



Over antagonisme van den bacillus pyocyaneus

<https://hdl.handle.net/1874/276950>

1922

OVER ANTAGONISME
VAN DEN
BACILLUS PYOCYANEUS

DOOR
J. A. GUNST



UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK UTRECHT



3627 5042



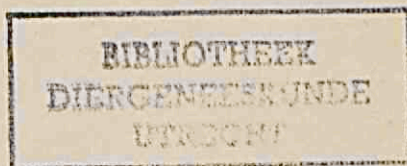
OVER ANTAGONISME
VAN DEN BACILLUS PYOCYANEUS

OVER ANTAGONISME VAN DEN BACILLUS PYOCYANEUS

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD
VAN DOCTOR IN DE VEEARTSENIJKUNDE AAN DE
VEEARTSENIJKUNDIGE HOOGESCHOOL TE
UTRECHT, NA MACHTIGING VAN DEN RECTOR-
MAGNIFICUS DR. H. M. KROON, VOLGENS BESLUIT
VAN DEN SENAAT DER VEEARTSENIJKUNDIGE
HOOGESCHOOL, TE VERDEDIGEN TEGEN DE BE-
DENKINGEN VAN DEN SENAAT OP WOENSDAG
28 JUNI 1922, DES NAMIDDAGS 2½ UUR DOOR

JOHANNES ANDREAS GUNST

VEEARTS TE AMSTERDAM, GEBOREN
TE AMSTERDAM



A. H. KRUYT — UITGEVER — AMSTERDAM



*AAN MIJNE VROUW
EN MIJN KIND*

De aanbieding van dit proefschrift geeft mij de gelegenheid mijn hartelijken dank te betuigen aan U Professor Poels, Hooggeachten Promotor, voor de gelegenheid mij geboden in Uw Instituut dit proefschrift te bewerken, voor den steun, die ik daarbij van U heb mogen ondervinden en voor de welwillendheid, waarmede U heeft voldaan aan mijn verzoek mijn promotor te willen zijn.

Aan U, Hooggeschatten van Straaten betuig ik mijn groote erkentelijkheid voor de bereidwilligheid, waarmede Gij mij steeds met raad en daad terzijde hebt gestaan en voor de belangstelling, die Gij steeds voor mijn werk hebt getoond. De tijd doorgebracht in Uw laboratorium zal mij steeds in aangename herinnering blijven.

Tevens is het mij een aangename plicht, U Professor Kroon te danken voor de voortvarende wijze, waarop U mijne belangen heeft voorgestaan en U, Hooggeleerden, waarmede ik in het afgelopen jaar het genoeg had, nader kennis te maken, voor de welwillendheid, waarmede U steeds bereid waart mij Uwe voorlichting te verleen.

Tenslotte een woord van welgemeende erkentelijkheid aan U Zeergeleerde Heeren, Bacteriologen en Chefs van afdelingen aan de Rijks-seruminrichting voor de medewerking, die ik steeds van U mocht ondervinden.

INHOUD

I.	INLEIDING	3
II.	HISTORISCH OVERZICHT.....	6
III.	B. PYOCYANEUS	15
IV.	CULTUURPROEVEN	20
	1. AGARCULTUREN	20
	2. BOUILLONCULTUREN	32
	3. GEMENGDE CULTUREN.	41
V.	PROEVEN MET GEDOODE PYOCYANEUS- BACILLEN	45
VI.	DIERPROEVEN	48
VII.	PYOCYANASE	66
VIII.	CONCLUSIES	96
IX.	LITERATUUR	98

I

INLEIDING

Onder *antagonisme* van bacteriën heeft men te verstaan den ontwikkeling-remmenden invloed door de eene bacteriesoort op de andere uitgeoefend, direct of indirect, hetzij in culturen, hetzij in het dierlijk lichaam.

Worden 2 bacteriesoorten in één cultuur samengebracht, dan zal veelal *die* bacterie zich het beste ontwikkelen, voor welke de condities van temperatuur, voedingsstoffen, reactie, vochtrijkdom enz. van den voedingsbodem het gunstigst zijn, terwijl ook het kweken al of niet bij toetreding van lucht van belang zal zijn, naar gelang de bacteriën aëroob of anaëroob groeien. Voor de beoordeeling van de antagonistische werking van de eene bacteriesoort op de andere kan het daarom niet altijd voldoende zijn, twee bacteriesoorten eenvoudig samen te brengen in een cultuurmedium.

