellt; dieselben sind seitlich mit einem Glasrohr versehen, das eine dauernde Luftcirculation ermöglicht. (*Diese seitliche Röhre ist nicht nöthig; die Luftcirculation hat auf die Giftbildung keinen Einfluss; es ist nur nöthig, die Kolben so lange im Brutofen zu lassen, bis die Reaction deutlich und dauernd sauer geworden ist, was in 3—6 Wochen geschehen ist. Ref*)  $\frac{1}{110}$  g. dieses Giftes tötet ein 500 g. schweres Meer-schweinchen in 24 Stunden."

Volgens SCHEURLÉN is dus juist een zure reactie van de vloeistof noodig, om een hoogen graad van giftigheid te verkrijgen.

Eindelijk rest mij nog te vermelden, wat in de verschillende hand- en leerboeken der bacteriologie, die ik heb kunnen raadplegen, over die questie gezegd wordt. Men vindt ze in het geheel niet aangeroerd, zooals bij GÜNTHER,<sup>1)</sup> FRAENKEL en PFEIFFER,<sup>2)</sup> of wel, men spreekt alleen met enkele woorden van de door ROUX en YERSIN ontdekte reactieverandering als van een constant optredend verschijnsel bij diphtherie-bouilloncultures, zoo: HELM,<sup>3)</sup> CORNIL et BABES,<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> C. GÜNTHER. Einführung in das Studium der Bakteriologie. Leipzig. G. THIEME, 1891.

<sup>2)</sup> C. FRÄNKEL und R. PFEIFFER. Mikrophotographischer Atlas der Bakterienkunde. Berlin. A. HIRSCHWALD, 1892.

<sup>3)</sup> L. HELM. Lehrbuch der bakteriologischen Untersuchung und Diagnostik. Stuttgart. F. ENKE, 1894.

<sup>4)</sup> CORNIL et BABES. Les bactéries. Paris. F. ALCAN. 1890. Ed. 3<sup>e</sup>. T. II.

MACÉ, <sup>1)</sup> WURTZ. <sup>2)</sup> De groei in bouillon wordt ook beschreven als een troebelheid, die echter weldra overgaat in de vorming van een kruimelig praecipitaat op den bodem, terwijl de bovenstaande vloeistof helder wordt en blijft. HEIM schrijft dit laatste toe aan het ontbreken der eigen beweging van den diphtheriebacil.

Ziedaar alles wat ik, met betrekking tot de gifproductie in diphtherie-bouilloncultures, uit de uitgebreide litteratuur over de bacteriologie der diphtherie heb kunnen verzamelen.

Alle onderzoekers zijn dus overtuigd van de reactieverandering van diphtherie-bouilloncultures en van den grooten invloed van de reactie van het filtraat op zijn giftige werking.

Bij de fabricatie van antidiphtherisch genees-serum, gelijk die te Höchst, Berlijn en andere plaatsen op groote schaal geschiedt, schijnen verschillende methoden gebruikt te worden. Nadere bijzonderheden daaromtrent zijn mij evenwel niet bekend. Te oordeelen naar de maximale sterkte van het antidiphtherisch serum, dat de fabrieken van MEISTER LUCIUS en SCHERING in den handel brengen, ondervindt men daar bij de gifproductie blijkbaar nog moeielijkheden.

Indien althans daar constant sterk vergif werd verkregen zou de maximumsterkte stellig reeds meer dan 200 eenheden BEHRING-EHRLICH bedragen.

---

<sup>1)</sup> MACÉ. *Traité pratique de bactériologie*. Paris. BAILLÈRE et FILS. 1892. Ed. 2<sup>e</sup>.

<sup>2)</sup> WURTZ. *Précis de bactériologie clinique*. Paris. G. MASSON. 1895.

## HOOFDSTUK II.

---

### **Proeven over de reactieverandering van diphtherie-bouilloncultures.**

---

Zooals reeds in de inleiding is vermeld, had prof. SPRONCK in strijd met alle, in het vorige hoofdstuk genoemde onderzoekers, waargenomen, dat zijne aanvankelijk zwak alkalische bouilloncultures lang niet constant na eenigen tijd een zure reactie hadden aangenomen. Het was dus voor mij in de eerste plaats aangewezen de reactie van eenige bouillons, waarin diphtheriebacillen werden gekweekt, nauwkeurig na te gaan. Ik nam daartoe een drietal in het laboratorium aanwezige bouillons, allen uit kalfvleesch vervaardigd volgens hetzelfde hier gebruikelijke procédé, maar op verschillende tijden.

Ze bestonden uit kalfsvleeschinfuus van 1 deel vleesch op 2 deelen water, waaraan was toegevoegd 1% pepton Witte en 0,5% keukenzout, terwijl de reactie zwak alkalisch was gemaakt met carbonas natricus.

De reactiebepaling geschiedde in alle volgende proeven door met een vooraf gegloeide platinanaald een drupje vloeistof uit het buisje te nemen en dat te brengen op een lakmoespapiertje. Zodoende kon men hetzelfde buisje herhaalde malen onderzoeken zonder dat daardoor

ooit verontreiniging der cultuur is voorgekomen. Was de wattenprop reeds meerdere malen afgenomen, om de reactie te bepalen, en constateerde men daarna plotseling een verandering van de reactie, dan werd regelmatig uitgezaaid, om de reinheid van de cultuur met zekerheid vast te stellen.

In alle volgende proeven werden de cultures gekweekt bij  $35^{\circ}$ — $36^{\circ}$  C. Ik bezigde drie exemplaren van diphtheriebacillen, die in het laboratorium aanwezig waren en waarmede men bij cavia's proeven had verricht, om na te gaan, of zij geschikt waren voor gifproductie. Daarbij was gebleken, dat  $0,1 \text{ cm}^3$  van een 24-uren oude bouilloncultuur, onder de huid gespoten, cavia's van 200—300 grm. binnen circa 24 uren doodde.

Het zij hier nog vermeld, dat het filtraat van de 17 dagen oude cultuur, waarover in de inleiding is gesproken, en dat een giftigheid bezat 5 malen sterker dan het normaalgif van BEHRING (1894), duidelijk alkalisch reageerde. Indien er dus een zure reactie had bestaan, was deze relatief van korten duur geweest, want de onderzoekers, die een bepaalden tijd aangeven na verloop van welken bij hen de zure reactie weder verdween, met name ROUX en YERSIN en ESCHERICH, konden geen van allen na een zoo korten tijd den omslag in de alkalische reactie constateeren. Bij later onderzoek echter van denzelfden bouillon bleek, dat er feitelijk in het geheel geen zure reactie volgde, wanneer diphtheriebacillen, uit pseudo-membranen van verschillende diphtherielijders geïsoleerd, daarin waren uitgezaaid.

Ik zal nu in de volgende proeven de resultaten vermelden, die ik verkreeg bij nauwkeurige bepaling der

reactie in het drietal kalbsvleesch-bouillons, die in het laboratorium aanwezig waren.

*Proef I.*

Eene serie buisjes, die elk 10 cm<sup>3</sup> van een dier bouillon bevatten, werden na zorgvuldige sterilisatie en controle op hun steriliteit, geënt met denzelfden bacil, waarmede de bovengenoemde hooge giftproductie verkregen was (in het laboratorium geclassificeerd als diphtheriebacil n<sup>o</sup>. 101). Om de 2 à 3 uur werd de reactie bepaald. Na 7 uur was deze amphoteer, na 20 uur duidelijk zuur, dit bleef zoo gedurende bijna 3 dagen, toen werd ze weer zwak zuur, amphoteer; om den 4<sup>den</sup> dag na de enting weer duidelijk alkalisch te worden. Gedurende de volgende 21 dagen bleef de reactie, dagelijks opgenomen, dezelfde, werd eer nog sterker alkalisch.

10 uren na de enting was de bouillon reeds licht troebel en werd dit gaandeweg al meer; toen echter de zure reactie optrad, scheen de groei niet voort te gaan, langzamerhand zonken de bacteriën op den bodem, vormden daar een korrelig praecipitaat en de bovenstaande vloeistof werd weer helder. Dit duurde totdat de reactie alkalisch werd, waarbij in korten tijd de geheele vloeistof intensief troebel werd, zij bleef dit nu gedurende verscheidene dagen; langzamerhand klaarde ze van boven af aan weer op, terwijl zich een volumineus, vlokkig praecipitaat op den bodem verzamelde.

Op deze wijze van groei, die ik, in overeenkomstige bouillons, bij al mijne proeven heb waargenomen, wensch ik later nog terug te komen.

*Proef II.*

Een cultuur van diphtheriebacil 101, in een andere voorhanden kalfsvleeschbouillon, die, evenals de vorige, gemaakt was volgens het hier gebruikelijke procédé, dat ik heb beschreven, werd gedurende 21 dagen evenals de vorige op hare reactie onderzocht. Tot mijne verrassing werd deze echter heelemaal niet zuur, de alkalische reactie bleef steeds duidelijk, nam zelfs in de laatste dagen eenigszins in intensiteit toe. De groei in dezen bouillon was een voldoende. Reeds na 9 uur was de bouillon licht troebel en den volgenden dag intensief; dit bleef aldus gedurende ongeveer 12 dagen, toen klaarde hij langzamerhand op en na 3 weken was er een sterk, vlokkig praecipitaat op den bodem, dat door licht schudden van het buisje opwarfelde en de vloeistof troebel maakte.

Het alkalisch blijven van dien bouillon was geenszins een gevolg van verontreiniging met andere bacteriën. Contrôle-uitzaaiingen lieten omtrent de zuiverheid der cultuur geen twijfel over.

Daar alle onderzoekers als een kenmerkende eigenschap van den bacil beschrijven, dat hij de bouilloncultures na eenigen tijd zuur doet worden, had ik hier dus een geheel afwijkend resultaat verkregen, dat tot verder onderzoek aanspoorde.

*Proef III.*

Ik bepaalde weder de reactie van een cultuur van denzelfden bacil 101 in een derden kalfsvleeschbouillon. Deze cultuur was den volgenden dag duidelijk zuur, bleef dit gedurende 11 dagen en werd toen weer alka-

lich. De groei kwam geheel overeen met den in den eersten bouillon beschrevenen: zoolang de reactie zuur bleef, was er een korreelig praecipitaat op den bodem met een heldere, bovenstaande vloeistof; zoodra de alkalische reactie intrad, werd deze weer troebel.

Daar nu de nadeelige invloed van het zuur op de giftigheid van het filtraat bekend is en een sterke gift-productie was geconstateerd in een cultuur, die steeds alkalisch bleef, lag het voor de hand de sterke giftige werking met het ontbreken der zure reactie in verband te brengen. Het was dus aangewezen te trachten de oorzaak te vinden van die gewoonlijk voorkomende reactieverandering; aldus zou men de afwijkende resultaten bij mijn proeven verkregen kunnen verklaren en zou men in staat zijn willekeurig bouillons te vervaardigen, die steeds alkalisch bleven of zuur werden. In dergelijke verschillende bouillonsoorten zou men dan de gifproductie kunnen bestudeeren.

Alle in de vorige proeven onderzochte cultures waren met denzelfden bacil geënt, ze hadden onder zooveel mogelijk identische omstandigheden verkeerd, wat temperatuur, vorm en vulling der buisjes aangaat. Men moest dus wel in de eerste plaats in de samenstelling van den bouillon de oorzaak zoeken van het al of niet optreden der zure reactie. Hoewel nu altijd nauwkeurig dezelfde methode gevolgd werd bij de vervaardiging van dien voedingsbodem, is toch de samenstelling der daarbij gebruikte ingrediënten, speciaal van het vleesch, te wisselend, om bouillons met een constant gehalte aan verschillende stoffen te doen verkrijgen.

Op deze inconstante samenstelling van den bouillon is

dan ook inderdaad reeds meermalen geweest, echter juist niet direct met het oog op diphtheriecultures.

Door de onderzoekingen van PETRUSCHKY <sup>1)</sup> vooral had men verschillende bacteriën leeren kennen, die door hem in lakmoesmelk gekweekt, duidelijk zuur produceerden en andere, die daarentegen alkali vormden. Onder de zuurvormers behoorden o. a. bacillus typhi abdom, bacillus pneumonicus Friedländer, bacillus coli communis, bacillus prodigiosus.

VON SOMMARUGA <sup>2)</sup> verrichtte in 1892 een dergelijk onderzoek; hij verkreeg echter bij dezelfde microben resultaten, die soms lijnrecht stonden tegenover die van PETRUSCHKY.

Zoo waren bac. typhi abdom, bac. pneumonicus Friedländer, bac. coli communis, bij hem alkalivormers.

VON SOMMARUGA gebruikte voor deze proeven bouillon gemaakt uit 1 kilo vleesch pro liter met 1 % pepton en 0,5 % keukenzout. Juist aan dit verschil in samenstelling van zijn voedingsbodem met dien van PETRUSCHKY schrijft hij de sterk afwijkende resultaten toe. Hij wijst er vooral op, dat in den voedingsbodem van dezen laatsten melksuiker voorkomt en zegt: „So gut es nun bekannt ist, dass manche Bacterien eine Zuckerart oder mindestens das bis zu einem gewissen Grade sich ähnlich verhaltende Glycerin zu ihrer Ernährung geradezu bedürfen,

---

<sup>1)</sup> PETRUSCHKY. Bakterio-chemische Untersuchungen. Centralblatt. f. Bakteriöl. u. Parasitenk. 1889. Bd. VI. S. 625 u. 657. 1890. Bd VII. S. 1 u. 49.

<sup>2)</sup> VON SOMMARUGA. Ueber Stoffwechselproducte von Mikroorganismen. I Mittheil. Zeitschrift f. Hygiene u. Infectiouskrankheiten. 1892. Bd. XII. S. 273.

so ist es nicht zu bezweifeln, dass andere Arten den Zucker, ohne ihn gerade zu bedürfen, doch zu zersetzen im Stande sind". SCHARDINGER, NENCKI, BISCHLER, BLACHSTEIN, BOUTROUX en vele andere onderzoekers hebben dan ook die omzetting van glucose en andere suikers in zuur, speciaal melkzuur, zien plaats grijpen onder invloed van verschillende bacteriën.

Een interessant onderzoek over deze kwestie, met betrekking op bac. typhi abdom. en bac. coli commun. deelde PÉRÉ <sup>1)</sup> mede. Hij vermeldt vooreerst de zeer uiteenlopende meeningen over het al of niet zuur worden van typhuscultures in geneutraliseerden bouillon en de onderscheiding, die sommigen hebben willen maken door middel van deze eigenschap tusschen den typhusbacil en den bac. coli communis.

De elkander tegensprekende resultaten, die hij daarbij aanhaalt, zijn volgens hem ook vooral te verklaren uit de verschillende samenstelling der gebruikte voedingsmedia.

De bouillons bevatten, behalve gecompliceerde N-houdende verbindingen, ook stoffen tot de groep der koolhydraten behoorende, die niet altijd dezelfde kunnen zijn, maar veranderen met den toestand van versheid van het vleesch of met de wijze van bereiding. Men kan er namelijk in aantreffen: glycogeen, glucose en melkzuur. Afhankelijk van het oorspronkelijk gehalte aan glycogeen in de spieren van het dier bij den dood en van omstandigheden, die in het vleesch na den dood een omzetting in glucose en verder in andere producten, voornamelijk

---

<sup>1)</sup> PÉRÉ. Contribution à la biologie du bacterium coli commune et du bacille typhique. Ann. de l'Inst. Past. n<sup>o</sup>. 7 1892.

melkzuur, hebben kunnen veroorzaken, is het gehalte aan glycogeen, glucose of melkzuur in het vleesch zeer wisselend.

PÉRÉ nu maakte oplossingen van eiwitachtige lichamen, voegde daaraan verschillende zouten toe en kreeg aldus voedingsmedia, die geen koolhydraten bevatten en waarin beide bacteriën, *bac. typhi abdom.* en *bact. coli comm.*, goed groeiden. Beide vormden, als alle bacteriën, die de eiwitachtige stoffen ontbinden, ammoniak en maakten zoo het cultuurmedium alkalisch, eerst echter was er altijd voor beiden een korte periode van aciditeit. Maar in bouillon (gemaakt uit gelijke deelen vleesch en water) was deze aciditeit veel sterker. Men mag dus aannemen, dat in bouillon het zuur niet geheel afkomstig is van de eiwitachtige stoffen, maar voor een groot deel van koolhydraten. Is dit juist, zoo redeneerde PÉRÉ, dan moet men ook uit vleesch, naar gelang het korter of langer bewaard is, en er dus meer of minder glucose in aanwezig is, bouillons kunnen verkrijgen, die verschillende aciditeit of zelfs in het geheel geen aciditeit vertoonen. Die conclusie bleek juist te zijn. Hij nam een versch stuk rundvleesch, bewaarde het bij 10°—13° en maakte op verschillende tijden door hetzelfde procédé daarvan bouillons. In den van versch vleesch bereiden bouillon produceerde zoowel de *bac. typhi* als de *bac. coli comm.* zuur. Was het vleesch daarentegen 40 tot 48 uren bij genoemde temperatuur bewaard, dan brachten in de daaruit bereide bouillons de genoemde bacteriën bij hun groei geen zuur voort.

De bovengemelde elkander tegensprekende resultaten werden aldus door PÉRÉ voldoende verklaard. Alles

hangt af van de voorwaarden, waaronder de proef geschiedt en die voorwaarden zijn niet voldoende aangeduid, wanneer men alleen zegt, dat men in bouillon cultiveert. Dat zooveel gebruikte voedingsmedium heeft een te sterk variërende samenstelling, om zonder meer voor de studie van de functies der microben te kunnen dienen.

Ook PANE, <sup>1)</sup> die opmerkte dat *bact. coli commune* ook gas ontwikkelt in gewonen bouillon, zonder toevoeging van glucose, wijst er op, dat dergelijke bouillon toch reeds een zekere hoeveelheid glucose bevat, afkomstig uit het vleesch; hij bepaalde die hoeveelheid uit de gasontwikkeling in de cultures en vond dat ze variëerde van 0,05--0,1 op 100 deelen bouillon.

Het lag derhalve voor de hand te onderstellen, dat ook bij het zuur worden van met den diphtheriebacil bezaaiden bouillon, koolhydraten een rol spelen. Te meer, waar zóó in het oog springende verschillen werden waargenomen, gelijk die boven bij bouillons, schijnbaar van gelijke samenstelleng, door mij zijn beschreven.

Daar nu evenwel ESCHERICH <sup>2)</sup> heeft beweerd, dat druivensuiker niet in merkbare mate door den bacil wordt omgezet, scheen het wenschelijk eenige proeven te verrichten om ESCHERICH's onderzoekingen te contróleeren. Ik deed dat door aan een bouillon, die gebleken was alkalisch te blijven, druivensuiker toe te voegen.

---

<sup>1)</sup> PANE. Sulla diversa quantita di glucosio che si trova nel brodo in rapporto al diverso grado di fermentazione di alcuni batteri. Rivista clinica e terapeutica 1892, p. 577. Referaat in Baumgarten's Jahresbericht 1892, p. 462.

<sup>2)</sup> ESCHERICH. l. c.

*Proef IV.*

Een vrij groote hoeveelheid van den bouillon in proef II onderzocht, die dus door den diphtheriebacil niet zuur gemaakt werd, was nog in het laboratorium aanwezig.

Met dien bouillon werden 5 kolven, van denzelfden vorm en gelijke grootte, gevuld. Iedere kolf bevatte 200 cm<sup>3</sup>; in elke van deze werd nu een verschillende hoeveelheid glucose opgelost, zoodat men verkreeg:

Kolf A. met 0,2 mgrm. glucose = 0,0001 %.

Kolf B. met 1 mgrm. glucose = 0,0005 %.

Kolf C. met 2 mgrm. glucose = 0,001 %.

Kolf D. met 20 mgrm. glucose = 0,01 %.

Kolf E. met 200 mgrm. glucose = 0,1 %.

Uit iedere kolf werden 3 buisjes gevuld, elk met ongeveer 10 cm<sup>3</sup>.

De kolven zouden dienen, om later gefiltreerd te worden tot onderzoek van de toxiciteit, terwijl de buisjes gebruikt werden om de reactie na te gaan.

Nadat de bouillons in de kolven en buisjes zorgvuldig gesteriliseerd en gecontrôleerd waren, werden ze geënt met diphtheriebacil 101 uit een 3-dagen oude, alkalische bouilloncultuur.

Alle cultures waren den volgenden dag reeds duidelijk troebel. Die troebelheid nam in de eerste dagen nog toe en bleef toen stationnair. Verschil in groei tusschen de verschillende bouillonsoorten was niet op te merken.

De reactie in de buisjes werd bepaald eenige uren na de enting, den volgenden dag 2 malen en verder dagelijks éénmaal. De waarneming duurde 19 dagen.