Gaat men na of een bacteriesoort een ontwikkeling-remmenden invloed ondervindt in een voedingsbodem, waarin reeds een andere bacterie gegroeid was en daarna er uit verwijderd (b.v. door filtratie), dan kan men niet beoordeelen of de verminderde groei een gevolg is van uitputting van den voedingsbodem, of van het feit, dat

de eerstgegroeide bacterie den bodem minder geschikt heeft gemaakt.

Het aanleggen van evenwijdige streepculturen van verschillende bacteriën op agarplaten brengt moeilijkheden mede; n.l. eenerzijds is overwoekering mogelijk door de snelst groeiende bacteriesoort, als de strepen te dicht bij elkander zijn gemaakt, anderzijds — als de strepen te ver van elkaar verwijderd zijn — kan de eene bacterie wel antagonistisch werkende stoffen vormen, zonder dat deze ver genoeg in de agar doordringen om antagonistisch op de andere bacterie te werken. Ook de methode van gekruiste streepculturen, zooals o.a. werd toegepast door *Sellei* en door *Honecker* (zie hist. overzicht) heeft het nadeel van de mogelijkheid van overwoekering van de eene bacteriesoort door de andere.

In de te beschrijven agarproeven met *B. pyocyaneus* werd een methode toegepast, waarbij de genoemde nadeelen werden ontgaan.

Ook bij de bouillonproeven werd rekening gehouden met de uitputting van den voedingsbodem.

Uit de aangehaalde literatuur krijgt men den indruk, dat proeven over antagonisme van bacteriën slechts zelden werden verricht in agarculturen. De proeven over antagonisme van *B. pyocyaneus* betreffen vnl. onderzoekingen omtrent diens antagonistische eigenschappen ten opzichte van miltvuur.

De Freudenreich experimenteerde weliswaar ten opzichte van een groot aantal bacteriesoorten, doch deze

proeven geven geen duidelijk inzicht in de antagonistische eigenschappen van *B. pyocyaneus*, omdat geen rekening werd gehouden met de uitputting van den voedingsbodem.

Bij de dierproeven werd rekening gehouden met de resultaten van Blagovestchensky, die reeds waarnam, dat de beste resultaten werden verkregen, indien de bacteriën in innig contact met elkander werden gebracht. Ook werd de subcutane methode van infectie verkozen boven de intraperitoneale, omdat de laatste te snel letaal werkt, en de antagonistische werking van *B. pyocyaneus* niet voldoende tot zijn recht kan komen. Vermoedelijk is het geringe succes, dat *Honecker* bij zijn infectieproeven had, toe te schrijven aan het feit, dat hij de intraperitoneale wijze van infectie had verkozen.

Het doel van dit onderzoek zal niet zijn na te gaan, waarop eventueel antagonisme van den *B. pyocyaneus* berust, doch slechts om de antagonistische eigenschappen van dezen bacil te onderzoeken in culturen en met proefdieren, en wel ook ten opzichte van verscheidene bacteriën waaromtrent geen opgave in de literatuur is verstrekt, wat betreft hun verhouding tegenover de antagonistisch werkende stoffen, geproduceerd door *B. pyocyaneus*. Tot deze bacteriën behooren er verscheidene, die voor de veterinaire bacteriologie van speciaal belang zijn. De onderzoekingen van d' Hérèlle, die in de laatste jaren over den bacteriophag bekend geworden zijn, zijn in dit proefschrift buiten beschouwing gebleven.

II

HISTORISCH OVERZICHT

Volgens Gotschlich (Kolle en Wassermann) was *Babés*¹⁾ (1885) de eerste, die schreef over antagonisme van bacteriën, doch reeds in 1877 vermeldt *Pasteur*²⁾, dat miltvuurbacillen, tegelijkertijd met andere bacteriën ingeënt, in het dierlijk lichaam niet tot ontwikkeling komen en geen miltvuur verwekken, en sprak toen reeds de verwachting uit, dat deze aangelegenheid van belang kon zijn uit een oogpunt van therapie.

De eerste, die proeven nam over de antagonistische eigenschappen van *B. pyocyaneus* was *Bouchard*³⁾ (1888). Deze kon konijnen van miltvuurinfectie genezen door levende *Pyocyaneus*culturen rondom de entplaats in te spuiten.

In hetzelfde jaar experimenteerde *de Freudenreich*⁴⁾ uitvoerig over antagonisme van verschillende bacteriën in bouillon. Hij filtreerde bouillonculturen door Chamberlandkaarsen en in de gefiltreerde vloeistof werden opnieuw bacteriën gebracht. Hij merkte op, dat de bouillons, na 8 dagen gefiltreerd, de ontwikkeling der bacteriën minder beletten dan die, gefiltreerd na 4—6 weken. Hij geeft een tabel, samenvattende de resultaten van zijn proeven met 21 bacteriesoorten op bouillonculturen van

13 bacteriesoorten. Hierbij valt op, dat *B. anthracis* (die bij alle in dien tijd genomen proeven een voornamelijke rol speelt) op 12 van de 13 voedingsbodems normaal groeit; alleen op den bodem, waar eerst *V. cholerae asiaticae* was gekweekt, kreeg men vertraging van het begin van den groei. Wat betreft de *B. pyocyaneus*, deze bleek in zijn gefiltreerde bouillonculturen meer antagonistisch-werkende stoffen te vormen dan de meeste andere bacteriën. Het volgende lijstje geeft een overzicht van den groei van de nader te noemen bacteriën op de gefiltreerde P-bouillon.

Staphyl. pyogen. aureus.	zwak
„ „ albus	„
„ „ citreus.	„
„ „ foetidus	„
Micrococcus tetragenes	„
„ prodigiosus	„
„ roseus	„
Bac. du lait bleu	„
„ Pyocyaneus	„
„ Typhi	0
„ Mallei	0
„ Anthracis	+
„ strumite	zwak
„ mégaterium	„
„ Cholerae gallinarum	0
„ Phosphorescens	zwak
„ Pneumoniae Friedländer	„

V. Cholerae asiaticae	0
V. Finkler	0
V. Miller	0
V. Deneke	0

Uit deze tabel blijkt, dat van al de genoemde bacteriën alleen de *B. anthracis* op den pyocyaneusbodem goed groeit.

Ook nam *de Freudenreich* dierproeven, waarbij het hem gelukte met culturen en gesteriliseerde culturen van pyocyaneus een gunstigen invloed op miltvuurinfectie uit te oefenen.

Guignard en Charrin ⁵⁾ gebruikten mengculturen van *B. pyocyaneus* en miltvuur en konden den dood der proefdieren niet tegengaan, wel echter het leven aanzienlijk rekken.

Woodhead en Wood ⁶⁾ gebruikten gesteriliseerde P-culturen en konden hiermede den miltvuurdood der proefdieren verhoeden.

Bouchard ⁷⁾ kon met gesteriliseerde culturen wel eenigen invloed bemerken op de miltvuurinfectie, echter kon hij den dood der proefdieren niet tegengaan.

Blagovestchensky ⁸⁾ bracht *B. pyocyaneus* en *B. anthracis* in de voorste oogkamer van hetzelfde oog van konijnen. Van de 11 stierven er 3 aan miltvuur, 8 herstelden. Het doorstaan van deze infectie gaf geen immuniteit voor een latere infectie met miltvuur.

Geschiedden de injecties van miltvuur en pyocyaneus ieder in een verschillend oog van hetzelfde konijn, dan

was de invloed van P nauwelijks merkbaar. Werden in de voorste oogkamer draadjes gebracht met miltvuursporen en daarna agarcultuur van pyocyaneus, dan konden de miltvuursporen zich niet ontwikkelen tot miltvuurbacillen, werden daarna de draadjes in bouillon gebracht, dan ontwikkelden ze zich wel.

Werd miltvuur en pyocyaneus in de oorvene van een konijn ingespoten, dan werd het ziekteproces vertraagd, maar de dood niet verhinderd. Werden in de voorste oogkamer gebracht 2 of 3 druppels gesteriliseerde P-cultuur en eenzelfde hoeveelheid virulente miltvuurcultuur, of draadjes met miltvuursporen, dan stierven van 8 konijnen op deze wijze behandeld 7.