Alle bouillonsoorten nu bleven alkalisch; ook de kolven

werden onderzocht en eveneens alkalisch gevonden. Toch was er een opmerkelijk verschil in de intensiteit der reactie. Den 3<sup>den</sup> dag bleek reeds duidelijk, dat de alkaliteit van den bouillon met 0,1 % glucose zwakker was geworden. Den volgenden dag was dat verschil nog duidelijker en men kon toen, door snel achter elkaar met de platinanaald een weinig van de verschillende bouillons op hetzelfde lakmoespapiertje te brengen, een in intensiteit van kleur afdalende reeks vlekjes verkrijgen, waarbij bleek, dat de bouillons met 0,0001 %, 0,0005 % en 0,001 % het sterkst alkalisch, die met 0,01 % zwakker en die met 0,1 % verreweg het zwakst alkalisch waren.

Gedurende 5 dagen ongeveer bleef de alkaliteit in den bouillon met 0,1 % duidelijk zwakker dan in de overige. Na dien tijd werd ze in alle buisjes gelijk en nam in het algemeen een weinig toe.

Uit dit resultaat kon men dus afleiden, dat de bacil n<sup>o</sup>. 101 in bouillons met hoeveelheden glucose van 0,1 % en minder, niet in staat was een zure reactie te voorschijn te roepen, maar er werd blijkbaar toch zuur geproduceerd, kenbaar aan de afname in intensiteit der oorspronkelijke, alkalische reactie; de hoeveelheid zuur was echter, niet voldoende om die te neutraliseeren.

Het scheen dus wenschelijk de proef te herhalen met denzelfden bouillon, waaraan grootere hoeveelheden suiker waren toegevoegd.

#### *Proef V.*

Met denzelfden bouillon, waarin, zooals gezegd, bacil n<sup>o</sup>. 101 geen zuur vormde, werden weer 5 kolven gevuld,

4 er van elk met 200 cm<sup>3</sup> en 1 met 100 cm<sup>3</sup>, wjl de voorraad bouillon was uitgeput. De volgende hoeveelheden suiker werden aan elke kolf toegevoegd:

Kolf A. 400 mgrm. glucose = 0,2 %.

Kolf B. 800 mgrm. glucose = 0,4 %.

Kolf C. 1200 mgrm. glucose = 0,6 %.

Kolf D. 1600 mgrm. glucose = 0,8 %.

Kolf E. 1000 mgrm. glucose = 1 %.

Uit elke kolf werden weer drie busjes gevuld met ongev. 10 cm<sup>3</sup>. Twee van elke serie dienden voor de reactiebepaling der diphthericcultures; in één werd een pseudo-diphtheriebacil geënt, waarop ik later zal terugkomen.

De enting der kolven en busjes geschiedde 14 Februari, 10,30 v.m. met bacil n<sup>o</sup>. 101, uit een 8-dagen oude, alkalische bouilloncultuur. 4,30 n.m. waren alle busjes nog alkalisch. Den volgende dag, 10,30 v.m., dus na 24 uur, waren alle duidelijk zuur. Deze zure reactie bleef nu bestaan, werd zelfs in de eerste dagen nog wat sterker. De proef met de busjes werd voortgezet gedurende 74 dagen, van 14 Februari tot 29 April. Op 23 Maart kwamen bij enting uit den bouillon met 0,2 % glucose op glycerincagar nog enkele diphtheriekolonies op. Hoewel de bouillon in de busjes door uitdroging tot ongeveer  $\frac{1}{3}$  van zijn oorspronkelijk volumen was geslonken en de bacillen 36 dagen in een vrij intensief zure vlocistof hadden verkeerd, bleken ze dus nog niet afgestorven te zijn. Op 18 April echter kwam bij herhaling van de uitzaaiing op glycerineagar en op serum niets meer op. Ook in de andere bouillons waren de bacillen toen afgestorven.

De kolven werden na 19 dagen gefiltreerd. Al die bouillons reageerden ook zuur, behalve die met 0,2% glucose; deze was alkalisch geworden, maar bij uitzaaiing op glycerineagar bleek deze cultuur niet zuiver gebleven te zijn. Het microscopisch onderzoek der opgekomen, in het geheel niet op diphtherie gelijkende kolonies toonde namelijk enkel coccen aan. De overige cultures waren zuiver.

Wat den groei in de buisjes en kolven betreft, deze kwam vrijwel overeen met de beschrijving, die ZARNIKO <sup>1)</sup> geeft van den typischen groei in bouillon. Slechts een kortdurende, spontane troebelheid was er ontstaan, toen, ongeveer samenvallend met het tijdstip, waarop de zure reactie intrad, de vloeistof ophelderde en de bacteriën op den bodem zonken. Deze helderheid nu bleef steeds bestaan, hoewel het korrelige praecipitaat op den duur toch ook eenigszins was toegenomen.

Wanneer de buisjes eenigen tijd rustig hadden gestaan, moest men vrij sterk schudden, om de vloeistof troebel te maken. Deze troebelheid verdween dan weer langzamerhand.

Ik kan het derhalve niet eens zijn met ESCHERICH wanneer hij zegt, dat druivensuiker niet in merkbare mate door den diphtheriebacil wordt omgezet.

Daar in de vorige proeven geen omslag van de zure reactie werd geconstateerd, de cultuur of alkalisch bleef, of zuur werd en bleef, kwam het mij waarschijnlijk voor, dat ik in de tweede serie (proef V) te veel suiker had toegevoegd, zoodat de omslag wel zou te voorschijn

---

<sup>1)</sup> ZARNIKO, l. c.

komen als ik een quantiteit suiker koos, die inlag tusschen de hoeveelheid bij proef IV en die bij proef V gebezigd.

De volgende proef levert het bewijs, dat die meening juist is.

*Proef VI.*

Een buisje, gevuld met denzelfden bouillon, maar waaraan nu 0,15 % glucose was toegevoegd, werd geënt met bacil n°. 101 uit de stamcultuur. Den volgenden dag was de bouillon zuur, dit bleef aldus gedurende 3 dagen; daarna nam hij langzamerhand weer een duidelijk alkalische reactie aan. Gedurende 40 dagen werd de cultuur nog geobserveerd; maar zij bleef die reactie behouden. Wel nam de intensiteit der alkalische reactie toe.

Een tweede buisje met denzelfden bouillon met 0,15 % glucose werd geënt met een anderen diphtheriebacil, bekend als n°. 102. Deze cultuur was den volgenden dag amphoteer, den derden dag duidelijk zuur, bleef dit 4 dagen lang en werd toen weer alkalisch.

0,15 % glucose was dus ongeveer de juiste hoeveelheid, welke een bouillon moest bevatten, wilde men door den groei van beide gebezigde bacillen daarin nog een omslag van de zure in de alkalische reactie te voorschijn zien komen, namelijk onder de omstandigheden, waarin de cultuur van beiden had plaats gegrepen.

Gelijk reeds vermeld, hebben Roux en YERSIN het eerst aangetoond, dat het ontstaan der alkalische reactie in diphtherie-bouilloncultures te wijten is aan

oxydatie der N-houdende stoffen in den bouillon, voornamelijk gekenmerkt door het gevormd worden van ammonium-magnesiumphosphaat in de cultures. Die oxydatie grijpt niet plaats, wanneer de lucht is afgesloten. In de eerste plaats is dus het intreden der alkalische reactie afhankelijk van de meerdere of mindere gemakkelijheid, waarmede de lucht kan toetreden: van het lossen of vasten zitten van den wattenprop, van de dunnere of dikkere laag, waarin de cultuur staat in de kolven en buisjes. Verder zijn wellicht van invloed: de vitaliteit van den bacil en de omstandigheden, die een meerdere of mindere indamping der cultuur kunnen veroorzaken en aldus het zuurgehalte meer of minder kunnen doen stijgen. Al die omstandigheden, welke zich echter onmogelijk geheel laten regelen, dient men voor oogen te houden. Het is aldus duidelijk, dat 0,15% glucose niet de absolute hoeveelheid vertegenwoordigt, welke een bouillon moet bevatten, opdat men daarin door cultuur van een willekeurigen diphtheriebacil den omslag in de alkalische reactie kunne zien ontstaan.

De groei in de bouillons van proef VI kwam overeen met de reeds meermalen beschrevene. Naar gelang de alkalische reactie afnam, kwam de helderheid voor den dag, terwijl de vloeistof met het afnemen van de zure reactie hoe langer hoe meer troebel werd. Deze verandering had geleidelijk plaats. Toch kon men steeds, naargelang men een flink troebele of heldere vloeistof voor zich had, reeds dadelijk uit dit aspect een besluit trekken omtrent de reactie, zonder zich ooit te vergissen; wanneer men namelijk ook den leeftijd der cultuur in aanmerking nam, daar steeds alkalisch blijvende cultures

op den langen duur eveneens bezinken en helder worden. Echter vindt men in de alkalische cultuur steeds een praecipitaat, dat meer vlokkig en kleverig is, dan het fijnkorrelige in een zure.

Den door ZARNIKO c. a. als typisch beschreven groei heb ik dus ook wel waargenomen, maar alleen in cultures, die zuur werden en bleven.

De meening van ESCHERICH, dat ook de reactie van invloed is op het uiterlijk der bouilloncultures, heb ik dus bewaarheid gevonden.

De membraanvorming aan de oppervlakte, zooals TSIKLINSKY die beschrijft, is mij ook dikwijls voorgekomen, meestal in alkalische cultures, maar zonder eenige regelmaat; zoo waren in cultures van denzelfden bacil, in denzelfden bouillon, de membranen nu eens aanwezig, dan weer niet. In het algemeen heb ik den indruk gekregen, dat men ze wel het meest vindt bij zeer weligen groei.

Uit de voorgaande proeven blijkt nu ten duidelijkste, dat men in een bouillon, waarin de bacil geen zuur produceert, de zure reactie der cultures kan te voorschijn roepen door er glucose aan toe te voegen, terwijl de geproduceerde hoeveelheid zuur stijgt evenredig aan het gehalte aan glucose. De zure reactie ontstaat dus door omzetting van glucose in zuur, en dit vermogen heeft de diphtheriebacil gemeen met vele andere bacteriën.

Zooals men zich herinnert, wozen ROUX en YERSIN en ESCHERICH er op, dat de zure reactie ook intreedt in bouillon, die glycerine bevat, terwijl ze alsdan zoo sterk wordt, dat de omslag in de alkalische uitblijft. De proeven, die ik hieromtrent genomen heb, zullen later

vermeld worden; alleen wil ik er hier aan herinneren, dat von SOMMARUGA ook reeds zegt, dat glycerine zich verhoudt als glucose, in zooverre het ook door de bacteriën in zuur wordt omgezet.

Ik trachtte nu eerst gemakkelijk te bereiden, vloeibare voedingsbodems te vinden, die door den bacil niet zuur gemaakt zouden worden, om aldus de vermoedelijk gunstige werking van het alkalisch blijven der reactie op de giftproductie te kunnen bestudeeren en de wisselvalligheid, die voornamelijk bij de productie op groote schaal zoo storend is, zoo mogelijk aan banden te leggen. Een dergelijke, niet zuur wordende voedingsbodem zou mij dan ook kunnen dienen voor verdere proeven omtrent den invloed van glucose en dien van glycerine.

Op de eerste plaats was het dus noodig, dat een zoodanige voedingsbodem geen glucose of glycerine bevatte, en ten tweede, moesten de bacillen er sterk genoeg in groeien, om een voldoende toxiciteit van het filtraat te kunnen verwachten.

#### *Proef VII.*

Het eerst werd beproefd te kweken in een 1% oplossing van pepton Witte in gedestilleerd water, waaraan 1% keukenzout was toegevoegd, en die zwak alkalisch was gemaakt met carb. natrius. Edoch, het was niet mogelijk eenigen merkbaren groei der bacillen in die vloeistof te verkrijgen, zelfs na herhaalde enting.

De samenstelling werd nu gevariëerd tot 2% pepton Witte met  $\frac{1}{2}$ % keukenzout, eveneens met carb. natrius zwak gealkaliseerd. Deze vloeistof vertoonde

den dag na de enting reeds een lichte troebelheid; daarin gelukte dus de groei.

Verder werd gebruik gemaakt van verschillende vleeschextractsoorten, die in den handel voorkomen, vooral om de gemakkelijheid, waarmede men met die stoffen bouillons kan vervaardigen. Het nadeel, dat door zeer vele onderzoekers aan die vleeschextracten wordt toegeschreven, namelijk dat ze resistente sporen bevatten, die slechts door een zeer nauwkeurige sterilisatie op 2 achtereenvolgende dagen te dooden zijn, heb ik nooit ondervonden. De vloeistoffen werden gedurende 1 à 1½ uur in hoeveelheden van hoogstens 200 cm<sup>3</sup> aan stoom van 100° C. blootgesteld, en bleken dan bij controle steeds steriel te zijn.

Het gelukte mij voldoende groei te verkrijgen in voedingsbodems van de volgende samenstelling:

extract. carnis LIEBIG	0,5.
pepton Witte	2,0.
aq. destill.	100,0.

extract carnis KEMMERICH	0,5.
pepton Witte	2,0.
aq. destill.	100,0.

extract. carnis CIBLS	2,0.
pepton Witte	2,0.
aq. destill.	100,0.

Allen zwak gealkaliseerd met carbon. naticus.

Met elk van die vloeistoffen, alsmede met bovengenoemde oplossing van pepton Witte 2% en keukenzout 0,5%, werd nu een kolfje gevuld. Alle kolfjes waren van dezelfde grootte en gelijken vorm, en bevatten

ieder 200 cm<sup>3</sup>. Uit elke kolf werden 3 buisjes gevuld met 10 cm<sup>3</sup>.

Na sterilisatie en contrôle werden 2 buisjes geënt met diphtherie n°. 101 uit een 3 dagen oude, reeds gedurende 2 dagen zuur reageerende, bouilloncultuur (bouillon van proef I). Eén buisje van elk drietal diende voor cultuur van een pseudo-diphtheriebacil. Den eersten dag werd nu meermalen, de volgende 20 dagen dagelijks éénmaal de reactie van de cultuur bepaald. Deze werd steeds alkalisch gevonden. Er was ook geen vermindering van de intensiteit dier reactie te bespeuren; wel trad er later een lichte vermeerdering op.

De groei vertoonde het in proef II en proef IV beschreven uiterlijk. De troebelheid werd in de eerste dagen nog wat sterker en bleef toen stationnair; alleen in de laatste dagen werd de vloeistof wat helderer, terwijl het vlokkig praecipitaat op den bodem toenam.

De vergelijking van den groei in de verschillende voedingsbodems leverde den dag na de enting het volgende resultaat: het sterkst troebel was de bouillon uit LIEBIG, iets minder die uit KEMMERICH, nog iets minder die uit CIBILS. De oplossing van pepton + keukenzout was slechts zeer zwak troebel. Later werd de groei in KEMMERICH iets sterker dan in LIEBIG en CIBILS, maar in alle drie was een vrij sterke troebelheid aanwezig en ontstond een vrij volumineus praecipitaat. De oplossing van pepton + keukenzout werd niet meer dan licht troebel, helderde vrij spoedig op en vertoonde slechts een gering praecipitaat.

Toen na een paar dagen gebleken was, dat de cultures in de buisjes alkalisch bleven, werden ook de verschil-

lende kolven geënt met denzelfden bacil, uit een der buisjes met cultuur in bouillon KEMMERICH. De groei was ook in de kolven vrij krachtig; den volgenden dag waren alle troebel. Hetzelfde verschil als bij de buisjes was ook hier op te merken: in de oplossing pepton + keukenzout groeiden de bacillen niet goed, daarentegen werden de bouillons LIEBIG, KEMMERICH en CIBILS alle flink troebel; later scheen de groei in den bouillon CIBILS iets sterker dan in de andere.

Toen de cultures 19 dagen oud waren, werden ze gefiltreerd en de reactie van alle alkalisch bevonden.

Het was mij aldus gelukt in bovengenoemde vloeistoffen, met uitzondering van de pepton-keukenzout oplossing, voedingsbodems te vinden, die geschikt bleken voor de cultuur van diphthericbacillen, terwijl ze door deze niet zuur gemaakt werden. Evenwel zij opgemerkt, dat de groei in die verschillende vleeschextractvloeistoffen toch altijd iets minder sterk bleek, dan die in den bouillon uit proef I, welke eenige dagen zuur werd, dus glucose scheen te bevatten; enkele buisjes met dien bouillon gevuld waren op denzelfden tijd met denzelfden bacil geënt en ter vergelijking naast de extractbouillons geplaatst. Dit was ook geschied met eenige buisjes, gevuld met den bouillon bij proef II gebezigd, welke alkalisch bleef; de groei in dezen laatste was evenwel altijd iets minder intensief dan in de vleeschextractvloeistoffen.

Door vele onderzoekers is er dan ook reeds voor verschillende bacteriën op gewezen, dat ze weliger groeien in suikerhoudenden bouillon, dan in bouillon zonder toevoeging van glucose vervaardigd. Hoewel

ESCHERICH <sup>1)</sup> dit ontkent, schijnt het dus ook voor den diphtheriebacillus te gelden.

Zooals men zich herinnert, had GUINOCHET <sup>2)</sup> ook in cultures van den diphtheriebacil in eiwitvrije urine productie van zuur waargenomen. Het was na de verkregen resultaten geoorloofd te denken, dat de 4 personen, waarvan GUINOCHET de urines gebruikte, allen diabetici waren of een z. g. glycosurie alimentaire vertoonden. De herhaling zijner proeven schcen dus wenschelijk.

### **Reactieverandering van cultures in urine.**

#### *Proef VIII.*

De urine van een normaal persoon werd met de meest bekende reacties nauwkeurig onderzocht op eiwit (kookproef, proef van HELLER, van HEINSIUS, proef met salpeterzuur en ferrocyaankali) en op glucose (proeven van MOORE, TROMMER, WORM-MÜLLER en NYLANDER), maar gaf met geen enkel reagens een positief resultaat. Deze urine werd licht alkalisch gemaakt met een verzadigde oplossing van carbon. natricus; de daardoor gepraecipiteerde phosphaten werden door filtratie door gewoon filtreerpapier verwijderd. Daarna werden reageerbuisjes, met de urine gevuld, gedurende 1 uur in stoom van 100° C. gesteriliseerd en toen ze, na 24 uur ter contrôle in de broedstoof gestaan te hebben, steriel gebleken waren, geënt met diphtheriebacil n°. 102 uit

<sup>1)</sup> ESCHERICH, l. c.

<sup>2)</sup> GUINOCHET, l. c.

stamcultuur. Den volgenden dag was het nog quaestieus of de cultuur was opgekomen, den 3<sup>den</sup> dag echter was de urine licht troebel en had zich een gering praecipitaat op den bodem verzameld; de troebelheid nam in den loop van de volgende dagen niet toe, wel het praecipitaat.

Gedurende 55 dagen voortgezet, werd bij die proef de reactie steeds alkalisch gevonden. In de eerste dagen was ook geen vermindering van hare oorspronkelijke intensiteit te bespeuren; na eenige weken was ze integendeel duidelijk sterker geworden.

De proef werd nu herhaald met de urines van 3 verschillende, normale personen, welke urines eveneens, volgens de aangegeven reacties, vrij van eiwit en suiker bleken te zijn. Van elke urine werden 2 buisjes gevuld, die na sterilisatie en contrôle geënt werden met 3 verschillende bacillen, namelijk n<sup>o</sup>. 100, 101 en 102. Allen kwamen op, behalve één van de met bacil n<sup>o</sup>. 100 geënte buisjes. In allen bleef de reactie weer alkalisch gedurende de 40 dagen, die de proef duurde.

Dit resultaat bevestigde dus onze meening omtrent den invloed der glucose. Het moest dan ook mogelijk zijn de zure reactie te voorschijn te roepen door bij een van de bovenstaande urines glucose te voegen, of wel door de bacillen te cultiveeren in de urine van een diabetes-lijder. Dat werd gedaan in:

#### *Proef IX.*

In een der bovengenoemde urines werd na alkalisatie en filtratie 0,15 % glucose opgelost; 4 buisjes werden er mede gevuld. Na sterilisatie en contrôle werden

2 buisjes geënt met diphtheriebacil n°. 100, de 2 andere met diphtheriebacil n°. 101.

Voorts waren 3 buisjes gevuld met de urine van een diabetes-lijder, welke alle reacties op suiker zeer duidelijk vertoonde, terwijl alle reacties op eiwit negatief uitvielen. Na alkalisatie, sterilisatie en contrôle werden deze buisjes geënt met diphtheriebacil n°. 102.

Gedurende de eerste dagen was het quaestieus of de bacil n°. 100 opgekomen was, en ook later bleef zijn groei altijd slechts zeer zwak. De andere bacillen n°. 101 en n°. 102 kwamen beiden flink op, zelfs scheen hun groei in suikerhoudende urine krachtiger dan in suikervrije.

De bepaling der reactie gedurende 40 dagen gaf het volgende resultaat:

In de urine met 0,15 % glucose, geënt met bacil n°. 100, bleef de reactie steeds alkalisch, werd echter van den 10<sup>den</sup> tot ongeveer den 20<sup>sten</sup> dag iets minder sterk.

In de urine met 0,15 % glucose, geënt met bacil n°. 101, werd de reactie den volgenden dag minder sterk alkalisch, den 3<sup>den</sup> dag amphoteer, den 4<sup>den</sup> dag licht zuur, den 5<sup>den</sup> dag weer amphoteer en bleef nu de volgende 7 dagen amphoteer, nu eens meer naar den alkalischen, dan weer meer naar den zuren kant overhellende. Na dien tijd werd ze constant weer licht alkalisch.

In de diabetesurine, geënt met bacil n°. 102, was de reactie den 3<sup>den</sup> en 4<sup>den</sup> dag lichter alkalisch, werd verder zeer licht alkalisch, toen amphoteer, en was na 9 dagen licht zuur. Gedurende 4 dagen bleef ze duidelijk licht

zuur, werd toen 8 dagen lang amphoteer, en vervolgens zeer licht en toen licht alkalisch, welke laatste reactie ze bleef behouden.

Door den slechten groei van bacil n°. 100 werd er blijkbaar niet genoeg zuur gevormd, om de oorspronkelijke, alkalische reactie te neutraliseeren. Deze was echter wel gedurende eenige dagen verminderd, zooals men gezien heeft.

Het laat intreden der zure reactie, haar lange duur en geringe intensiteit worden verklaard door den altijd zwakken groei der bacillen in urine, in vergelijking met dien in bouillon.

Dit laatste resultaat leverde dus de proef op de som en is een duidelijk bewijs voor de meening, dat de zure reactie door de omzetting van glucose wordt veroorzaakt; tevens dwingt het ons, om aan te nemen, dat de urines van GUINOCHEE een dergelijke stof, zeer waarschijnlijk glucose, bevatten.

### **Reactieverandering van glycerinehoudende bouillons.**

Boven is er reeds op gewezen dat volgens ROUX en YERSIN en volgens ESCHERICH, de intensiteit der zure reactie in dergelijke voedingsbodems eene zoo sterke wordt, dat de bacillen afsterven en de omslag in de alkalische reactie uitblijft.

Eveneens heb ik reeds vermeld, dat VON SOMMARUGA <sup>1)</sup> als zijne meening mededeelde, dat glycerine, evenals

<sup>1)</sup> VON SOMMARUGA l. c.

glucose, door verschillende bacteriën in zuur wordt omgezet. In eene later van zijne hand verschenen, speciaal daarop gerichte onderzoeking, <sup>1)</sup> nam hij proeven omtrent de omzetting van glycerine door verschillende bacteriën (echter niet door bacillus diphtheriae) in eenige voedingsbodems, namel. bouillon, gelatine, agar, allen met 5 % glycerine. Van de 19 species, die hij onderzocht, produceerden er 16 uit de glycerine zooveel zuur, dat de cultures een duidelijke, soms een sterk zure reactie vertoonden. Omtrent den tijd, waarop de zure reactie intrad, geeft hij niets aan. Hij bepaalde alleen quantitatief het zuurgehalte der cultures, toen ze 35 dagen oud waren en vond dit laatste bij dezelfde bacteriën veel sterker dan ПЕТРУШКЪ in zijn lakmoesmelk. Hij gebruikte voor zijn onderzoek gewone zuivere glycerine uit den handel, en ook chemisch zuiver glycerinum cristallisatum, doch verkreeg daarbij geen verschil in resultaat.

Ik bezat nu in de bouillons, vervaardigd uit vleeschextract, geschikte voedingsmedia, om de omzetting van glycerine door den diphtheriebacil na te gaan. Daar die vlocistoffen niet zuur werden, dus geen suiker of andere dergelijke stoffen bevatten, kon men, wanneer daarin de reactieverandering intrad, deze geheel aan de aanwezigheid van glycerine toeschrijven.

---

<sup>1)</sup> VON SOMMARUGA. Ueber Stoffwechselproducte von Mikroorganismen. II Mittheil. Zeitschr. f. Hygiene u. Infectiouskrankh. Bd. XV. 1893, p. 291.

*Proef X.*

Twee buisjes werden gevuld met een bouillon, bereid uit Liebig's vleeschextract volgens het in proef VII gegeven voorschrift, waaraan 4 % glycerine was toegevoegd.

Na gewone sterilisatie en contrôle werden ze geënt met bacil n°. 102 uit stamcultuur. De groei was in de eerste 3 dagen een zeer geringe, den 4<sup>den</sup> dag echter werd de cultuur flink troebel en vormde zich een membraan aan de oppervlakte; de troebelheid nam later nog iets toe en er verzamelde zich een sterk praecipitaat op den bodem. Na eenigen tijd echter verdween de membraan en helderde de vloeistof op.

De reactie werd den 3<sup>den</sup> dag lichter, en de volgende dagen zeer licht alkalisch; den 11<sup>den</sup> dag na de enting was ze op eens licht zuur (de cultuur bleek zuiver). De intensiteit nam in de eerste dagen nog iets toe en later weer iets af, maar bleef in het vervolg steeds zwak zuur, hoewel de proef 59 dagen duurde.

Na verloop van dien tijd kwam bij uitzaaiing niets meer op, zoodat de proef gestaakt werd.

Verder werden een paar buisjes gevuld met bouillon uit Cibils-vleeschextract, eveneens met 4 % glycerine, en geënt met bacil n°. 100 uit stamcultuur. Deze cultures vertoonden na 7 dagen een zure reactie en behielden die ook gedurende de 46 dagen, welke de proef duurde. De groei kwam overeen met dien in Liebig-bouillon.

Daar ik bij deze proeven glycerine gebruikt had, welke bij nader onderzoek niet aan de eischen der

Pharmacopoe Ed. III bleek te voldoen, in zooverre zij bij verbranding een duidelijk résidu achterliet, en het dus mogelijk was, dat deze verontreiniging van invloed geweest zoude zijn, verschafte ik mij glycerine, die wel aan die eischen voldeed.

Aan een paar buisjes en een fleschje, gevuld met Cibils-bouillon, voegde ik 4 %<sub>0</sub> der onzuivere, aan een ander paar buisjes en een fleschje, gevuld met denzelfden bouillon, 4 %<sub>0</sub> der zuivere glycerine toe. Allen werden nu geënt met bacil n<sup>o</sup>. 101. Den 6<sup>den</sup> dag reageerden allen amfoteer, den 7<sup>den</sup> dag duidelijk zuur en bleven dit gedurende de 30 dagen, dat ze geobserveerd werden. Evenals von SOMMARUGA vond ik dus ook, dat een lichte verontreiniging der glycerine niet van invloed is.

Uit het resultaat dezer proeven blijkt ten duidelijkste, dat ook de diphtheriebacil in staat is uit glycerine zuur te produceeren. Het laat intreden der zure reactie in de glycerine-bouillons is waarschijnlijk gedeeltelijk te wijten aan den geringen groei in de eerste dagen, hetgeen ik constant bij deze cultures heb opgemerkt. Ik heb echter niet den indruk gekregen, dat dit de eenige oorzaak zoude zijn. Na een dag of vier was er toch reeds een flinke groei, terwijl de reactieverandering nog maar steeds niet te voorschijn kwam.

Veeleer scheen het, alsof de glycerine niet als zoodanig door den bacil direct in zuur kon worden omgezet, maar dat er eerst onder invloed der bacteriën een andere stof, misschien een suiker, uit gevormd moest worden, uit welke stof dan het zuur ontstond. Deze hypothese vindt eenigen, zij het ook zwakken, steun in het door de beroemde onderzoekingen van den chemicus FISCHER

bekend geworden feit, dat het mogelijk is alle suikers synthetisch te vervaardigen uitgaande van glycerine. Het vermogen nu der bacterien, om synthetisch werkzaam te zijn staat buiten kijf. VON SOMMARUGA waagt het ook niet zich direct uit te spreken over de natuur van het gevormde zuur, hij wijst er alleen op, dat vele der door hem onderzochte bacteriën in rosolzuurhoudende voedingsbodems een duidelijk vermogen om te reduceeren vertoonen, en men dus zou kunnen denken, dat het zuur ontstond door reductie van de glycerine.

Het niet meer optreden der alkalische reactie is hier, evenals in proef V, wel te wijten aan de groote hoeveelheid geproduceerd zuur. Door het gehalte aan glycerine te verminderen is het waarschijnlijk ook mogelijk slechts een voorbijgaande zure reactie te verkrijgen. Intusschen hebben de proeven, die ik daaromtrent nam met 1  $\frac{1}{4}$  en 0,5 % glycerine, een negatief resultaat opgeleverd.

### **Reactieverandering in cultures onder afsluiting der zuurstof.**

Roux en YERSIN en ook ESCHERICH deelen mede, dat de aciditeit eveneens intreedt in cultures onder afsluiting van de lucht en dat ze dan niet meer plaats maakt voor een alkalische reactie.

Dat deze reactieverandering nu ook door de omzetting van glucose veroorzaakt wordt en in hoeverre de vrije toevoer van lucht op het weder intreden der alcaliteit van invloed is, trachtte ik op de volgende wijze uit te maken:

#### *Proef XI.*

Drie medicijnfleschjes van dezelfde groote en gelijken

vorm werden hoog gevuld met een gelijke hoeveelheid van de volgende bouillonsoorten: 1°. kalfsvleeschbouillon van proef 1, waarin de zure reactie bij groei aan de lucht slechts korten tijd bleef bestaan; 2°. bouillon uit Liebig's vleeschextract, volgens het gegeven voorschrift vervaardigd; 3°. dezelfde bouillon uit Liebig, waaraan toegevoegd 0,2 % glucose.

Deze drie fleschjes werden geënt met bacil n°. 101 uit een twee dagen oude, zuur reageerende bouilloncultuur en geplaatst onder een klok van BUCHNER, die met paraffine en vaseline hermetisch afgesloten was en waarin de zuurstof geabsorbeerd werd door acidum pyrogallicum.

Drie geheel overeenkomstige fleschjes, met dezelfde vloeistoffen hoog gevuld, werden evenzoo geënt en in dezelfde broedstoof geplaatst, maar buiten de klok, zoodat de lucht vrijen toegang had tot de cultuur.

Om nu verder nog na te gaan, of een ruime toetreding van zuurstof van invloed kon zijn tegenover de betrekkelijk geringe in de hoog gevulde fleschjes, werden nog drie cultures aangelegd in groote kolven, wier bodem slechts even bedekt was met een der bovengenoemde vloeistoffen. Ook deze werden vrij in dezelfde broedstoof geplaatst. De wattenproppen waren op alle fleschjes en kolven zoo los mogelijk gezet.

Eindelijk werden nog in een tweede klok van BUCHNER geplaatst een paar buisjes met een kalfsvleeschbouillon, die bij groei aan de lucht geen zure reactie aannam (uit proef II) en verder buisjes met denzelfden bouillon, waaraan resp. 0,2 %, 0,4 %, 0,8 % en 1 % glucose was toegevoegd. Ze werden geënt als de vorige.

Deze buisjes konden nu dienen, om de omzetting van suiker bij anaërobie nader te bestudeeren en tevens ter contrôle van het in de eerste klok te verkrijgen resultaat.

De fleschjes en kolven, zoowel in als buiten de klok, moesten bijna allen eenige malen op nieuw geënt worden. Zij begonnen eerst troebel te worden, nadat men met een pipet uit de vermelde bouilloncultuur, waarmede alle werden geënt, een vrij groote hoeveelheid cultuur in elk fleschje en kolfje had gebracht. De proef duurde 20 dagen en leverde het volgende resultaat:

In de klok: De kalfsvleeschbouillon uit proef I reageerde den 3<sup>den</sup> dag na de gelukte enting zuur en bleef die reactie behouden.

De bouillon uit Liebig bleef steeds alkalisch reageeren.

De bouillon uit Liebig met 0,2 % glucose reageerde den 2<sup>den</sup> dag na de enting zuur en bleef aldus.

Van de buisjes in de klok bleven die met kalfsvleeschbouillon uit proef II steeds alkalisch. Die met denzelfden bouillon, plus 0,2 % 0,4 % 0,8 % en 1 % glucose, waren den volgenden dag allen zuur en bleven dit.

Buiten de klok: Men kon geen duidelijk onderscheid constateeren in tijd van optreden of intensiteit der reactie in fleschjes en kolven. De bouillon uit proef I reageerde den volgenden dag zuur, bleef dit 3 dagen en werd toen weer alkalisch. De bouillon uit Liebig bleef steeds alkalisch. De bouillon uit Liebig met 0,2 % glucose was den volgenden dag zuur en bleef aldus.

De groei van alle cultures in de klokken was veel minder sterk, dan in de daarbuiten staande. Zoowel in als buiten de klokken, vertoonde hij echter het

reeds meermalen beschreven, van de reactie afhankelijk uiterlijk.

Deze proeven bevestigen dus het door Roux en YERSIN en ESCHERICH medegedeelde, dat de zure reactie ook bij anaërobiose voorkomt en dat voor het weder intreden der alcaliciteit de vrije toetreding van zuurstof noodzakelijk is; terwijl zij tevens aantoonen, dat ook bij anaërobiose het zuur gevormd wordt door omzetting van glucose.

De bepaling der reactie onder de klokken geschiedde slechts enkele malen en zoo snel mogelijk, terwijl telkenmale een nieuwe hoeveelheid versch *acidum pyrogallicum* toegevoegd werd en de klok nauwkeurig met vaseline en paraffine werd afgesloten.

Daar het voor het onderzoek der toxiciteit van cultures bij zuurstofafsluiting niet wenschelijk was, ze te openen vóór de filtratie, volgde ik hierbij een andere methode, die meer waarborgen gaf dat de anaërobiose een absolute was, namelijk de cultuur onder waterstof:

#### *Proef XII.*

Drie fleschjes van denzelfden vorm en gelijke grootte werden gevuld met een gelijke hoeveelheid bouillon uit Liebig (als vroeger) bereid. Twee er van waren voorzien van een dubbel doorboorde caoutchouc-stop, waardoor een glazen aan- en afvoerbuis staken, om waterstofgas door de vloeistof te leiden. Het derde fleschje was met een gewonen wattenprop gesloten en diende ter contrôle.

Allen werden geënt met diphtheriebacil n<sup>o</sup>. 101 uit stamcultuur.

Wanneer men de cultuurvloeistof direct na de enting onder waterstof bracht, was te voorzien, dat er geen voldoende groei zou plaats hebben, om een merkbare toxiciteit te verkrijgen. Daarom werd het eene fleschje onder H gezet, nadat de cultuur 24 uren oud en flink troebel was geworden, terwijl met het andere gewacht werd, tot  $3 \times 24$  uren na de enting waren verstreken. Minstens een half uur lang werd waterstofgas doorgevoerd en de af- en toevoerbuis niet eerder dichtgesmolten, dan nadat men aan de fijn uitgetrokken afvoerbuis het gas zonder knal kon ontsteken en dit laatste dan rustig voortbrandde. Aldus was men zeker dat alle zuurstof verdreven was.

Het gas werd bereid uit zuiver zink en zuiver zoutzuur, en bovendien nog geleid door oplossingen van acidum pyrogallicum, permanganas kalicus en nitras argenticus.

De groei onder H bleef sterk achter bij dien in het fleschje aan de lucht; de cultures werden slechts weinig troebel en klaarden weldra geheel op. Toen ze na 19 dagen werden gefiltreerd, reageerden beide cultures onder H amphoteer. Bij uitzaaiing bleken de bacteriën afgestorven te zijn. De cultuur aan de lucht reageerde alkalisch en gaf bij uitzaaiing op glycerineagar nog vrij veel diphtheriecolonies.

Die amphotere reactie in bouillon uit Liebig kan men verklaren door aan te nemen, dat er in dezen bouillon toch ook nog zuur gevormd wordt, maar zoo weinig, dat het in cultures aan de lucht geheel wordt gecompenseerd door de alkalivorming, terwijl het zuur voor den dag komt, wanneer die alkalivorming wegvalt, zooals bij anaërobiose. In dit geval was dus de zuur-

vorming juist sterk genoeg, om de oorspronkelijke, alkalische reactie ongeveer te neutraliseren.

### **Proeven met bouillons uit versch en oud vleesch.**

Zooals men zich uit de aangehaalde onderzoekingen van PÉRÉ herinnert, gelukte het dezen uit oud rundvleesch bouillons te maken, die door cultuur van bacillus typhi abdom. en bact. coli comm. niet zuur werden, terwijl bouillons volgens hetzelfde procédé gemaakt uit hetzelfde vleesch, maar in verschen toestand, wel degelijk een zure reactie gingen vertoonen. Hij schreef dit onderscheid toe aan het voorhanden zijn van glucose in versch vleesch, welke stof in het oude vleesch was omgezet.

In verband met de verkregen resultaten was het dus zeer interessant ook het gedrag van bacillus diphtheriae onder dergelijke omstandigheden na te gaan.

#### *Proef XIII.*

Men nam 250 grm. rundvleesch (fijn gehakte biefstuk) van een daags te voren geslachte koe. Dit vleesch was bij lage temperatuur bewaard en dus nog zeer versch.

125 grm. er van werd direct bij gewone kamertemperatuur gedurende één nacht te trekken gezet op 250 grm. water. Den volgenden morgen werd het vleesch door een doek gecoleerd, uitgeperst en bij de aldus verkregen vloeistof gevoegd: 2% pepton Witte en 0,5% keukenzout. Daarna werd opgekookt, gefiltreerd en zwak alkalisch gemaakt met carbon. natric., vervolgens weer opgekookt, gefiltreerd en toen de vloeistof daarna bij vernieuwde verhitting niet meer troebel werd, in stoom gesteriliseerd. Aldus verkreeg men: *bouillon uit versch vleesch.*

De andere 125 grm. bleef 's nachts bij gewone kamertemperatuur staan. Den volgenden morgen werd het vleesch met een weinig water bevochtigd om uitdrogen tegen te gaan en geplaatst bij ongeveer 20°. Aldus bleef het staan tot den volgenden dag 4 uur n. m. Toen werd het één nacht bij gewone kamertemperatuur op 250 grm. water gezet en den volgenden morgen, op dezelfde wijze als voren, daaruit bereid de *bouillon uit oud vleesch*. Dit laatste was dus 48 uren ouder dan het andere.

Met elke bouillonsoort werden gevuld 3 buisjes en 1 kolffje, en allen geënt met bacil n°. 102 uit stamcultuur. De buisjes dienden voor de bepaling der reactie.

De groei in den bouillon uit versch vleesch was in de eerste 2 dagen slechts zwak, maar werd toen spoedig vrij krachtig.

De bouillon uit oud vleesch was van het begin af aan flink troebel.

De reactie van den bouillon uit versch vleesch was den 3<sup>den</sup> dag lichter alkalisch, den 4<sup>den</sup> dag zeer zwak alkalisch, den 5<sup>den</sup> dag licht zuur, den 6<sup>den</sup> dag zeer duidelijk zuur en bleef dit gedurende 10 dagen. De 4 volgende dagen werd de reactie aldus opgeteekend: licht zuur, zeer licht zuur, zeer licht alkalisch, licht alkalisch. Een 14 dagen ongeveer duurde die zwakke alkaliteit. Toen werd de cultuur flink alkalisch en als zoodanig nog een paar weken geobserveerd. De proef duurde 50 dagen.

De intensiteit der alkalische reactie in den bouillon uit oud vleesch werd in de eerste dagen niet minder, integendeel na verloop van 12 dagen ongeveer was ze reeds duidelijk toegenomen en bleef nu vrij sterk alkalisch gedurende de geheele proef, namelijk 43 dagen.

Het door PÉRÉ, bij cultuur van bac. typhi abdom. en bac. coli comm., verkregen resultaat bleek dus ook te gelden voor den diphtheriebacil en we konden hierin een bewijs te meer zien voor den invloed van de glucose op het ontstaan der aciditeit.

Uit de resultaten der voorgaande proeven was dus met zekerheid vastgesteld, dat de zure reactie van diphtherie-bouilloncultures afhankelijk is van de aanwezigheid van glucose of glycerine of beide.

Door een eigenschap, die de diphtheriebacil met vele andere bacteriën gemeen heeft, is hij in staat genoemde stoffen in zuur om te zetten. Naar analogie met vele van die andere bacteriën, die door SCHARDINGER, NENCKI, REKOWSKI, BISCHLER, BLACHSTEIN, PERDRIX, BOUTROUX, PÉRÉ e. a. onderzocht zijn, is het nu hoogst waarschijnlijk, dat hij, behalve uit glucose, ook uit de verdere suikers zuur kan vormen. Ik achtte het echter niet noodzakelijk het onderzoek van den bacil in die richting voort te zetten, daar men toch bij de bereiding van voedingsbodems gewoonlijk alleen met glucose en met glycerine te doen heeft.

De door PÉRÉ aangegeven methode om het vleesch oud te laten worden bleek, volgens de laatste proef, geschikt om een bouillon te verkrijgen, die niet zuur wordt en waarin de bacil uitstekend groeit. De uitkomsten van proef VII hadden ons wel reeds geleerd steeds alkalisch blijvende bouillons te vervaardigen uit verschillende vleeschextracten, maar de groei van de meeste exemplaren van diphtheriebacillen in laatstgenoemde, hoewel vrij krachtig, was toch altijd minder intensief, dan in bouillons uit rundvleesch of kalfsvleesch,

vooral wanneer in deze laatste bouillons een weinig glucose was.