Van de 6 konijnen, die subcutaan ieder 1 à 2 cc gesteriliseerde P-cultuur en evenveel virulente miltvuurcultuur ontvingen, stierf er een na 23 dagen zonder verschijnselen van miltvuur, de andere 5 bleven leven.

Ook zag B. goed resultaat van injectie van gesteriliseerde bouilloncultuur rondom de miltvuur-entplaats.

Bij samenbrengen in den hangenden druppel van draadjes met miltvuursporen en P-bacillen, ontwikkelden de sporen zich niet.

Volgens B. verzwakt *filtratie* meer de eigenschappen der P-bouillonculturen dan *sterilisatie*. In gesteriliseerde culturen kunnen miltvuursporen niet tot ontwikkeling komen, terwijl ze zich in gefiltreerde in 24 uur tot staafjes ontwikkelen.

Bij samenbrengen *in den hangenden druppel* van milt-

vuurbacillen en gesteriliseerde P-culturen trad degeneratie van de miltvuurbacillen op.

Blagovestchensky concludeert: „Il résulte de toutes ces expériences que le seul voisinage des produits de l'activité vitale des bacilles pyocyaniques, composés d'une sorte de substance volatile, exerce une influence nuisible sur le développement des bactériidies.”

In 1893 vermeldt *Rumpf*⁹⁾ een gunstigen invloed op de temperatuur bij typhus abdominalis door injecties met gesteriliseerde P-culturen.

*Palleoni*¹⁰⁾ komt in verband met zijn proeven tot de conclusie, dat de *B. pyocyaneus* de ontwikkeling van miltvuur kan tegenwerken, echter den letalen afloop niet kan verhinderen.

*Gross en Kraus*¹¹⁾ vinden een sterk remmende en bactericide werking van tweedaagsche P-bouillon en P-agar, voor *gonococcen*.

*Honl en Bakowsky*¹²⁾ vonden in de proteïnen van *B. pyocyaneus* een specificum tegen chronische beenzweren.

*Krause*¹³⁾ infecteerde konijnen met miltvuur en spoot tegelijkertijd intraperitoneaal in: „Presssaft” — onder hoogen druk verkregen — van *B. pyocyaneus*. De dieren bleven in leven. Geschiedde de injectie van het sap 6 uur daarna, dan gelukte het, van de 3 konijnen er 2 te redden.

Bij typhus had Krause geen succes. Wel bij een cavia, die met typhus-toxine was behandeld. — Krause nam bij de injectie van het Pressaft sterke hyperleucocytose waar.

Zanfrognini ¹⁴⁾ deed proeven over den invloed van aërobe bacteriën op den groei van *B. tetani* en vond, dat *B. pyocyaneus* den groei van *B. tetani* tegenging, in tegenstelling met *B. typhi*, *B. coli* en *staphylococcus*, die door onttrekken van zuurstof aan den voedingsbodem den groei van den tetanusbacil bevorderen.

Faltin ¹⁵⁾ deed proeven over antagonisme van bacteriën in urine. Hij kwam tot het resultaat, dat in „Blasenversuche” *coli* en *pyocyaneus* elkander niet kunnen verdringen. In „Flaschenversuche” kan *coli* het leven van *pyocyaneus* verlengen, nooit verkorten. *Pyocyaneus* daarentegen, verkort gewoonlijk het leven van *coli* een weinig. Slechts in zure urine kan hij het leven van *coli* verlengen. In Blasenversuche oefent *pyocyaneus* een geringe remmende werking uit op *staphylococcus*. In Flaschenversuche is een wederzijdsche invloed merkbaar. Toch behaalt de *staphylococcus* steeds de overwinning.

Pyocyaneus kan zich niet ontwikkelen in *staphylococ*-*cen*-urine. Werd de urine geneutraliseerd, dan geschiedde de ontwikkeling wel.

Men heeft hier te doen met een vernietiging van de *Pyocyaneus* door ammoniakalische omzettingsproducten.