In het algemeen heb ik bemerkt, dat de beste groei te verkrijgen is in kalfs- of rundvleeschbouillons met zooveel glucose, dat de reactie slechts enkele dagen zuur bleef; na weder intreden der alkaliteit werd dan de groei weldra zoo sterk, dat hij dien in even oude cultures, die geen reactieverandering vertoond hadden, overtrof. Het glucose is dus op zichzelf voordeelig voor den groei, maar nadeelig door het daaruit gevormde zuur, hetwelk tevens volgens Roux en YERSIN een slechten invloed heeft op de gifproductie. Men moest dus trachten het gevormde zuur weg te nemen niet door eliminatie der oorzaak: het glucose, maar op een andere manier.

#### **Proeven over het alkalisch houden van cultures in willekeurige bouillons.**

In den loop der beschreven proeven was reeds meermalen de vraag gerezen, of het mogelijk zoude zijn de zure reactie te voorkomen door te zorgen voor een voldoende hoeveelheid alkali in de cultuur, om het zuur te neutraliseeren. Men zoude daartoe den bouillon een sterkere, oorspronkelijke alkalische reactie kunnen geven, voor dat men de bacteriën er in entte. Nu is het echter een bekend feit, dat een hoog alkaligehalte, evengoed als een hoog zuurgehalte, voor de bacteriën schadelijk is. De grenzen, binnen welke verschillende parthogene microben zich nog ontwikkelen, heeft BOER <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> BOER. Ueber die Leistungsfähigkeit mehrerer chemischer Desinfectionsmittel bei einigen für den Menschen pathogenen Bacteriën. Zeitschr. f. Hygiene u. Infectiouskrankh. Bd. IX. 1890.

vastgesteld volgens een door BEHRING gegeven methode. Zoo vond hij, dat de diphtheriebacil gedood werd bij een gehalte van 0,06 % normaalzoutzuur indien versche, en van 0,15 % als 24 uur oude bloedserumcultures werden gebezigd, bij een inwerking gedurende 2 uren. Dat gehalte komt overeen met 17 resp. 42 cm<sup>3</sup> normaalzuur pro liter bouillon. Van zwavelzuur heeft men iets grootere hoeveelheden nodig. De uiterste grens naar de alkalische zijde bedroeg: 0,3 % resp. 0,35 % normaalnatronloog of 75 resp. 88 cm<sup>3</sup> pro liter.

De diphtheriebacil verhiel zich in dit opzicht ongeveer als de miltvuurbacil, terwijl b. v. de typhusbacil veel grootere hoeveelheden zuur, de choleraspiril zeer veel grootere hoeveelheden alkali kon verdragen.

Men is dus aan zekere grenzen gebonden. Naarmate het oorspronkelijke alkaligehalte meer stijgt boven het juist voordeelige voor de ontwikkeling, zal deze laatste ook minder worden en aldus een voor de gifproductie nadeeligen factor doen ontstaan.

Om nu na te gaan, in hoeverre het mogelijk was in een bepaalden bouillon de zure reactie te doen uitblijven zonder te veel schade aan den groei toe te brengen, nam ik volgende proef:

#### *Proef XIV.*

11 gelijke buisjes werden gevuld met 10 cm<sup>3</sup> van den bouillon uit proef I, die dus even zuur werd.

Uit een buret droppelde men nu een verzadigde oplossing van carbon. natric. in die buisjes, zoodat aan buisje n<sup>o</sup>. 0 niets, n<sup>o</sup>. 1 één druppel, n<sup>o</sup>. 2 twee

droppels, enz. tot aan buisje n°. 10 tien droppels alkali werden toegevoegd. 10 droppels vormden juist  $\frac{2}{10}$  cm<sup>3</sup>.

Allen werden geënt met diphtheriebacil n°. 101 uit een 3 dagen oude Liebig-bouilloncultuur. Al de cultures waren den volgenden dag opgekomen, maar in verschillende mate: buisje n°. 0 het sterkst en zoo afnemend tot buisje n°. 10. De groei in n°. 8 tot en met n°. 10 was al heel zwak. Na 8 dagen ongeveer waren de buisjes n°. 0 tot en met n°. 7 allen bijna even troebel, tusschen de twee uitersten was alleen een gering verschil merkbaar. N°. 8 tot en met n°. 10 vertoonden nog slechts zeer weinig groei.

Het buisje n°. 0 was den dag na de enting zuur, bleef dit 3 dagen lang en werd toen weer alkalisch. Buisje n°. 1 vertoonde den volgenden dag amphotere reactie, en bleef deze 3 dagen behouden. Vervolgens werd het licht alkalisch en eindelijk alkalisch. In buisje n°. 2 was, gedurende dezelfde drie dagen, de intensiteit der alkalische reactie verminderd. Alle volgende vertoonden geen afname der alcaliciteit.

Had men dus bij dien bouillon uit proef I, per 10 cm<sup>3</sup> slechts 1 druppel carbon. natrie-oplossing meer toegevoegd, dan ware de reactie slechts amphoteer geworden, 2 droppels of  $\frac{1}{25}$  cm<sup>3</sup> meer op de 10 cm<sup>3</sup> bouillon = 4 cm<sup>3</sup> pro liter, hadden veroorzaakt, dat de zure reactie heelemaal niet te voorschijn ware gekomen. De groei in den bouillon zou dan toch nog een voldoende geweest zijn; immers, die in buisje n°. 2 vertoonde na enkele dagen geen merkbaar onderscheid meer met dien in buisje n°. 0.

Het is evenwel duidelijk, dat deze methode alleen toepasselijk zoude zijn op bouillons, die zoo kort zuur

werden (dus zoo weinig suiker bevatten), als de onderzochte; bij bouillons met een hoog gehalte aan glucose, zou men de vloeistof zoo sterk alkalisch moeten maken, dat de groei er min of meer onmogelijk in werd. Echter ook in het eerste geval zou men altijd een dergelijk onderzoek, als het beschrevene, aan de alkalisering van den bouillon moeten laten voorafgaan, om de juiste hoeveelheid vereischt alkali te leeren kennen. Dit is een groot practisch bezwaar en bovendien kan men zich voorstellen <sup>1)</sup>, dat, al is de groei ook voldoende, de giftigheid toch benadeeld wordt door het verhoogde alkaligehalte.

Prof. SPRONCK vestigde daarom mijn aandacht op een andere methode. Bij zijn technische onderzoekingen over gisting bediende BELJERINCK <sup>2)</sup> zich van suikerhoudende, dus voor gisting vatbare voedingsbodems, waaraan hij een neutraal, onoplosbaar en voor de bacterien dus onschadelijk koolzuur zout toevoegde; hij nam daarvoor o. a. carbonas calcicus. Werd nu zuur geproduceerd, dan werd dit door het zout als het ware in statu nascenti vastgelegd en moest het op deze manier gelukken den voedingsbodem alkalisch te houden.

BRIEGER <sup>3)</sup> wijst in een onlangs verschenen onderzoek op de schadelijke werking, die de, in eiwithoudende voedingsbodems altijd plaats grijpende, vorming van basische producten heeft op het gif, daar het bekend is,

<sup>1)</sup> (Volgens BRIEGER, zooals men later zal zien).

<sup>2)</sup> BELJERINCK. Verfahren zum Nachweise der Säureabsonderung bei Mikrobien. Centralblatt. f. Bacteriol. u. Parasitenk. Bd. IX. N<sup>o</sup>. 24.

<sup>3)</sup> BRIEGER. Weitere Erfahrungen über Bakteriengifte. Zeitschr. f. Hygiene u. Infectionskrankh. Bd. XIX. 1895. H. I.

dat met toename der alkalische reactie de zoo labiele toxalbuminen der bacteriën meer en meer vernietigd worden. Hij bepaalde de hoeveelheid van deze geproduceerde bases in tetanusbouillon, waarmede hij zich speciëel bezig hield, en vond dat 1 L. tetanusbouillon in 7 dagen zooveel bases gevormd had, dat 17—38 cm<sup>3</sup> normaal loog noodig waren om ze te neutraliseeren.

Dezen schadelijken invloed der basische producten, onder welke het koolzure ammoniak wel een eerste plaats bekleedt, trachtte hij nu op te heffen door aan 1 L. van den voedingsbodem ongeveer 20 grm. gips toe te voegen; aldus grijpt er, volgens hem, van het eerste oogenblik af aan een constante omzetting plaats van het versch ontstane, schadelijke ammoniumcarbonaat in het onschuldige ammoniumsulfaat. Het gelukte hem zoo werkelijk zeer giftige tetanuscultures te verkrijgen. Ammoniumsulfaat praecipiteert het tetanusgif, maar alleen door meeslepen met de gepraccipiteerde albumosen uit de cultuur en zooals BRIEGER en COHN <sup>1)</sup> aangetoond hebben wordt het tetanusgift gevormd ten koste der albumosen, zoodat, wanneer men een zeer giftige cultuur heeft, de albumosen daaruit grootendeels of geheel verdwenen zijn en dus ook het ammoniumsulfaat in een dergelijke cultuur het gif niet meer neerslaat.

Volgens BRIEGER is de diphtheriebacil niet in staat de albumosen in zijn cultuur geheel om te zetten en het diphtheriegif wordt ook door middel van deze stoffen door het ammoniumsulfaat gepraccipiteerd, zoodat men

---

<sup>1)</sup> BRIEGER und COHN. Untersuchungen ueber das Tetanusgift Zeitschr. f. Hygiene u. Infectionskrankh. Bd. XV. 1893. S. 1.

door neerslaan met dit zout uit diphtheriecultures een veel grootere hoeveelheid gif kan verkrijgen, dan uit tetanuscultures.

Wilde men nu ook in diphtheriecultures, op de manier van BRIEGER, de volgens hem zoo schadelijke bases in het onschuldige ammoniumsulfaat omzetten, dan had men misschien te vreezen, dat er veel gif neergeslagen werd en men dus een zwak toxisch filtraat zou verkrijgen. In hoeverre deze vrees bewaarheid werd zal later blijken.

Ik beproefde nu een bouillon, waarin de bacillen goed groeiden, alkalisch te houden door bijvoeging van carbonas calcicus en tevens den schadelijken invloed der gevormde bases te neutraliseeren door gips. Daartoe werd de volgende proef ingericht:

*Proef XV.*

4 medicijnfleschjes van 200 grm. inhoud werden gevuld met een bouillon, op de gewone manier bereid, uit versch kalfsvleesch.

Carbonas calcicus en sulfas calcicus, beide chemisch zuiver, werden op de volgende wijze aan enkele fleschjes toegevoegd.

N<sup>o</sup>. 1 150 grm. kalfsvleeschbouillon.

N<sup>o</sup>. 2 150 grm. kalfsvleeschbouillon met 3 grm. carb. calc.

N<sup>o</sup>. 3 150 grm. kalfsvleeschbouillon met 2 grm. sulf. calc.

N<sup>o</sup>. 4 150 grm. kalfsvleeschbouillon met 3 grm. carb. calc. en 2 grm. sulf. calc.

Een flesch n<sup>o</sup>. 5 van eenigszins anderen vorm was ingericht als in proef XII om onder H. gezet te worden. Ze werd gevuld met 200 grm. van denzelfden kalfvleeschbouillon, waaraan toegevoegd: 4 grm. carb. calc.

Door deze inrichting der proef kon men verwachten een antwoord te krijgen op de vraag, welke invloed het voordeeligste is voor de gifproductie, die van het carb. calc., als houdende het medium alkalisch, die van het sulf. calc., als vernietigende de schadelijke bases, of die van beiden te samen. Eindelijk zou men ook nog de gifproductie onder anaërobiose in een alkalische cultuur kunnen nagaan. Daar bij afsluiting der lucht geen alkali in de cultuur werd gevormd (volgens proef XI en XII) was het ook niet noodig er sulf. calc. bij te voegen.

De voor dit doel bereide kalfsvleeschbouillon werd, zooals gezegd is, uit versch vleesch vervaardigd en zou dus wel, volgens proef XIII, een zure reactie gaan vertoonen. Om dit te onderzoeken werd eerst een buisje er mede gevuld en geënt met bacil n<sup>o</sup>. 101. De cultuur kwam goed op en was den volgenden dag reeds zuur. Bijna dagelijks werd nu een maand lang de reactie opgenomen, maar ze bleef steeds zuur. Na verloop van dien tijd kwam bij uitzaaiing niets meer op, zoodat men de proef afbrak. Er scheen dus veel glucose in dit versche vleesch aanwezig te zijn en de bouillon was wel geschikt, om den invloed van het carb. calc. te vertoonen.

Ter contrôle werd verder een bouillon genomen, die alkalisch bleef, bereid uit Cibils-vleeschextract volgens het vroeger gegeven voorschrift. Op geheel overeenkomstige manier werden nu met dezen bouillon weer

gevuld: 4 medicijnfleschjes van 200 grm. en 1 flesch geschikt voor de cultuur onder H. Ze bevatten dus:

N<sup>o</sup>. 1 150 grm. Cibils-bouillon.

N<sup>o</sup>. 2 150 grm. Cibils-bouillon met 3 grm. carb. calc.

N<sup>o</sup>. 3 150 grm. Cibils-bouillon met 2 grm. sulf. calc.

N<sup>o</sup>. 4 150 grm. Cibils-bouillon met 3 grm. carb. calc. en 2 grm. sulf. calc.

N<sup>o</sup>. 5 200 grm. Cibils-bouillon met 4 grm. carb. calc.

De hoeveelheden carb. calc. en sulf. calc. waren zoo genomen, dat de bodem der fleschjes met een flinke laag van die stoffen bedekt was en er dus zeker niet te kort kwam. Overmaat kon hier niet schaden.

Behalve deze fleschjes, waren nog 3 buisjes gevuld resp. met: kalfsvleeschbouillon met carb. calc., kalfsvleeschbouillon met sulf. calc. en kalfsvleeschbouillon met carb. calc. en sulf. calc., en 3 andere buisjes resp. met: Cibilsbouillon met carb. calc. Cibilsbouillon met sulf. calc. en Cibilsbouillon met carb. calc. en sulf. calc.

Deze buisjes konden dienen voor de reactie bepaling.

Alle fleschjes en buisjes werden geënt met bacil n<sup>o</sup>. 101 uit de stamcultuur. In allen kwam de cultuur op.

Beide flesschen n<sup>o</sup>. 5 werden 24 uur na de enting onder H gezet.

Reeds spoedig nu zag men onderling een duidelijk verschil ontstaan in het uiterlijk der cultures in kalfsvleeschbouillon in de buisjes en ook in de fleschjes. Die in kalfsvleeschbouillon met carb. calc. en in denzelfden bouillon met carb. calc. en sulf. calc. werden sterk troebel en bleven dit, terwijl die in kalfsvleeschbouillon alleen en in denzelfden bouillon met sulf. calc. niet zoo troebel werden en spoedig ophelderden. Ook hier vertoonde

dus de groei de meermalen beschreven kenmerken, daar zooals men zal zien de reactie er mee in overeenstemming was. De groei in de Cibils-bouillons was in allen ongeveer even sterk. De beide flesschen onder H vertoonden slechts een zeer zwakken groei; het meest troebel werd nog wel de cultuur in kalfsvleeschbouillon met carb. calc.

De reactie in het buisje met kalfsvleeschbouill. + carb. calc. bleef alkalisch; die in het buisje met kalfsvleeschbouill. + sulf. calc. bleef zuur; die in het buisje met kalfsvleeschbouill. + carb. calc. + sulf. calc. bleef alkalisch.

Alle buisjes met de Cibils-bouillons bleven alkalisch.

Gedurende 14 dagen werden ze geobserveerd. Toen was dus reeds duidelijk, dat men door toevoeging van carb. calc. in staat is een anders zuur wordende bouillon steeds alkalisch te houden, terwijl de groei er beter op wordt.

De intensiteit der reactie in kalfsvleeschbouillon met carb. calc. en in denzelfden bouillon met carb. calc. en sulf. calc. was dezelfde, evenzoo was er geen merkbaar verschil in intensiteit der reactie tusschen de verschillende Cibils-bouillons.

De cultures in kalfsvleeschbouillon werden gefiltreerd toen ze 20 dagen oud waren; de reactie bleek toen geheel overeen te komen met die in de buisjes, namelijk: cultuur in kalfsvleeschbouill.: zuur.

„ in kalfsvl. bouill. + carb. calc. : alkal.

„ in kalfsvl. bouill. + sulf. calc. : zuur.

„ in kalfsvl. bouill. + carb. calc. + sulf. calc. : alkal.

Cultuur onder H: alkalisch; dus hier ook was het carb. calc. geschikt gebleken, om de vloeistof alkalisch te houden.

De cultures in Cibils-bouillon waren 21 dagen oud, toen men ze filtreerde. In allen bleek de reactie alkalisch.

Nadat we aldus de oorzaak van het zuur worden van diphtheriebouillons hadden leeren kennen en het ons gelukt was, hetzij door eliminatie dier oorzaak, hetzij door vernietiging van het geproduceerde zuur, diphtheriebouillons naar willekeur alkalisch te houden, konden we ons wenden tot het onderzoek van de gifproductie in dergelijke alkalische of zure voedingsbodems.

Vooreerst echter wil ik in het volgende hoofdstuk nog enkele proeven beschrijven, die ik genomen heb over de reactieverandering van voedingsbouillon, wanneer daarin pseudo-diphtheriebacillen worden gekweekt.

---

### HOOFDSTUK III.

---

#### **Reactieverandering der bouilloncultures van den pseudo-diphtheriebacillus.**

---

Naar aanleiding van de beroemde onderzoekingen van LOEFFLER in 1884, trachtte ook VON HOFMANN-WELLENHOF<sup>1)</sup> den Klebs-Loefflerschen bacil uit de pseudomembranen van diphtherielijders te isoleeren. Hij verkreeg daarbij in reïncultuur een bacillus, die geheel beantwoordde aan de beschrijving, welke LOEFFLER van zijn bacil had gegeven, maar niet virulent was.

Het gelukte VON HOFMANN-WELLENHOF dikwijls (in 45 onderzochte gevallen 26 maal) dienzelfden bacil te isoleeren bij contrôleonderzoekingen, die hij verrichtte in gevallen van diphtherieachtige ontsteking van den pharynx bij scarlatina en morbilli, in gevallen van eenvoudige pharynx-katarrh en eindelijk ook bij onderzoek van geheel normale slijmvliesen. Aldus kwam hij er toe om aan te nemen, dat de door hem gevonden

<sup>1)</sup> VON HOFMANN-WELLENHOF, l. c. p. 6.

baeil een regelmatige bewoner van de keelholte is, die met diphtherie niets te maken heeft.

Bij gelegenheid van een samenkomst met LOEFFLER te Berlijn werden de cultures van VON HOFMANN-WELLENHOF vergeleken met de oorspronkelijke van LOEFFLER. Men kon daarbij geen morphologisch onderscheid tusschen beiden constateeren. Daarom werden met beider cultures cavia's geënt. Het resultaat beantwoordde evenwel in het geheel niet aan de verwachting, daar alle cavia's gezond bleven. Later bleek het, dat het negatieve resultaat, met de cultuur van LOEFFLER verkregen, moest worden geweten aan de omstandigheid, dat met een zeer oude cultuur was geëxperimenteerd, in welke de virulentie der bacillen sterk was afgenomen.

VON HOFMANN-WELLENHOF verrichtte vele infectieproeven met zijn bacillen, doch kon nooit cavia's er mede dooden. Later gelukte het hem echter ook virulente diphtheriebacillen te isoleeren, en LOEFFLER had intusschen ook, evenals VON HOFMANN-WELLENHOF, uit pseudo-membranen, naast virulente, morphologisch geheel daarmede overeenkomende, avirulente bacillen kunnen verkrijgen. Hij noemde deze laatste: pseudo-diphtheriebacillen.

VON HOFMANN-WELLENHOF kon door nauwkeurige vergelijking van cultures van beide bacillen op bloedserum, gelatine en agar, enkele punten van verschil opmerken, maar deze waren zoo gering en zoo inconstant, dat ze niet praktisch bruikbaar waren voor de onderscheiding van beide bacteriën.

De schrijver zegt dan ook: „Meine Bemühungen,

zwischen virulenten und nicht-virulenten Kulturen verwerthbare morphologische Unterschiede auf zu finden, waren bisher erfolglos; mehrmals glaubte ich, solche schon gefunden zu haben, aber dieselben erwiesen sich als nicht constant oder noch innerhalb der Variationsbreite fallend, welche den Kulturen eines jeden einzelnen Falles zukommt, oder doch als keine anderen, als sie die virulenten Fälle unter einander oder die nicht-virulenten Fälle unter einander auch zeigen."

LOEFFLER <sup>1)</sup> vond in hoofdzaak ook dezefde punten van verschil tusschen beide bacillen als VON HOFMANN-WELLENHOF, maar wijst er eveneens op, dat verreweg het voornaamste onderscheid is gelegen in de algeheele onschadelijkheid van den pseudo-, in tegenstelling tot den echten diphtheriebacil.

ZARNIKO vindt geen bruikbaar onderscheid in den groei van beide bacillen op LOEFFLER's serum, op agar en op gelatine, ook niet in de temperatuurgrenzen van den groei van beiden, of in den vorm der staaffjes. Daarentegen, zegt hij, vertoont de groei in bouillon een zeer groot onderscheid. De pseudo-diphtheriebacil maakt den bouillon van den 3<sup>den</sup> dag af aan duidelijk troebel. Het praecipitaat op den bodem is compacter en witter. En terwijl de diphtheriebacil na korten tijd den bouillon zuur maakt, zou de bouilloncultuur van den pseudo-diphtheriebacil steeds hare alkalische reactie behouden.

ROUX en YERSIN <sup>2)</sup> wezen op het volgend onderscheid

<sup>1)</sup> LOEFFLER, l. c. p. 6.

<sup>2)</sup> ROUX et YERSIN. Contribution à l'étude de la diphtérie. Ann. de l'Inst. Pasteur n°. 7. 1890. p. 385. 3e mémoire.

tusschen beide bacillen: De pseudo-diphtheriebacil is in de kolonies op serum dikwijls korter, dan de echte bacil. De cultures in bouillon zijn weliger en gaan nog voort te groeien bij 20°—22°, bij welke temperatuur de echte bacil maar zeer zwak groeit. Zaait men ter vergelijking beide bacterien in bouillon, dan ziet men, dat beiden den bouillon eerst zuur en later weer alkalisch doen worden, maar de reactieveranderingen ontstaan veel sneller in de cultures van den pseudo-diphtheriebacil. Evenals de echte groeit ook de pseudo-diphtheriebacil onder afsluiting der lucht, maar minder krachtig dan de eerste.

ESCHERICH <sup>1)</sup> constateerde op bloedserum in hetalgemeen een minder sterke ontwikkeling van den pseudo-diphtheriebacil, dan van den echten diphtheriebacil. Op glycerineagar en op gelatine vond hij daarentegen den groei van den eersten krachtiger.

De cultuur van den pseudo-diphtheriebacillus in bouillon is volgens ESCHERICH na 24 uur sterk troebel, veel sterker dan die van den diphtheriebacil, en ze wordt later helder. Op den bodem vindt men meestal een slijmerig, wit neerslag, in veel grooter hoeveelheid dan bij den echten bacil. Maar een wezenlijk, constant onderscheid is volgens hem, evenals volgens ZARNIKO, gelegen in de verschillende verhouding der reactie van den bouillon, welke bij den pseudo-diphtheriebacil nooit bepaald zuur wordt en reeds na weinig dagen een duidelijke toename der alkaliteit vertoont. Bovendien zegt ESCHERICH nog: de toevoeging van druivensuiker aan den bouillon verandert niets aan die verhouding.

<sup>1)</sup> ESCHERICH, l. c.

Den groei onder afsluiting van zuurstof vond hij als ROUX en YERSIN.

Ziedaar nu in hoofdzaak, hetgeen tot heden gepubliceerd is over de morphologische en biologische eigenschappen van den pseudo-diphtheriebacil in tegenstelling tot den echten Klebs-Loefflerschen bacil. Speciaal met het oog op de verhouding der bouilloncultures heb ik het vorige weergegeven, omdat ik alleen daarover enkele proeven heb verricht. Verschillende onderzoekers geven nog minutieuze en uitgebreide beschrijvingen van den groei van beide bacillen op andere voedingsbodems, maar geen enkel onderscheid, uitgezonderd het gemis aan virulentie, was zoo constant en zoo sterk als dat, hetwelk in de verhouding der bouillon-cultures door bovengenoemde onderzoekers werd opgemerkt; hoewel, zooals we gezien hebben, hunne meeningen over dat laatste onderscheid zeer uiteenloopen.

Ik wil hier ook niet nader op de interessante quaestie ingaan, of de pseudo-diphtheriebacil, zooals o.a. ESCHERICH meent, een afzonderlijke soort van bacil vertegenwoordigt, dan of hij, volgens ROUX en YERSIN en BAUMGARTEN, slechts een geattenuëerde diphtheriebacil is.

Voor mijn proeven gebruikte ik een in het laboratorium aanwezigen pseudo-diphtheriebacil, bekend als ps.-diphtheriebacil n<sup>o</sup>. 115. Deze was 30 Jan. '95 geïsoleerd uit het exsudaat van een kind lijdende aan verdachte angina in het ziekenhuis alhier.

Die pseudo-diphtheriebacil ontwikkelde zich op glycerineagar zeer veel krachtiger, dan de door mij gebruikte diphtheriebacillen. Op LOEFFLER's serum was de groei ook nog iets sterker dan die der echte diphtheriebacillen,

terwijl de kolonies zich meer in de vlakke uitbreiden. Een duidelijk verschil in kleur was echter niet op te merken. Schoon de bacil morphologisch de grootste overeenkomst bezat met den echten diphtheriebacil, en nog wel met de lange variëteit, was hij voor de cavia avirulent.

*Proef A.*

Met bovengenoemden pseudo-diphtheriebacillus werd geënt een buisje met denzelfden kalfsvleeschbouillon als in proef I was gebezigd. Een ander buisje met denzelfden bouillon, geënt met diphtheriebacil n°. 101, werd ter vergelijking daarnaast geplaatst. Terwijl nu de diphtheriecultuur gedurende ongeveer 4 dagen zuur reageerde, bleef de reactie van de pseudo-diphtheriecultuur steeds alkalisch gedurende de 21 dagen, dat ze geobserveerd werd. Alleen den dag na de enting was de intensiteit der alkalische reactie iets afgenomen, later echter nam ze sterk toe. De groei van den pseudo-diphtheriebacillus was van den beginne af aan veel krachtiger, dan die van den diphtheriebacil, en de bouillon, waarin de eerste groeide, bleef steeds flink troebel, klaarde alleen in de laatste dagen der proef een weinig op, terwijl zich een volumineus praecipitaat op den bodem verzamelde.

Dat resultaat komt dus geheel overeen met de bevindingen van ZARNIKO en ESCHERICH.

*Proef B.*

Van twee buisjes met kalfsvleeschbouillon uit proef II, die door den diphtheriebacil niet zuur werd gemaakt, entte men het eene met den pseudo-, het andere met

een echten diphtheriebacil, n°. 101. Beide cultures bleven gedurende 21 dagen de alkalische reactie behouden, welke in de eerste dagen niet afnam, maar later wel toenam in intensiteit, het meest in de cultuur van den pseudo-diphtheriebacil. 7 uur na de enting was de cultuur van den laatsten reeds licht troebel. De troebelheid en het praecipitaat, dat werd gevormd, bleven steeds die in de diphtheriecultuur overtreffen.

#### *Proef C.*

Met de bouillons uit vleeschextractsoorten en de peptonkeukenzoutoplossing werden, zooals in proef VII is vermeld, eveneens buisjes gevuld, die geënt werden met den pseudo-diphtheriebacil.

Al deze cultures bleven ook alkalisch reageeren en de groei was in allen duidelijk sterker, dan die der diphtheriebacillen in de overeenkomstige voedingsbodems. Het sterkst groeiden de pseudo-diphtheriebacillen in Liebig, iets minder in Kemmerich en Cibils en verreweg het minst sterk in de peptonkeukenzoutoplossing.

#### *Proef D.*

Zooals reeds in proef V werd medegedeeld, plaatste men naast de buisjes gevuld met alkalisch blijvenden bouillon (uit proef II), waaraan was toegevoegd: resp. 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, en 1% glucose, en geënt met diphtheriebacil n°. 101, ook 5 buisjes ieder met een dier verschillende bouillons gevuld, doch geënt met den pseudo-diphtheriebacil.

De cultures van beide bacillen werden gedurende denzelfden tijd geobserveerd. Terwijl nu de reactie in

alle diphtheriecultures zuur werd en bleef, merkte men bij de cultures van den pseudo-diphtheriebacil het volgende op:

de bouillon met 0,2% glucose bleef steeds alkalisch; hij vertoonde geen vermindering der intensiteit van die reactie in de eerste dagen;

de bouillon met 0,4% glucose reageerde den eersten dag na de enting licht alkalisch, den 2<sup>den</sup> dag licht zuur, den 3<sup>den</sup> dag weer duidelijk alkalisch en bleef nu in het vervolg deze laatste reactie behouden;

de bouillon met 0,6% glucose reageerde den dag na de enting licht zuur, den volgenden dag duidelijk zuur en bleef dit gedurende 5 dagen. Later werd hij eerst licht en vervolgens duidelijk alkalisch;

de bouillon met 0,8% glucose reageerde den dag na de enting licht zuur, den volgenden dag duidelijk zuur en bleef nu gedurende 25 dagen aldus. Vervolgens werd hij opeens licht (cultuur bleek zuiver) en verder duidelijk alkalisch;

de bouillon met 1% glucose reageerde den dag na de enting licht, den volgenden dag duidelijk zuur en bleef 26 dagen zuur, voordat hij weer alkalisch werd.

7 uur na de enting waren alle pseudo-diphtheriecultures reeds licht troebel. De bouillon met 0,2% glucose bleef troebel, helderde slechts op het laatst op. De bouillon met 0,4% glucose bleef eveneens troebel, was misschien iets, maar niet duidelijk helderer gedurende den dag, dat hij zuur reageerde. Toen echter de zure reactie in den bouillon met 0,6% glucose was ingetreden, begon deze gaandeweg geheel op te helderen en werd eerst opnieuw troebel, toen de alkalische reactie te voor-

schijn kwam. Hetzelfde merkte men op bij den bouillon met 0,8% en 1% glucose.

De bouilloncultures van onzen pseudo-diphtheriebacil vertoonden dus een uiterlijk, dat evenzoo van de reactie afhankelijk was, als we dat reeds bij de diphtheriebouilloncultures opmerkten.

De groei in de pseudo-diphtheriecultures was weer duidelijk krachtiger dan die in de diphtheriecultures. Gedurende het bestaan der zure reactie was het praecipitaat, gedurende dat der alkalische reactie waren de troebelheid en het praecipitaat sterker.

Uit het verkregen resultaat blijkt dus, in strijd met de bevindingen van ZARNIKO en ESCHERICH, dat onze pseudo-diphtheriebacillus in staat was om in bouilloncultures een zure reactie te doen verschijnen en dat die zure reactie hier, evenals in cultures van den diphtheriebacil, door omzetting van glucose ontstaat; alleen schijnt het voor den pseudo-diphtheriebacil noodig te zijn, dat de bouillon een hooger gehalte aan glucose bezitte, om een zure reactie daarin door zijn groei te voorschijn te kunnen roepen. Dit onderscheid staat waarschijnlijk in verband met den krachtigeren groei van den pseudo-diphtheriebacil.

Wanneer men aanneemt, dat ZARNIKO en ESCHERICH bij hun cultuur van den pseudo-diphtheriebacillus, bouillons bezigden met betrekkelijk weinig glucose, zooals wij er b. v. een gebruikt hebben bij onze proef A., waarin de zure reactie niet te voorschijn komt bij cultuur van den pseudo-diphtheriebacil, daarentegen wel bij cultuur van den diphtheriebacil, dan kan men hun resultaten zeer goed verklaren.

Onderstelt men eveneens, dat de bouillons van ROUX en YERSIN meer glucose bevatten dan die van ZARNIKO en ESCHERICH, altijd onder geheel dezelfde omstandigheden van cultuur, dan kan men zich, volgens onze bevindingen, zeer goed voorstellen, dat eerstgenoemde onderzoekers, zoowel bij cultuur van den pseudo- als van den echten diphtheriebacil, de zure reactie zagen intreden en dat de reactieveranderingen in de cultures van den pseudo-diphtheriebacil veel sneller ontstonden.

Zoo gelukte het dus de uiteenlopende resultaten, die verschillende onderzoekers bij hun bouilloncultures verkregen, geheel bevredigend te verklaren.

## HOOFDSTUK IV.

---

### **Proeven over de gifproductie in diphtherie- bouilloncultures.**

---

De diphtheriecultures, gekweekt in kolfjes en fleschjes en in de vorige hoofdstukken beschreven, werden, gelijk boven vermeld, mede op haar vergiftigheid onderzocht.

Alle cultures werden daartoe op gelijke wijze behandeld. Wijn gebleken was, dat de diphtheriebacil, onder voor gifproductie gunstige voorwaarden gekweekt, reeds binnen circa 20 dagen een vrij groote hoeveelheid vergif in bouillon kon vormen, bezigde ik, waar het belangrijk scheen den voor gifvorming meest gunstige voedingsbouillon te leeren kennen, bijna uitsluitend cultures, die slechts 19—22 dagen oud waren. Zodoende zouden meer evidente verschillen van vergiftigheid voor den dag komen, dan bij oudere cultures.

Wanneer de tijd voor de filtratie was gekomen werd de cultuur, na voorafgegane contrôle-uitzaaiing op glycerineagar en op LOEFFLER's serum, gemeten in een zuiver en droog maatglas, om na te gaan hoeveel van het oorspronkelijk volumen was verdamppt. Die indamping bedroeg voor alle cultures van een serie ongeveer

evenveel, daar altijd kolfjes of fleschjes van denzelfden vorm en gelijke grootte waren genomen, die een gelijke hoeveelheid bevatten en in dezelfde broodstroof stonden. Overigens was ook het verschil in de kolfjes en fleschjes, die voor toxiciteitsonderzoek werden gebruikt, van geen beteekenis. De vermindering door indamping van een cultuur met een oorspronkelijk volumen van  $200 \text{ cm}^3$  bedroeg in 19—22 dagen hoogstens  $10 \text{ cm}^3$ . Men kon dus dezen factor bij vergelijking van de cultures onder elkaar wel verwaarloozen.

Na meting en reactiebepaling werd nu aan de cultuur  $0,5 \%$  carbol toegevoegd, om bederf van het filtraat te voorkomen, wanneer nog microörganismen mochten binnendringen door fouten in de asepsis na het filtreren. Alle verkregen filtraten bleven dan ook helder. Volgens de onderzoekingen van Roux en Yersin heeft carbol wel een vertragenden invloed op de werking van het gif, maar deze is, volgens de ervaring in het laboratorium alhier verkregen, bij een hoeveelheid van  $0,5 \%$  van weinig beteekenis.

Nadat het carbol door licht schudden geheel in de vloeistof was opgelost, werd deze gefiltreerd door een dubbel filtrum van gewoon filtreerpapier. Het aldus verkregen filtraat, dat altijd al bijna volkomen helder was, werd dan opzettelijk door een en dezelfde bougie van CHAMBERLAND geperst, omdat, gelijk men weet, de verschillende bougies niet altijd hetzelfde filtraat leveren. De bougie werd eerst bevochtigd door er een kleine hoeveelheid physiologische keukenzoutsolutie door te persen. Het spreekt echter van zelf, dat men het filtraat eerst opving, wanneer het reeds eenigen tijd even intensief

was geklourd als de vloeistof, die door de bougie heen-gedreven werd, zoodat men zeker kon zijn, dat al de keukenzoutsolutie er uit was. Om nu in staat te zijn dezelfde bougie meermalen te kunnen gebruiken, werd er tusschen de filtratie van twee cultures 1--2 liter physiologische keukenzoutsolutie door heen geperst; aldus kwamen wel geen bestanddeelen der vorige cultuur in het filtraat der tweede, terwijl de permeabiliteit van de bougie ook niet merkbaar verminderde, omdat de over-groote meerderheid der bacteriën door de voorafgaande filtratie door filtreerpapier was teruggehouden. Het filtraat uit de bougie werd opgevangen in zuivere, droge en gesteriliseerde fleschjes, die daarna behoorlijk gelakt op een koele plaats in het duister werden bewaard. Al die manipulaties geschieden zoo snel mogelijk en het filtraat werd daarbij zoo weinig mogelijk aan het licht blootgesteld.

Elk fleschje diende slechts voor ééne injectie. Als proefdier werd uitsluitend gebruik gemaakt van de cavia cobaya en men injecteerde alleen subcutaan aan den buik. Vooraf werd zorgvuldig geknipt en gereinigd met alcohol en sublimaat. De verdunningen van het filtraat, noodig voor de injectie van kleine onderdeelen van 1 cM<sup>3</sup>, maakte men met gesteriliseerde, physiologische keukenzoutsolutie. De steekopening werd afgesloten met collodium.

Om de toxiciteit direct te kunnen vergelijken met die, welke in de cultuur, in de inleiding vermeld, was verkregen, ontvingen mijn proefdieren steeds 0,3 cM<sup>3</sup> pro kilo subcutaan. Van de bedoelde cultuur toch bezat het filtraat de eigenschap om cavia's, hoogstens 600 grm.

wegende, na subcutane injectie van 0,3 cm<sup>3</sup> pro kilo binnen 48 uren te doodden. Die graad van giftigheid zou ook in mijn proeven binnen circa 20 dagen moeten worden bereikt, ja zoo mogelijk overschreden.

De bijzonderheden omtrent de dierproeven vindt men in de verschillende protocols hierachter medegedeeld; een kort overzicht er van laat ik hier volgen.

*Proeven met de filtraten van cultures in denzelfden kalfsvleeschbouillon, waaraan toegevoegd, 0,01 %<sub>o</sub>, 0,1 %<sub>o</sub>, resp. 0,6%<sub>o</sub> glucose.*

*Vergelijk proef IV en V. Protocol A.*

Deze cultures waren geënt met bacil n<sup>o</sup>. 101. De dieren, welke men had ingespoten met het alkalisch filtraat der bouillons met 0,01 %<sub>o</sub> en met 0,1 %<sub>o</sub> glucose, (cavia n<sup>o</sup>. 1, 2, 3,) vertoonden een sterke zwelling met opvolgende necrose op de plaats van injectie, maar succombeerden niet. Het necrotisch gedeelte werd langzamerhand afgestooten. Ook namen die dieren niet in gewicht af en waren overigens niet merkbaar ziek.

De cavia n<sup>o</sup>. 4, welke het zure filtraat der bouillon met 0,6 %<sub>o</sub> glucose had gekregen, vertoonde alleen op den dag na de injectie een zeer lichte zwelling, welke den volgenden dag reeds was verdwenen.

Duidelijk blijkt uit die proef, dat toevoeging van glucose aan denzelfden bouillon in zóó groote hoeveelheid (0,6 %<sub>o</sub>), dat de reactie zuur bleef, de vergifproductie aanmerkelijk vermindert. Schoon de bouillons, waaraan slechts 0,01 %<sub>o</sub> en 0,1 %<sub>o</sub> glucose was toegevoegd, alkalisch waren gebleven, was hun filtraat toch op verre na niet zóó

giftig, dat 0,3 cm<sup>3</sup> pro kilo subcutaan cavia's binnen 48 uren doodde. Wellicht was die kleine hoeveelheid suiker reeds nadelig voor de gifproductie, of er waren andere omstandigheden in het spel, gelijk daar zijn: vermindering van de virulentie van den bacil, trager vermenigvuldiging in den gebezigten bouillon, moeilijker toetreden van de lucht, enz. In elk geval bevestigen die proeven het door Roux en YERSIN e. a. meermalen geconstateerde feit, dat de gifproductie niet van betekenis is, zolang de cultuur zuur reageert.

De toename in gewicht van alle cavia's, den eersten dag na de injectie gelijk men in dit protocol opmerkt is te wijten aan minder goede voeding daags vóór de proef, terwijl de dieren in de kleine hokjes, waarin zij daarna ter observatie overgingen, flink werden gevoed.

*Proeven met de filtraten van cultures in bouillons bereid uit: Liebig-, Kemmerich- en Cibils-vleeschextract en in pepton-keukenzoutoplossing.*

*Vergelijk proef VII. Protocol B.*

Al deze cultures waren geënt met bacil n°. 101. De dieren met de filtraten der bouillons uit vleeschextract-soorten ingespoten, gingen allen een flinke zwelling met opvolgende necrose vertoonen. Die, welke de filtraten van Kemmerich- en Cibils-bouillon hadden gekregen (cavia n°. 6 en 7), namen bovendien langzamerhand in gewicht af en stierven na 8 dagen. In deze had dus de sterkste gifproductie plaats gegrepen.

Overeenkomstig met den zeer zwakken groei in de pepton-keukenzoutoplossing werd de werking van het filtraat daarvan ook uiterst zwak bevonden (cavia n°. 8).

De dood der beide cavia's n<sup>o</sup>. 6 en n<sup>o</sup>. 7 was zonder twijfel toe te schrijven aan het ingespoten vergif. Andere oorzaken van den dood werden niet gevonden.

De aanvankelijk toename in gewicht van alle dieren op den eersten dag na de injectie is ook hier weer te wijten aan minder overvloedige voeding vóór dien tijd.

Om na te gaan, of de gifproductie in Kemmerich- en Cibils-bouillon mettertijd, dat wil zeggen na meer dan 20 dagen, nog aanmerkelijk toenam, werden de volgende twee proeven genomen.