B. pyocyaneus kan het leven van *B. proteus* verkorten.

Verder vond *Faltin*, dat P-bouillon-filtraten sterk remmend, zelfs bactericide op *coli* kunnen werken.

Sellei ¹⁶⁾ deed proeven met gekruiste streepculturen van *gonococcus* en *pyocyaneus* en constateerde vermindering van groei bij de kruispunten.

Fortineau ¹⁷⁾ deed proeven met mengculturen van *B. pyocyaneus* en *B. anthracis* in bouillon. In een dergelijke cultuur waren na een maand nog slechts enkele anthrax-bacillen aanwezig en sporulatie had niet meer plaats. Na 2 maanden waren alle miltvuurbacillen gedood. — Van 5 caviae, ingespoten met 0.5 cc van een 2-daagsche miltvuur-pyocyaneuscultuur, stierven er 2 aan miltvuur, 2 bleven leven, 1 stierf na 3 maanden, doch niet aan miltvuur. Hij herhaalde deze proeven telkens met oudere mengculturen. Van 15 aldus geïnfecteerde caviae bleven er 5 in leven, 4 stierven in 2—3 dagen aan miltvuur, 6 stierven tusschen 18 dagen en 3 maanden, doch niet aan miltvuur.

Ook vaccineerde F. konijnen tegen pyocyaneus. Deze dieren bleken 2 maanden na de laatste injectie een miltvuur-infectie te weerstaan.

d'Agata ¹⁸⁾ vond, dat miltvuurbacillen in een pyocyaneus-bouilloncultuur bij 15° C. in een maand, bij 35° in enkele uren te gronde gingen. Werd de P-cultuur 1 uur bij 55° verwarmd, dan bleven de miltvuurbacillen 3 maanden in leven. Miltvuurbacillen uit dergelijke culturen waren niet virulent voor konijnen, wel voor schapen.

Louis en Charles Fortineau ¹⁹⁾ behandelden 50 gevallen van miltvuur bij den mensch met subcutane injecties van gedooide pyocyaneus-culturen. De mortaliteit bedroeg 10%, hierbij dient in aanmerking te worden genomen, dat tal van de behandelde gevallen zeer ernstig en gedeeltelijk gegeneraliseerd waren.

Honecker ²⁰⁾ beproefde eerst een groot aantal bacteriën op hun antagonistische eigenschappen ten opzichte van miltvuurbacillen. Hij maakte daartoe gebruik van agar-platen in Petrischalen, hierop maakte hij telkens 3 evenwijdige strepen met de platina-öse uit een miltvuurcultuur. Van elke te onderzoeken bacteriesoort werden dan, loodrecht op de miltvuurstrepen, eveneens 3 strepen getrokken; in de op deze wijze ontstane 9 kruispunten beoordeelde hij dan de antagonistische werking van de bacteriën na verblijf van 24 en 48 uur in de broedstoof bij 37°.

Met de sterkst antagonistisch op anthrax in agarcultuur werkende bacteriën nam hij daarna dierproeven, eveneens ten opzichte van miltvuur. De grootte van de antagonistische werking op agar was niet evenredig met die in het dierlijk lichaam. De sterkste antagonist was de *B. pyocyaneus*. Levende P-bacillen konden bij prophylactische inspuiting, minstens 40 uur vóór de miltvuurinfectie, den miltvuurdood verhinderen (d.w.z. in 2 gevallen, terwijl in 6 gevallen, waarbij de inspuiting tusschen 24 en 40 uur plaats had de dieren stierven.) Gelijktijdige en therapeutische injecties met P-culturen rekten het leven. Dikwijls was het resultaat van dezelfde proeven bij verschillende dieren verschillend, misschien ligt het aan individueele verschillen bij de dieren, misschien is het een gevolg van onnauwkeurigheid in de doseering.

In de meeste gevallen kreeg *Honecker* slechts een ver-

lenging van het leven der proefdieren, hij kon echter den dood niet verhoeden.

Betere resultaten leden, volgens schrijver, schipbreuk op de te groote giftigheid der antagonistien, zoodat geen voldoende groote dosis kon worden gebruikt om de miltvuur-infectie te onderdrukken. Als proefdieren gebruikte hij slechts witte muizen. De injectie, zoowel van miltvuur- als van de P-bacillen geschiedde steeds intraperitoneaal. De hoeveelheid miltvuuragarcultuur was gewoonlijk $1/200$ öse, die van pyocyaneus varieerde van $0.1-0.01$ öse.