*Proeven met het filtraat van 45 dagen oude cultures in denzelfden bouillon bereid uit Kemmerich-vleescheextract.*

*Vergelijk Protocol. C.*

Volgens het vroeger gegeven voorschrift werd bouillon uit Kemmerich-vleescheextract vervaardigd en daarmede literflesschen hoog gevuld. Na sterilisatie en contróle bezaaide men allen met bacil n<sup>o</sup>. 100 uit de stamcultuur. De bacil groeide niet heel sterk, een aantal flesschen moesten een tweede maal geënt worden. De cultures bleven staan van 10 Maart tot 24 April, waren dus 45 dagen oud toen ze gefiltreerd werden. Voor de filtratie werden de cultures uit alle flesschen bij elkaar gegoten, gemengd, daarin 0,5 % carbol opgelost en op de gewone manier gefiltreerd.

Van het filtraat ontvingen twee cavia's (n<sup>o</sup>. 9 en 10) weer 0,3 cm<sup>3</sup> pro kilo subcutaan met het volgende resultaat: Beiden gingen een flinke zwelling vertoonen op de plaats van injectie, namen progressief in gewicht af, werden al zeker en zeker en succombeerden op

den 4<sup>den</sup> dag na de injectie. De obductie toonde duidelijk aan, dat de dood door het diphtheriegif was veroorzaakt.

Hoewel men de cultures van bacil n°. 100 vrij oud had laten worden, bleek dus de gifproductie daarin bij deze tweede proef nog niet zoo sterk, dat 0,3 cm<sup>3</sup> pro kilo subcutaan binnen 48 uren doodde. Door cultuur in dezen bouillon konden we het gewenschte resultaat nog niet bereiken.

*Proeven met filtraten van cultures in denzelfden bouillon uit Cibils-vleescheextract, maar op verschillende tijden gefiltreerd.*

*Vergelijk Protocol D.*

Een hoeveelheid bouillon werd op de gewone manier uit Cibils-vleescheextract bereid en daarmede gevuld medicijnfleschjes van 500 grm. inhoud, zoodat elk fleschje 450 cm<sup>3</sup> bevatte. Na sterilisatie en contrôle werden ze bezaaid op 14 Maart met bacil n°. 102 uit stamcultuur. De bacil groeide zeer intensief. Op 30 Maart, dus na 16 dagen, werd één fleschje gefiltreerd op de gewone manier en van het verkregen filtraat direct bij een cavia 0,3 cm<sup>3</sup> pro kilo subcutaan ingespoten (cavia n°. 11). Dit dier vertoonde den volgenden dag een weinig zwelling, welke weldra verdween zonder necrose, en bleef gezond.

Op 9 April, dus na 26 dagen, werd een tweede flesch gefiltreerd en dezelfde dosis van het filtraat bij een andere cavia subcutaan ingespoten (cavia n°. 12). Dit dier vertoonde in de eerste dagen een vrij flinke zwelling op de plaats van injectie, gevolgd door necrose. Het

nam ook in de eerste dagen een weinig in gewicht af, maar werd overigens niet ziek. Het necrotische gedeelte werd dan ook later afgestooten en het dier genas.

Op 4 Mei werd een derde flesch gefiltreerd. De cultuur was dus toen 51 dagen oud.

De gewone dosis van het filtraat werd bij cavia n°. 13 subcutaan ingespoten. Dit dier nam in de eerste dagen een weinig in gewicht af, vertoonde een flinke zwelling gevolgd door necrose; maar het necrotisch gedeelte werd later afgestooten en de cavia genas.

Zelfs na 51 dagen was er dus in de cultures van dien bacil in Cibils-bouillon niet genoeg gif geproduceerd, om in een hoeveelheid van 0,3 cm<sup>3</sup> pro kilo subcutaan toegediend, een cavia te doden.

*Proeven met de filtraten van cultures in Liebig-bouillon aan de lucht en onder waterstof.*

*Vergel. proef XII. Protocol E.*

Deze bouillon was geënt met bacil n°. 101 uit stamcultuur.

Het filtraat der Liebig-bouilloncultuur aan de lucht doodde het dier (cavia n°. 14) in 3 dagen. Hier had men dus, volgens deze proef, een gif van vrij groote sterkte. Of men nu met een bijzonder gevoelige cavia te doen had, moet ik in het midden laten; de bouillon was geheel op dezelfde manier als vroeger uit Liebig-vleeschextract bereid, de cultuur had onder dezelfde voorwaarden verkeerd en de groei daarin was niet opvallend sterk geweest.

De cavia's n°. 15 en n°. 16, die met de filtraten der

cultures onder H waren ingespoten ondervonden daarvan niet het minste letsel.

Uit het resultaat van deze proeven zou men dus geneigd kunnen zijn aan te nemen, dat de anaërobieose een nadeeligen invloed heeft op de toxiciteit; echter dient men in het oog te houden, dat de onwerkzaamheid van het filtraat hier ook kan worden verklaard uit den zeer geringen groei en het ontbreken der alkalische reactie.

*Proeven met de filtraten van cultures in bouillon bereid uit versch, en in bouillon uit oud rundvleesch.*

*Vergel. proef XIII. Protocol F.*

Alle cultures waren geënt met bacil n°. 102 uit stamcultuur. De cultuur in bouillon uit oud vleesch was 21 dagen, die in bouillon uit versch vleesch 22 dagen oud, toen ze gefiltreerd werd. Door het filtraat van den bouillon uit versch vleesch, die gedurende 12 dagen ongeveer zuur was geweest, werd de cavia n°. 17 niet gedood. Het dier vertoonde slechts een geringe zwelling, gevolgd door een lichte, oppervlakkige necrose. Het scheen niet ziek en nam niet in gewicht af.

De cavia n°. 18, die met het filtraat van den bouillon uit oud vleesch, welke steeds alkalisch had gereageerd, was ingespoten, vertoonde daarentegen den volgenden dag een sterke gewichtsafname, terwijl er een geringe zwelling op de plaats van injectie aanwezig was. Het dier was toen reeds zeer ziek, at niet meer en zat incengedoken in een hoek van zijn kooi. Den tweeden dag na de injectie vond men het 's morgens dood. De

sctie bracht de typische afwijkingen voor den dag. Die sterke gifproductie was dus verkregen in een bouillon-cultuur, die steeds alkalisch had gereageerd en zelfs gedurende verscheidene dagen een sterke intensiteit dier reactie had vertoond, zooals in proef XIII is gemeld. Dit resultaat pleet dus sterk voor den gunstigen invloed der alkalische reactie en aan den anderen kant tegen de schadelijke werking van de gevormde basische producten, zooals die door BRIEGER wordt aangenomen.

Intusschen zou men kunnen meenen, dat hier, behalve de werking van het diphtherietoxine, ook die van ptomainen in het spel was geweest, daar het vleesch eenigen tijd bij 20° was bewaard en dus in een lichten graad van bederf had verkeerd. Het vleesch was wel verkleurd, maar liet slechts een geringe rottingslucht waarnemen, toen het voor de bouillonbereiding werd gebruikt. Daarom trachtte ik na te gaan of die ptomainen eenigszins tot den dood van het dier hadden kunnen bijdragen. Zooals reeds door de beroemde onderzoekingen van PANUM <sup>1)</sup> bekend is geworden, vernietigt men de ptomainen niet door koken, zelfs niet wanneer dit uren lang wordt voortgezet. Daarentegen wordt, zooals ROUX en YERSIN hebben gevonden, het diphtheriegif reeds onwerkzaam door een kortdurende verhitting boven 60°. Een gedeelte van het filtraat van den bouillon uit oud vleesch werd nu gedurende een half uur in kokend water gedompeld en daarvan 3 cM<sup>3</sup> subcutaan geïnjecteerd bij cavia n°. 19. Zooals uit het protocol

<sup>1)</sup> PANUM. Das putride Gift der Bacterien, die putride Infection oder Intoxication und die Septicämie. Virchow's Archiv. t. LX. 1874.

blijkt, ondervond het dier hiervan niet het minste letsel; het werd niet ziek en kreeg slechts in de eerste dagen een zeer geringe zwelling op de plaats van injectie.

*Proeven met de filtraten van cultures in kalfsvleeschbouillon en in denzelfden kalfsvleeschbouillon met carb. calc., — met sulf. calc., — met carb. en sulf. calc. en met carb. calc. onder waterstof.*

*Vergel. proef XV. Protocol G.*

Deze bouillons waren weder allen geënt met bacil n<sup>o</sup>. 101 uit stamcultuur.

Bij de filtratie waren de cultures allen 20 dagen oud.

Van de cavia's met de filtraten van deze bouillons ingespoten succombeerde alleen die, welke het filtraat van kalfsvleeschbouillon met carb. calc. had ontvangen (cavia n<sup>o</sup>. 22) en wel binnen 48 uren na de injectie, en zonder twijfel aan intoxicatie met diphtheriegif, zooals de sectie leerde.

De dieren, welke de beide andere alkalische filtraten hadden gekregen, namelijk dat van bouillon met carb. en sulf. calc. en dat van bouillon met carb. calc. onder H. (cavia n<sup>o</sup>. 23 en n<sup>o</sup>. 24), gingen beiden een lichte zwelling met opvolgende necrose vertoonen, maar bleven in leven.

De zure filtraten, namelijk dat van bouillon met sulf. calc. en dat van kalfsvleeschbouillon alleen, veroorzaakten slechts in de eerste twee dagen een zeer lichte zwelling (cavia n<sup>o</sup>. 20 en n<sup>o</sup>. 21).

Uit dit resultaat blijkt dus duidelijk de voordeelige invloed van het alkalisch blijven der reactie en tevens

de nadeelige werking van het sulf. calc. Bij cavia n°. 21 kan men de geringe toxiciteit nog toeschrijven aan de zure reactie, maar bij cavia n°. 23 had de cultuur steeds alkalisch gereageerd en lag het dus voor de hand om aan te nemen, dat het, door de aanwezigheid van sulf. calc. volgens BRIEGER gevormde, ammoniumsulfaat een nadeeligen invloed op de gifproductie uitoefende. Door den gunstigen invloed der alcaliciteit vertoonde het filtraat, bij cavia n°. 23 ingespoten, toch nog meerdere werkzaamheid dan dat bij cavia n. 21 ingespoten.

*Proeven met de filtraten van cultures in Cibils-bouillon en in denzelfden Cibils-bouillon met carb. calc., — met sulf. calc., — met carb. en sulf. calc. en — met carb. calc. onder waterstof.*

*Vergel. proef XV. Protocol H.*

Al deze bouillons waren geënt met diphtheriebacil n°. 101 uit stamcultuur. De cultures waren 21 dagen oud, toen ze gefiltreerd werden. Zooals wij reeds in proef XV vermelden, reageerden allen alkalisch en wel zonder duidelijk verschil in intensiteit. Volgens de resultaten der vorige proeven konden we nu verwachten, dat het filtraat van Cibils-bouillon alleen, en dat van Cibils-bouillon met carb. calc. niet belangrijk in werkzaamheid zouden verschillen.

De giftigheid van de filtraten van den bouillon met sulf. calc. zou echter volgens de aangenomen werking van dit zout minder groot zijn.

Het filtraat der cultuur onder H. zou, afhankelijk van

den geringen groei, eveneens maar zwak toxisch zijn.

Laat ons zien in hoeverre de resultaten aan onze verwachtingen beantwoordden.

De cavia n<sup>o</sup>. 25, met het filtraat der cultuur in Cibils-bouillon alleen ingespoten, stierf binnen 48 uren.

De cavia n<sup>o</sup>. 27, welke het filtraat van Cibils-bouillon met carb. calc. gekregen had, vertoonde een progressieve gewichtsvermindering met sterke zwelling, gevolgd door necrose op de plaats van injectie, en stierf op den 7<sup>den</sup> dag na de inspuiting. Volgens de obductie moest men den dood aan intoxicatie met diphtheriegif toeschrijven.

Het is mij niet geheel duidelijk geworden, waaraan dat belangrijk verschil in giftigheid te wijten is. Uit het resultaat, dat de sectie van cavia n<sup>o</sup>. 25 leverde, valt echter niet met voldoende zekerheid den dood door diphtheriegif op te maken. Het dier vertoonde geen hyperaemie der bijniere en had een zeer sterk door gas uitgezette maag. Den dag na de injectie was het niet merkbaar ziek, terwijl het slechts zeer weinig in gewicht was afgenomen. Den 2<sup>den</sup> dag na de injectie echter, werd het plotseling 'smorgens dood gevonden. Het is dus niet onmogelijk, dat de dood van het dier door een andere oorzaak, waarschijnlijk met de sterk uitgezette maag in verband staande, was verhaast.

Tegen mijn verwachting ging nu ook de cavia n<sup>o</sup>. 26, welke met het filtraat van Cibils-bouillon met sulf. calc. was ingespoten, een progressieve gewichtsvermindering vertoonen en werd al zieker en zieker, zonder plaatselijke zwelling. Op den 5<sup>den</sup> dag na de injectie werd het dier dood gevonden.

De sectie bracht licht. Het bleek daarbij, dat bij de

inspuiting de canule te diep was ingestooten en in de buikholte was terechtgekomen. Het dier had dus, in plaats van een subcutane, een intraperitoneale injectie ontvangen. Men vond subcutaan volstrekt geen oedeem, maar aan het peritoneum parietale, overeenkomende met de plaats van injectie, afzetting van fibrine. De geheele peritoneaalholte en ook de pleuraholten waren met een sterk haemorrhagische vloeistof gevuld. De bijniere waren licht hyperaemisch.

De cavia n°. 28, welke het filtraat van Cibils-bouillon met carb. en sulf. calc. ontvangen had, reageerde daarop totaal niet. N°. 29, welke het filtraat van de cultuur onder H. gekregen had, vertoonde slechts enkele dagen een lichte zwelling.

Bij nadere beschouwing waren dus de resultaten van deze proeven met Cibils-bouillons, wat betreft den gunstigen invloed der alkalische reactie, niet in tegenspraak met onze bevindingen in de vorige proeven.

De resultaten bij cavia n°. 24 en n°. 29 verkregen pleiten zeer voor den gunstigen invloed der anaërobiose op de giftigheid eener cultuur, wanneer deze slechts alkalisch blijft reageeren. Immers den zeer geringen groei in aanmerking genomen, welke in de cultures onder H had plaats gegrepen, was de werkzaamheid van de filtraten dier cultures bepaald een sterke te noemen.

Nadat uit de voorafgegane proeven was gebleken, dat de sterkste giftproductie had plaats gegrepen in den alkalischen bouillon bereid uit oud rundvleesch en in den, door toevoeging van carbonas calcicus, alkalisch gehouden bouillon, bereid uit versch kalfsvleesch, nam ik een bouillon bereid uit oud rundvleesch, waaraan ik

ten overvloede nog carbonas calcicus toevoegde, om, indien er nog eenig zuur werd gevormd, ook die kleine quantiteit dadelijk te binden. Zoodoende, meende ik, zouden de omstandigheden zoo gunstig mogelijk moeten zijn.

*Proeven met de filtraten van cultures in bouillon bereid uit oud rundvleesch, waaraan carb. calc. was toegevoegd.*

*Vergelijk Protocol I.*

Geheel op dezelfde wijze, als in proef XIII is beschreven, liet men een stuk versch rundvleesch eenigen tijd bij ongeveer 20° staan en bereidde toen daaruit bouillon. Deze bouillon werd verdeeld in medicijnfleschjes van 500 cM<sup>3</sup> inhoud zoo, dat elke flesch 450 cM<sup>3</sup> bevatte, dus hoog was gevuld. In elke flesch werd een voldoende hoeveelheid carb. calc. gedaan.

De bouillon werd bezaaid op 3 Mei met diphtheriebacil n°. 102. De bacteriën groeiden uitstekend.

Op 27 Mei, dus na 24 dagen, werd de cultuur uit één der flesschen gefiltreerd. Op 28 Mei, te 11 ure v.m., werd van het filtraat 0,3 cM<sup>3</sup> pro kilo bij een cavia van 660 grm., dus bijzonder zwaar, subcutaan ingespoten (cavia n°. 30). Dat dier was den volgenden dag ziek, vertoonde een weinig zwelling op de plaats van injectie en was sterk in gewicht afgenomen; het stierf dan ook nog op denzelfden dag 's avonds te 6 ure, dus binnen 36 uren na de injectie.

De obductie bracht de typische pleuritis serosa en sterke hyperaemie der bijniere aan het licht.

Op 3 Juni werden de cultures uit de overige flesschen bijeengegoten en daarna gefiltreerd. Om den graad van

giftigheid van dit filtraat te leeren kennen, werd nu bij een cavia 0,2 cM<sup>3</sup> pro kilo (cavia n<sup>o</sup>. 31) en bij een andere 0,1 cM<sup>3</sup> pro kilo ingespoten (cavia n<sup>o</sup>. 32).

De eerste, welke 0,2 cM<sup>3</sup> pro kilo had ontvangen, was den volgenden dag ziek, vertoonde een duidelijke zwelling en stierf op den tweeden dag na de injectie, dus binnen 48 uren. De sectie toonde weer pleuritis serosa en hyperaemie der bijnieren aan.

De tweede, welke 0,1 cM<sup>3</sup> pro kilo had ontvangen, vertoonde op den dag na de injectie eveneens een duidelijke zwelling en was ziek. Den volgende dagen bleef het dier die zwelling behouden, werd al zieker en zieker, nam in gewicht af en stierf op den 4<sup>den</sup> dag na de injectie.

0,2 cM<sup>3</sup> van het filtraat dier 31 dagen oude cultuur doodde dus nog 1 kilo cavia binnen 48 uren.

## RÉSUMÉ.

---

In korte trekken samengevat, luiden derhalve de uitkomsten van mijn proeven, als volgt:

In licht alkalischen voedingsbouillon produceert de diphtheriebacil alleen dan een zoo groote hoeveelheid zuur, dat de voedingsvlocestof een zure reactie aanneemt, als zich in dien bouillon zekere hoeveelheid glucose of glycerine bevindt.

In bouillons bereid uit versch rund- of kalfsvleesch is, naar de ervaring leert, bijna altijd een zoo groote hoeveelheid glucose aanwezig, dat de reactie, onder invloed van de ontwikkeling van den bacil, zeer duidelijk zuur wordt.

Daarentegen is volstrekt geen omslag der reactie te constateeren, als men den bacil kweekt in bouillons uit vleeschextracten (Liebig, Kemmerich, Cibils) bereid. Voegt men nu aan dergelijke bouillons, die dus blijkbaar zeer weinig of geen glucose bevatten, een zekere hoeveelheid druivensuiker toe, dan tredt de zure reactie

na zekeren tijd in, terwijl de intensiteit dier reactie afhankelijk is van de toegevoegde hoeveelheid suiker.

De zure reactie, die in bouillons uit versch vleesch bereid is ingetreden, maakt in zeer vele gevallen weder plaats voor een alkalische; voor dien tweeden omslag der reactie is des te meer tijd noodig, naarmate het vleesch een grootere hoeveelheid glucose bevat. Door toevoeging van verschillende hoeveelheden druivensuiker aan een bouillon, die zonder die toevoeging bleek alkalisch te blijven, kan men in dien bouillon een tijdelijke of een blijvende zure reactie doen ontstaan.

In suiker- en eiwitvrije urine produceert de diphtheriebacil geen zuur. In urine van een diabeticus of in oorspronkelijk suikervrije urine, waaraan een weinig glucose is toegevoegd, wordt zuur gevormd.

Het feit, dat af en toe in bouillons bereid uit rund- of kalfsvlcesch de zure reactie niet kan worden geconstateerd, is zonder twijfel in de eerste plaats hieraan toe te schrijven, dat het gebezigde vleesch reeds eenige dagen oud was.

In bouillons, bereid uit een en hetzelfde stuk vleesch, doch zoo, dat men een deel daarvan in verschen toestand, een ander deel nadat het eenige dagen is bewaard geworden, voor die bereiding bezigt, kan men den invloed van het oud zijn van het vleesch gemakkelijk constateeren.

De pseudo-diphtheriebacil verhoudt zich, met betrekking tot de zuurproductie in genoemde bouillons, geheel als de echte diphtheriebacil. Alleen valt op te merken, dat, in tegenstelling tot den echten diphtheriebacil, de pseudo-diphtheriebacil een ietwat grootere hoeveelheid

suiker behoeft, om een omslag van de oorspronkelijke, alkalische reactie teweeg te brengen. Daarom blijft dien omslag uit (ZARNIKO en ESCHERICH), als toevalligerwijze de gebezigde bouillon een relatief kleine hoeveelheid glucose bevat.

Het toetreden der dampkringslucht oefent op de reactie der diphtheriecultuur een manifesten invloed uit: de eenmaal zuur geworden diphtheriecultuur blijft die zure reactie behouden, als het toetreden der lucht is verhinderd. Door rijkelijken toevoer van lucht aan de zuur geworden cultuur slaat de reactie in betrekkelijk korten tijd weder in een alkalische om en wel door snellere oxydatie der N-houdende stoffen (ROUX).

Wat de gifproductie van den diphtheriebacil betreft, zoo lijdt het geen twijfel, dat de zure reactie der voedingsvloeistof daarvoor nadeelig is. Zoo lang de zure reactie bestaat, bezit het filtraat der cultuur nagenoeg geen vergiftige eigenschappen. Om snel en zeker een sterk diphtheriegif te verkrijgen, moet dus, in de aller-eerste plaats, op de reactie worden gelet en het zuur worden van den bouillon tegengegaan. Daar om andere, niet nader bekende oorzaken, doch waarschijnlijk in verband staande met de inconstante samenstelling der vleeshextracten, in bouillons daaruit bereid, de gifproductie meestal veel geringer is, dan in bouillons uit rund- en kalfsvleesch vervaardigd, zal men van eerstgenoemde, schoon zij alkalisch blijven, niet met succes gebruik kunnen maken.

Men is dus genoodzaakt met vleeschbouillon te arbeiden en kan nu den schadelijken invloed der zure reactie elimineren, vooreerst door het vleesch oud te laten

worden en ten tweede door aan bouillon, hetzij uit versch vleesch, hetzij uit oud vleesch bereid, carbonas calcicus toe te voegen. Om zeker te gaan verdient het aanbeveling het vleesch oud te laten worden en aan den daaruit bereiden bouillon desniettemin carbonas calcicus toe te voegen. Deze methode verdient de voorkeur boven die, welke de ingetreden zure reactie snel neutraliseert door toevoer van lucht en wel om deze reden, dat de lucht de werkzaamheid van het diphtheriegif vermindert.

Om die reden ook is het waarschijnlijk, dat een diphtheriecultuur onder waterstof gekweekt een sterk giftig filtraat zoude leveren, indien men slechts den diphtheriebacil onder die omstandigheden krachtig konde laten groeien.

Het bovenstaande geeft een plausiebele verklaring van de vroeger besproken tegenstrijdige resultaten, welke verschillende betrouwbare onderzoekers bij de gifbereiding hadden verkregen.

Vooreerst is de sterke gifproductie, welke in de inleiding is vermeld, zeer zeker te wijten aan het feit, dat de gebezigde bouillon door cultuur van den diphtheriebacil niet zuur werd gemaakt.

Evenzoo zijn de schijnbaar zoo onverklaarbare resultaten, welke KUPRIANOW verkreeg, ons duidelijk. Immers hij constateerde de sterkste gifproductie in den bouillon, die oorspronkelijk een vrij sterk alkalische reactie bezat, terwijl in zijn andere bouillons, die aanvankelijk neutraal of zuur reageerden, resp. een veel zwakker of in het geheel geen gif werd gevormd. KUPRIANOW gebruikte bouillons, die zonder toevoeging

van glucose werden vervaardigd; hij had dus bij die proeven den bouillon toevallig bereid uit vleesch, waarin zeer weinig of geen glucose voorkwam. Het vermoeden, dat hij opperde naar aanleiding van bovengenoemd resultaat, namelijk, dat afgezien van de virulentie der cultuur, de graad van alcaliciteit van den bouillon het voornaamste moment bij de gifproductie zoude zijn, heb ik dus in zooverre bewaarheid gevonden.

Dat KUPRIANOW in een bouillon, welke schijnbaar geheel op dezelfde wijze was bereid als die, waarin hij vroeger zoo sterke gifproductie kon constateeren, bij een tweede proef slechts een veel zwakker gif kon verkrijgen, is ook weer te verklaren door aan te nemen, dat hij, in dit laatste geval, toevalligerwijze vleesch met een betrekkelijk hoog glucosegehalte voor zijn bouillonbereiding bezigde.

Blijkbaar zijn ook de ongunstige resultaten, die BEHRING bij zijn gifbereiding in het groot verkreeg, hieraan te wijten, dat hij niet heeft gelet op de reactie zijner cultures. Volgens onze bevindingen is de zure reactie van de overgrootste meerderheid dier cultures, wel waarschijnlijk de oorzaak, dat daarin geen gif werd gevormd, dat de sterkte van zijn normaalgif bereikte.

Wat betreft de resultaten, die in het laboratorium alhier waren verkregen bij toepassing van de door Roux aanbevolen methode om een sterke gifproductie te verkrijgen, welke resultaten, zooals ik in de inleiding heb vermeld, geheel in strijd waren met die van Roux, zoo wil ik in de eerste plaats herinneren aan den verzwakkenden invloed van den ruimen luchttoevoer op de werkzaamheid van het diphtheriegif. Immers het is

bekend, dat het diphtheriegif veel van zijn kracht verliest, wanneer het geruimen tijd in contact blijft met de lucht. In de tweede plaats dient men ook te letten op den voordeelingen invloed, die de methode kan hebben, omdat, door de meerdere oxydatie van N-houdende stoffen in de cultuur, een sterkere alkaliproductie en aldus een sneller omslag van een eventuëel ontstane zure reactie plaats grijpt. In hoofdzaak moet dan ook door den korten duur der zure reactie, de sterke gifproductie, welke Roux met zijn methode verkrijgt, worden verklaard. Het is echter duidelijk, dat in cultures, waarin de diphtheriebaeil geen zuur vormt, ook de bovengenoemde voordeelige invloed van den ruimen luchttoevoer zich niet kan doen gelden. Integendeel, in zulke cultures moet men den nadeligen invloed, namelijk het vernietigen van het gif door het ruime contact met de lucht, in zijn volle kracht waarnemen. Wanneer men nu onderstelt, dat in de cultures, die voor de proef in de inleiding vermeld dienden, de diphtheriebaeil geen zuur produceerde, dan kan men begrijpen, waarom in dit geval de volgens Roux's methode behandelde cultures een zwakkere giftigheid vertoonden, dan die, waarover geen lucht werd gevoerd. Het was inderdaad geconstateerd, dat beide soorten van cultures na korten tijd alkalisch reageerden.

Zoo ben ik dus door mijne uitkomsten in staat de soms zoo tegenstrijdige resultaten te verklaren van alle vroeger genoemde onderzoekers, behalve die van SCHEURLÉN.

Al mijne bevindingen zijn in lijnrechte tegenspraak

met de opvatting van SCHEURLEN, zoowel wanneer hij meent, dat de toevoer van lucht in het geheel geen invloed heeft op de gifproductie, als wanneer hij zegt, dat de cultures juist zuur moeten reageeren om een hoogen graad van giftigheid te bezitten.

**Protocol A.**

Proeven met de filtraten van cultures in denzelfden kalfsvleesch-  
Vergelijk

Cavia n <sup>o</sup> .	Gewicht.	Datum van injectie.	T O X I N E.	Dosis 0,3 pro kilo cavia.
1.	250 grm.	5 Maart '95 5 n. m.	filtraat der cultuur in bouillon, waaraan toegevoegd: 0,01 % glucose. 19 dagen oud.	0,075
2.	405 grm.	5 Maart '95 5 n. m.	filtraat der cultuur in bouillon, waaraan toegevoegd: 0,01 % glucose. 19 dagen oud.	0,121
3.	265 grm.	5 Maart '95 5 n. m.	filtraat der cultuur in bouillon, waaraan toegevoegd: 0,1 % glucose. 19 dagen oud.	0,079
4.	180 grm.	5 Maart '95 5 n. m.	filtraat der cultuur in bouillon, waaraan toegevoegd: 0,6 % glucose. 19 dagen oud.	0,054

bouillon, waaraan toegevoegd: 0,01 %, 0,1 %, resp. 0,6 % glucose.  
proef IV en V.

**R E S U L T A A T.**

- 6 Maart, lichte zwelling op de plaats van injectie. gew. 265 grm.  
7 » sterke zwelling, gew. 250 grm.  
9 » » » gew. 270 grm.  
9 » lichte zwelling, necrose, gew. 280 grm.  
10 » » » » gew. 290 grm.  
11 » necrose, gew. 290 grm.  
13 » beginnende demarkatie, gew. 290 grm.  
Het necrotisch gedeelte werd later afgestooten en de cavia bleef gezond.
- 6 Maart, vrij sterke zwelling op de plaats van injectie. gew. 415 grm.  
7 » sterke zwelling, gew. 395 grm.  
8 » » » gew. 400 grm.  
9 » vrij sterke zwelling, necrose, gew. 400 grm.  
10 » lichte zwelling, necrose, gew. 400 grm.  
11 » necrose, gew. 405 grm.  
14 » beginnende demarkatie, gew. 425 grm.  
Het necrotisch gedeelte stoot zich later af en de cavia blijft gezond.
- 6 Maart, lichte zwelling op de plaats van injectie, gew. 280 grm.  
7 » sterke zwelling, gew. 265 grm.  
8 » sterke zwelling, lichte necrose, gew. 290 grm.  
9 » lichte zwelling, necrose, gew. 305 grm.  
10 » » » » gew. 300 grm.  
11 » necrose, gew. 300 grm.  
13 » beginnende demarkatie, gew. 310 grm.  
Het necrotisch gedeelte stoot zich later af en de cavia blijft gezond.
- 6 Maart, zeer lichte zwelling, gew. 195 grm.  
7 » geen zwelling, gew. 195 grm.  
8 » » » gew. 215 grm.  
De cavia vertoonde verder ook geen zwelling of necrose en bleef gezond.

**Protocol B.**

Proeven met de filtraten van cultures in bouillons bereid uit:  
zoutoplossing. Vergelijk

Cavia n°.	Gewicht.	Datum van injectie.	T O X I N E.	Dosis 0,3 pro kilo cavia.
5.	270 grm.	26 Febr. '95 4 n. m.	filtraat der cultuur in <i>Liebig</i> - bouillon. 19 dagen oud.	0,081
6.	210 grm.	26 Febr. '95 4 n. m.	filtraat der cultuur in <i>Kemmerich</i> - bouillon. 19 dagen oud.	0,053
7.	215 grm.	26 Febr. '95 4 n. m.	filtraat der cultuur in <i>Cibils</i> - bouillon. 19 dagen oud.	0,064
8.	215 grm.	26 Febr. '95 4 n. m.	filtraat der cultuur in pepton- keukenzoutoplossing. 19 dagen oud.	0,064

Liebig-, Kemmerich- en Cibils-vleeschextract en in pepton-keuken-  
proef VII.

**R E S U L T A A T.**

- 27 Febr., geringe zwelling op de plaats van injectie, gew. 280 grm.  
28 » flinke zwelling, gew. 280 grm.  
1 Maart, » » gew. 290 grm.  
2 » lichte zwelling, necrose, gew. 300 grm.  
3 » » » gew. 300 grm.  
4 » necrose, gew. 310 grm.  
9 » beginnende demarkatie, gew. 310 grm.  
Het necrotisch gedeelte wordt later afgestooten en het dier blijft gezond.
- 27 Febr., zeer lichte zwelling op de plaats van injectie, gew. 220 grm.  
28 » sterke zwelling, gew. 205 grm.  
1 Maart, » » gew. 200 grm.  
2 » vrij sterke zwelling, necrose, gew. 200 grm.  
3 » lichte zwelling, necrose, gew. 200 grm.  
4 » necrose, gew. 195 grm.  
5 » » Dier is ziek, gew. 190 grm.  
6 » Het dier wordt 's morgens dood gevonden, gew. 185 grm.  
*Section:* diepgaande necrose op de plaats van injectie. Geen peritonitis, geen exsudaat in de borstholte, alle organen normaal.
- 27 Febr., zeer lichte zwelling op de plaats van injectie, gew. 225 grm.  
28 » sterke zwelling, gew. 225 grm.  
1 Maart, » » gew. 230 grm.  
2 » vrij sterke zwelling, necrose, gew. 200 grm.  
3 » » » gew. 190 grm.  
4 » necrose, gew. 190 grm.  
5 » » Dier is ziek, gew. 185 grm.  
6 » » Dier is ziek, gew. 170 grm.  
Het dier sterft 's avonds.  
*Section:* diepgaande necrose, geen peritonitis, geen exsudaat in de borstholte, alle organen normaal.
- 27 Febr., zeer lichte zwelling op de plaats van injectie, gew. 235 grm.  
28 » geen zwelling, gew. 240 grm.  
1 Maart, » » gew. 250 grm.  
2 » » » gew. 255 grm.  
Het dier gaat ook verder geen zwelling en necrose vertoonen en blijft gezond.

**Protocol C.**

102

Proeven met het filtraat van 45 dagen oude cultures in denzelfden

Cavia n <sup>o</sup> .	Gewicht.	Datum van injectie.	T O X I N E.	Dosis 0,3 pro kilo cavia.
9.	400 grm.	25 April '95 12 m.	filtraat der onder elkaar gec- mengde cultures in bouillon- Kemmerich. 45 dagen oud.	0,120
10.	415 grm.	25 April '95 12 m.	filtraat der onder elkaar gec- mengde cultures in bouillon- Kemmerich. 45 dagen oud.	0,124

103

bouillon bereid uit Kemmerich-vleesextract.

**R E S U L T A A T.**

- 26 April, duidelijke zwelling op de plaats van injectie, gew. 370 grm.  
 27 » flinke zwelling, gew. 340 grm. Dier is stil.  
 28 » » » Het dier is ziek, gew. 325 grm.  
 29 » » » Het dier is zeer ziek, gew. 320 grm.

Sterft 's namiddags ten 3 ure.

*Sectie:* pleuritis serosa. Hyperaemia gland. supraren. Vrij sterk oedeem op de plaats van injectie, overigens alle organen normaal.

- 26 April, duidelijke zwelling op de plaats van injectie, gew. 385 grm.  
 27 » flinke zwelling. Dier is stil, gew. 345 grm.  
 28 » » » Dier is ziek, gew. 325 grm.  
 29 » wordt 's morgens dood in het hok gevonden, gew. 310 grm.

*Sectie:* als van cavia n<sup>o</sup>. 9.

**Protocol D.**

104

Proeven met de filtraten van cultures in denzelfden bouillon uit:

Cibils-vleeschextract, maar op verschillende tijden gefiltreerd.

Cavia n <sup>o</sup> .	Gewicht.	Datum van injectie.	T O X I N E.	Dosis 0,3 pro kilo cavia.	R E S U L T A A T.
11.	400 grm.	30 Maart '95 4,30 n. m.	filtraat van een cultuur in bouil- lon-Cibils. 16 dagen oud.	0,120	31 Maart, weinig zwelling op de plaats van injectie 1 April, zeer weinig zwelling. 2 » geen zwelling. Het dier bleef gezond.
12.	465 grm.	9 April '95 12 m.	filtraat van een cultuur in bouil- lon-Cibils. 28 dagen oud.	0,139	10 April, duidelijke zwelling op de plaats van injectie, gew. 450 grm. 11 » » » gew. 440 grm. 12 » » » necrose, gew. 445 grm. Het necrotisch gedeelte werd later afgestooten en het dier genees.
13.	340 grm.	4 Mei '95 10,30 v. m.	filtraat van een cultuur in bouil- lon-Cibils. 51 dagen oud.	0,102	5 Mei, duidelijke zwelling op plaats van injectie, gew. 340 grm. 6 » sterke zwelling, gew. 335 grm. 7 » zwelling, necrose, gew. 320 grm. Het necrotisch gedeelte werd later afgestooten en het dier genees.

105

## Protocol E.

Proeven met de filtraten van cultures in Liebig-  
Vergelijk

Cavia n°.	Gewicht.	Datum van injectie.	T O X I N E.	Dosis 0,3 pro kilo cavia.
14.	465 grm.	28 Maart '95 3 n. m.	filtraat der cultuur in Liebig- bouillon aan de lucht. 19 dagen oud.	0,139
15.	525 grm.	28 Maart '95 3 n. m.	filtraat der cultuur in Liebig- bouillon, welke gedur. 16 dagen onder II had gestaan. 19 dagen oud.	0,157
16.	470 grm.	30 Maart '95 12 m.	filtraat der cultuur in Liebig- bouillon, welke gedur. 18 dagen onder II had gestaan. 19 dagen oud.	0,141

bouillon aan de lucht en onder waterstof.  
proef XII.

## R E S U L T A A T.

29 Maart, vrij sterke zwelling op de plaats van injectie, gew. 415 grm.

30 » flinke zwelling. Het dier is ziek, gew. 380 grm.

31 » » » Het dier is zeer ziek, gew. 365 grm.

Sterft 's namiddags ten 4 ure.

*Sectie:* pleuritis serosa. Hyperaemia gland. supraren. Vrij sterk oedem op de plaats van injectie, overigens alle organen normaal.

29 Maart, geen zwelling, gew. 475 grm.

30 » » » gew. 510 grm.

31 » » » gew. 530 grm.

De cavia blijft gezond.

31 Maart, geen zwelling, gew. 465 grm.

1 April, » » gew. 465 grm.

De cavia blijft gezond.

**Protocol F.**

Proeven met de filtraten van cultures in bouillon bereid uit  
Vergelijk

Cavia n°.	Gewicht.	Datum van injectie.	T O X I N E.	Dosis 0,3 pro kilo cavia.
17.	395 grm.	22 April '95 11,30 v. m.	filtraat der cultuur in bouillon bereid uit <i>versch</i> rundvleesch. 22 dagen oud.	0,120
18.	395 grm.	22 April '95 11,30 v. m.	filtraat der cultuur in bouillon bereid uit <i>oud</i> rundvleesch. 21 dagen oud.	0,120
19.	580 grm.	25 April '95 12 m.	hetzelfde filtraat als cavia n°. 18, nadat het gedurende één half uur in kokend water was gedompeld.	3,0

versch en in bouillon bereid uit oud rundvleesch.  
proef XIII.

## R E S U L T A A T.

- 23 April, geen zwelling, gew. 410 grm.  
 24 » zeer lichte zwelling, gew. 400 grm.  
 25 » » » » gew. 410 grm.  
 26 » » » » gew. 400 grm.  
 27 » oppervlakkige necrose, gew. 400 grm.  
 Het necrotisch gedeelte stoot zich weldra af en de cavia blijft gezond.
- 23 April, geringe zwelling. Het dier is ziek, gew. 350 grm.  
 24 » Het dier wordt 'smorgens dood gevonden, gew. 300 grm.  
*Sectie:* licht oedem op de plaats van injectie.  
 In beide pleuraholten veel licht haemorrhagisch vocht.  
 De beide bijnieren zijn sterk hyperaemisch. Overigens alle organen normaal.
- 26 April, zeer lichte zwelling, gew. 580 grm.  
 27 » » » » gew. 580 grm.  
 28 » » » » gew. 580 grm.  
 29 » geen zwelling, gew. 550 grm.  
 Het dier gaat ook verder geen zwelling vertoonen en blijft gezond.

**Protocol G.**

Proeven met de filtraten van cultures in kalfsvleeschbouillon en in met carb. en sulf. calc., — met carb. calc. onder waterstof.

Cavia n <sup>o</sup> .	Gewicht.	Datum van injectie.	T O X I N E	Dosis 0,3 pro kilo cavia.
20.	480 grm.	29 April '95 5 n. m.	filtraat der cultuur in kalfsvleeschbouillon. 20 dagen oud.	0,144
21.	480 grm.	29 April '95 5 n. m.	filtraat der cultuur in kalfsvleeschbouillon met sulf. calc. 20 dagen oud.	0,144
22.	505 grm.	29 April '95 5 n. m.	filtraat der cultuur in kalfsvleeschbouillon met carb. calc. 20 dagen oud.	0,151
23.	520 grm.	29 April '95 5 n. m.	filtraat der cultuur in kalfsvleeschbouillon met carb. en sulf. calc. 20 dagen oud.	0,156
24.	520 grm.	29 April '95 5 n. m.	filtraat der cultuur in kalfsvleeschbouillon met carb. calc., welke gedur. 19 dagen onder H had gestaan. 20 dagen oud.	0,156

denzelfden kalfsvleeschbouillon, met carb. calc., — met sulf. calc., —  
Vergelijk proef XV.

**R E S U L T A A T.**

- 30 April, zeer lichte zwelling op de plaats van injectie, gew. 460 grm.  
1 Mei, » » » gew. 450 grm.  
2 » geen zwelling, gew. 470 grm.  
Het dier gaat ook verder geen zwelling meer vertoonen en blijft gezond.
- 30 April, zeer lichte zwelling, gew. 470 grm.  
1 Mei, » » » gew. 490 grm.  
2 » geen zwelling, gew. 500 grm.  
Het dier gaat ook verder geen zwelling meer vertoonen en blijft gezond.
- 30 April, geringe zwelling. Het dier is ziek, gew. 470 grm.  
1 Mei. Het dier wordt 's morgens vroeg dood gevonden, gew. 410 gram.  
*Section:* gering oedeem op de plaats van injectie.  
In beide pleuraholten veel heldere vloeistof. Sterk hyperaemische bijuieren.  
Overigens alle organen normaal.
- 30 April, zeer lichte zwelling, gew. 510 grm.  
1 Mei, lichte zwelling, gew. 500 grm.  
2 » » » gew. 515 grm.  
3 » » » gew. 505 grm.  
4 » zeer lichte zwelling, necrose, gew. 520 grm.  
5 » necrose, gew. 515 grm.  
Het necrotisch gedeelte stoot zich later af en de cavia blijft gezond.
- 30 April, zeer lichte zwelling, gew. 510 grm.  
1 Mei, lichte zwelling, gew. 500 grm.  
2 » » » gew. 505 grm.  
3 » » » gew. 515 grm.  
4 » necrose, gew. 515 grm.  
Het necrotisch gedeelte stoot zich later af en de cavia blijft gezond.

## Protocol H.

Proeven met de filtraten van cultures in Cibels-bouillon en in met carb. en sulf. calc., -- met carb. calc. onder waterstof.

Cavia n <sup>o</sup> .	Gewicht.	Datum van injectie.	T O X I N E.	Dosis 0,3 pro kilo cavia.
25.	490 grm.	1 Mei '95 3 n. m.	filtraat der cultuur in Cibils-bouillon. 21 dagen oud.	0,147
26.	430 grm.	1 Mei '95 3 n. m.	filtraat der cultuur in Cibils-bouillon met sulf. calc. 21 dagen oud.	0,129
27.	530 grm.	1 Mei '95 3 n. m.	filtraat der cultuur in Cibils-bouillon met carb. calc. 21 dagen oud.	0,159
28.	540 grm.	1 Mei '95	filtraat der cultuur in Cibils-bouillon met carb. en sulf. calc. 21 dagen oud.	0,162
29.	520 grm.	1 Mei '95 3 n. m.	filtraat der cultuur in Cibils-bouillon, welke gedur. 20 dagen onder H had gestaan. 21 dagen oud.	0,156

denzelfden Cibels-bouillon met carb. calc., -- met sulf. calc., --  
Vergelijk proef XV.

## R E S U L T A A T.

2 Mei, zeer geringe zwelling op de plaats van injectie, gew. 480 grm.

3 » Het dier wordt 's morgens dood gevonden, gew. 460 grm.

*Sectie:* Zeer weinig oedeem op de plaats van injectie. Veel heldere vloeistof in de pleuraholten. Geen hyperaemie der bijniere. Zeer sterk door gas uitgezette maag.

2 Mei, geen zwelling, gew. 435 grm.

3 » » » gew. 405 grm.

4 » » » Het dier is ziek, gew. 400 grm.

5 » » » » » » gew. 380 grm.

6 » Het dier wordt 's morgens dood gevonden, gew. 380 grm.

*Sectie:* Geen oedeem op de plaats van injectie. De peritoneaalholte en de beide pleuraholten bevatten zeer veel, sterk haemorrhagische vloeistof. Op de plaats van injectie aan het peritoneum parietale vindt men een afzetting van fibrine. De bijniere zijn licht hyperaemisch, de niere bleek. Het filtraat schijnt direct in de peritoneaalholte gespoten te zijn.

2 Mei, geringe zwelling, gew. 530 grm.

3 » sterke zwelling, gew. 480 grm.

4 » » » gew. 455 grm.

5 » geringe zwelling, necrose, gew. 430 grm.

6 » geringe zwelling, necrose, gew. 410 grm.

8 » Het dier wordt 's morgens dood gevonden, gew. 380 grm.

*Sectie:* Diep gaande necrose op de plaats van injectie. Geen vloeistof in pleura- en peritoneaalholten. Geen hyperaemische bijniere.

2 Mei, geen zwelling, gew. 555 grm.

3 » » » gew. 580 grm.

Het dier gaat ook verder geen zwelling vertoonen en blijft gezond.

2 Mei, geen zwelling, gew. 540 grm.

3 » lichte zwelling, gew. 545 grm.

4 » » » gew. 545 grm.

5 » » » gew. 560 grm.

6 » geen zwelling, gew. 580 grm.

De cavia gaat ook verder geen zwelling vertoonen en blijft gezond.

## Protocol I.

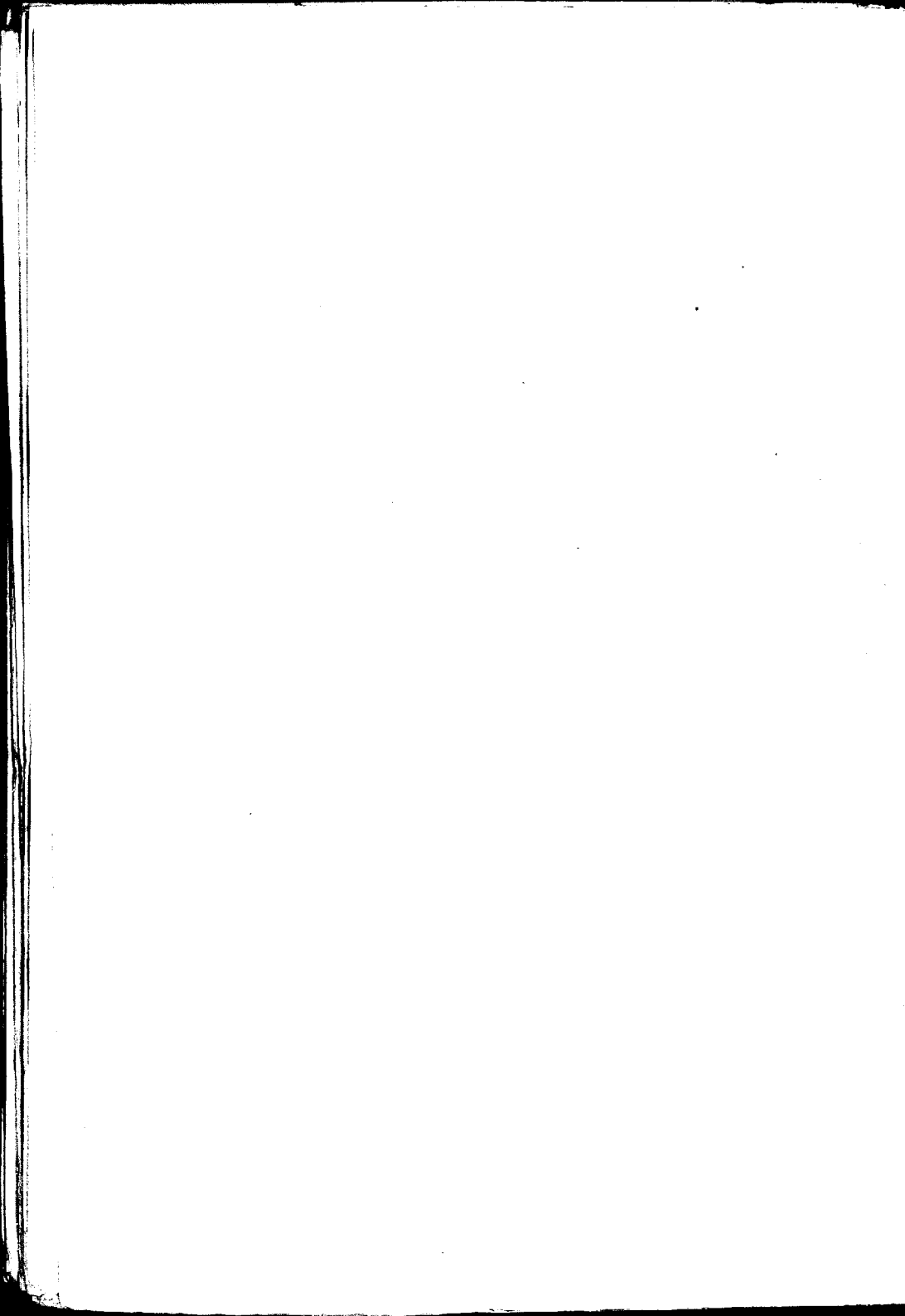
Proeven met de filtraten van cultures in bouillon bereid uit

Cavia n <sup>o</sup> .	Gewicht.	Datum van injectie.	T O X I N E.	Dosis.
30.	660 grm.	28 Mei '95 11 v. m.	filtraat der cultuur in bouillon uit oud rundvleesch met carb. calc.  24 dagen oud.	0,3 pro kilo = 0,198
31.	535 grm.	4 Juni '95	filtraat der onder elkaar gemengde cultures in bouillon uit oud rundvleesch met carb. calc.  31 dagen oud.	0,2 pro kilo = 0,107
32.	540 grm.	4 Juni '95	hetzelfde filtraat als cavia n <sup>o</sup> . 31.	0,1 pro kilo = 0,054

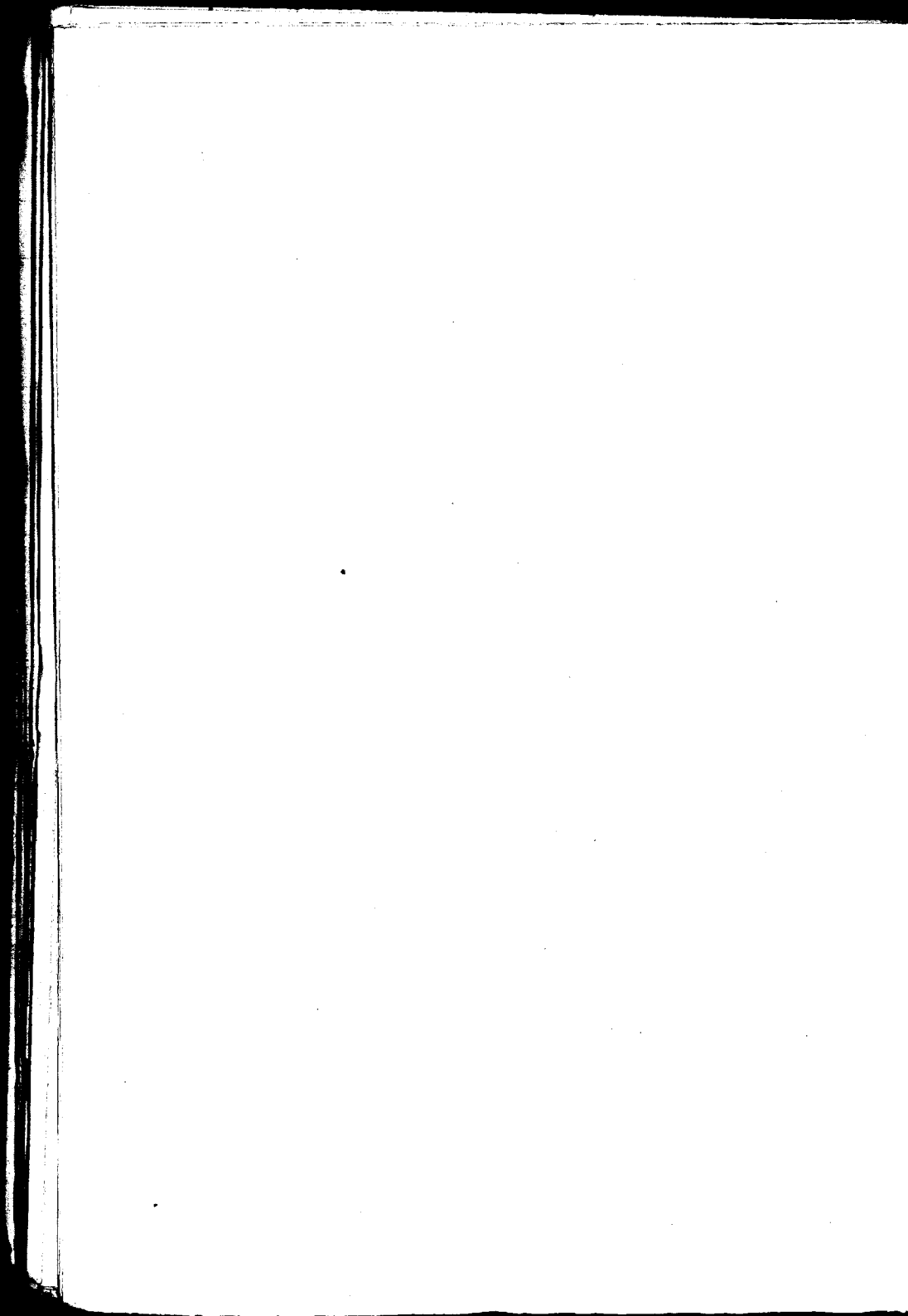
oud rundvleesch, waaraan carbonas calcicus was toegevoegd.

## R E S U L T A A T.

- 29 Mei, weinig zwelling op de plaats van injectie, gew. 610 grm.  
Het dier, dat den geheelen dag al ziek was, sterft 's avonds tegen 6 ure.  
*Sectie:* Pleuritis serosa Hyperaemia + haemorrhagia gland. supraren. Licht oedeem.
- 5 Juni, duidelijke zwelling. Het dier is ziek, gew. 525 grm.  
6 » » » » » » gew. 510 grm.  
1,45 n. m. wordt het stervende gevonden.  
2,30 n. m. Het dier ligt dood in het hok.  
- *Sectie:* Pleuritis serosa. Hyperaemia + haemorrhagia gl. supraren. Oedeem.
- 5 Juni, duidelijke zwelling. Het dier is ziek, gew. 560 grm.  
6 » » » » » » gew. 540 grm.  
7 » » » » » » gew. 510 grm.  
8 » » » » » » gew. 495 grm.  
9 » Het dier sterft in den voormiddag, gew. 480 grm.



STELLINGEN.



# STELLINGEN.

---

## I.

Het onderscheiden van diphtherische en diphtheroïde slijmvliesaandoeningen op grond van het bacteriologisch onderzoek is voorhands gevaarlijk en dus te verwerpen.

## II.

Koorts en leucocytose bij infectieziekten zijn als verdedigingsmiddelen van het organisme tegen de infectie op te vatten.

## III.

De meening van CHATENAY, volgens welke bij inspuiting van diphtheriegif bij konijnen en cavia's het aantal leucocyten constant progressief zou dalen tot aan den dood van het dier, is, wat konijnen betreft, niet juist.

## IV.

De genezing van lues blijkt helaas alleen uit een nieuwe luetische infectie.

## V.

Aderlating is een machtig, soms levensreddend therapeuticum, in het bijzonder in zekere gevallen van pneumonie. Dat het meerendeel van de medici onzer dagen hare waarde niet kent of minacht is te betreuren.

## VI.

In vele opzichten wordt men omtrent de functie van het hart voortreffelijk ingelicht door de studie van den venapols, vaak beter dan door die van den arteriepols. Daarbij verdient aanbeveling de onderscheiding van een auriculair en een ventriculaire venapols.

## VII.

„J'inclinerais à penser que le bromure de potassium doit rester pour ainsi dire un aliment pour l'épileptique qu'il a guéri, ou dont il a suspendu la maladie.”  
(VORSIN. De l'emploi du bromure de potassium dans les maladies nerveuses).

## VIII.

Het afvloeien van meconium mag ook bij hoofd- en dwarsligging niet zonder meer als een teeken van dreigende of bestaande asphyxie van het kind opgevat worden.

## IX.

Het onderzoek per vaginam bij parturientes beperken tot die gevallen, waar door uitwendig onderzoek of door onderzoek per rectum het doel niet wordt bereikt.

## X.

Bij de behandeling van perforerende wonden der borstholte immobiliseere men allereerst absoluut.

## XI.

De operatiemethoden bij strictura urethrae, genaamd: „Cathétérisme forcé” en „gewaltsame Dilatation” zijn geheel te verwerpen.

## XII.

Dat de z. g. vermoeidheid van de retina zou zijn te beschouwen niet als een gevolg van een alteratie dezer laatste, maar van den lobus occipitalis der hersenen, zooals SCHIELE beweert, is door hem niet bewezen.

## XIII.

Uraemie ontstaat door retentie van toxische stoffen en door suppressie of vermindering van de „Sécrétion interne” der nieren.

## XIV.

Dat de extirpatie der bijnieren zou dooden door intoxicatie is onwaarschijnlijk.

## XV.

De bij iritis, als ook de bij diabetes somwijlen voorkomende myopie is zeer goed te verklaren uit een toename van den brekingsindex van het waterachtig vocht.

## XVI.

Indien eenigszins mogelijk, verrichte men een optische iridectomie aan de temporale zijde.

## XVII.

Het aannemen van een ontstaan van cellen uit tusschenstof is een schrede achterwaarts.

## XVIII.

De macroscopisch zichtbare karteling, de z. g. ora serrata vormende, ontstaat gedurende het extrauterine leven.

## XIX.

Het weefsel der Zonula Zinnii behoort tot het netvlies.

## XX.

De door DUBOIS beschreven „*Pithecanthropus erectus*” heeft uit een vergelijkend anatomisch oogpunt niet die beteekenis, welke de schrijver hem toekent.

## XXI.

Dat het licht de hoofdoorzaak zoude zijn van de spontane reiniging der rivieren, zooals BUCHNER beweert, is zeer onwaarschijnlijk.

## XXII.

Bij de uitbreiding van infectieziekten zijn niet alleen van invloed: plaatselijke en tijdelijke geschiktheid in den zin der localisten, maar ook vele andere factoren, als daar zijn: verkeer, levenswijze en graad van immuniteit.

## XXIII.

Poklijders behandelde men in een ziekenkamer, waarin slechts roode lichtstralen worden toegelaten.

## XXIV.

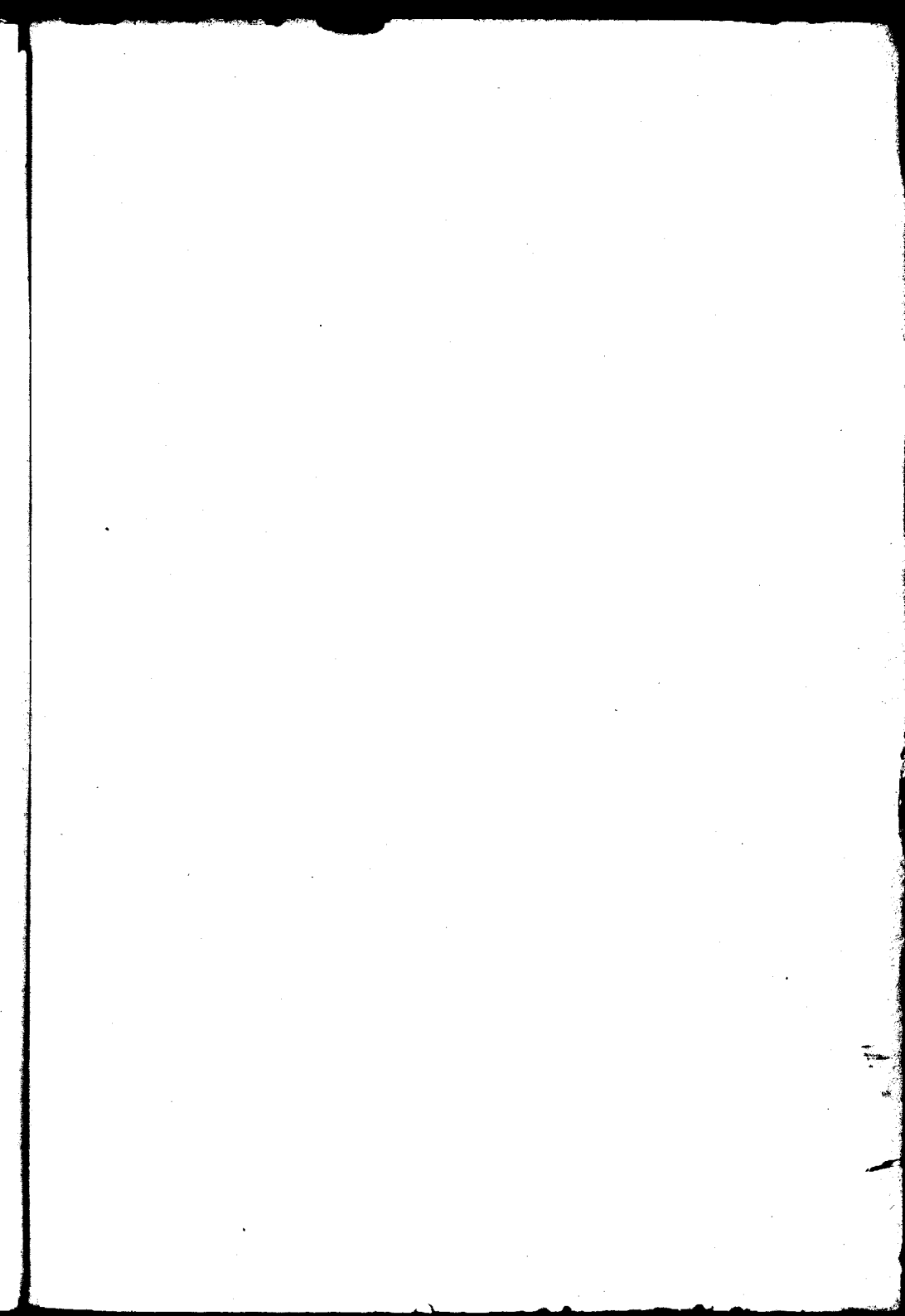
De retromediastinale ecchymosen hebben voor de diagnose van den dood door stikking geen beteekenis. Zij zijn kunstproducten door de obductie ontstaan.

## XXV.

„Es kann von moralischem Irrsinn nur dann gesprochen werden, wenn die durch verbrecherische Handlungen sich documentirende moralische Gefühllosigkeit sich auf eine pathologische Ursache, respective auf eine fehlerhafte psychische Organisation zurückführen lässt“ (v. HOFMANN. Gerichtliche Medicin).



16891



1878