III

B. PYOCYANEUS

Uit de literatuur blijkt, dat er herhaaldelijk verschil van meening bestaat over de eigenschappen, welke karakteristiek moeten zijn voor den *B. pyocyaneus*. Zoo wordt soms als eenig verschil met den *B. fluorescens liquefaciens* aangegeven, dat de laatste *niet-pathogeen* zou zijn, in tegenstelling met den *B. pyocyaneus*.

Andererzijds worden verschillen aangegeven in het aantal *geesels*.

Zoo geeft Burchhardt aan, dat de *B.-pyocyaneus* slechts één geesel bezit, de *B. fluorescens liquefaciens* 2—5 en *B. putidum* meestal 6—12.

Gessard identificeert de bacillen met behulp van bepaalde voedingsbodems en beoordeelt naar de kleurstofvorming.

Hij bereidt 3 voedingsbodems: 1° Bouillon, d.w.z. zuiver vleeschnat. Van één gewichtsdeel vleesch worden twee deelen bouillon bereid, er wordt niets aan toegevoegd, alleen soda om te neutraliseeren.

2°. 2%-peptonwater, neutraal of licht alkalisch.

3°. Glycerine-pepton-agar, nl. bij het 2% peptonwater worden gevoegd: agar 4:100 en glycerine 5:100.

De *bouillon* geeft het middel aan de hand om reeds

dadelijk 4 rassen te onderscheiden. Zijn in de bouillon tezamen een blauwe en een groene kleurstof, dan spreekt Gessard van ras A; is er alleen de blauwe kleurstof, dan spreekt hij van ras P. Indien alleen de groene fluoresceerende kleurstof aanwezig is, heeft men te doen met ras F en bij geen kleurstofvorming met ras S.

In het *peptonwater* kunnen wederom van elk ras 4 variëteiten onderscheiden worden, naarmate in het peptonwater wordt gevormd een *blauwe*, *roodbruine* of *roode* kleurstof of indien er in het *geheel geen* kleurstof wordt gevormd. In de, volgens bovenstaand recept bereide, *agar* moet elke variëteit van den *B. pyocyaneus* *blauwe* kleurstof vormen, gebeurt dit niet, dan is het geen *B. pyocyaneus*.

Wordt dus in bouillon of in peptonwater of in beide reeds blauwe kleurstof gevormd, dan heeft men de peptonglycerine-agar niet meer noodig om den *B. pyocyaneus* te onderkennen. Is dit niet het geval, dan geeft de kleurstofvorming op genoemden agar den doorslag.

Deze voedingsbodems bleken ter identificeering van den *B. pyocyaneus* zeer bruikbaar te zijn.

Alvorens de proeven over antagonisme te beschrijven is het van belang de overtuiging te vestigen, dat deze proeven werkelijk met *B. pyocyaneus* werden genomen.

Er werd gewerkt met 3 stammen, die in den vervolge P1, P2 en P3 zullen worden genoemd.

Alle 3 de stammen hadden de volgende eigenschappen: Het zijn goed beweeglijke, slanke staafjes, die zich

niet kleuren volgens Gram, gelatine vervloeien en geen sporen vormen.

Ze groeien zeer goed op agar, bouillon, serum, melk, aardappel, peptonkeukenzout. In de meeste voedingsbodems wordt een blauwe kleurstof gevormd. Deze treedt vooral op agar duidelijk op. Wordt glycerine toegevoegd, dan komt de blauwe kleur nog beter voor den dag. Zeer fraai is deze kleur op glycerine-aardappel, daarentegen zijn de kolonies op gewonen aardappel meer bruinachtig.

Glycerine-aardappel wordt door Smirnow aanbevolen als voedingsbodem voor *B. pyocyaneus*. Toen, bij de later te beschrijven proeven, stam P1, door langdurig voortkweken, zijn vermogen om kleurstof te vormen had verloren, kwam de kleurstof door cultuur op glycerine-aardappel onmiddellijk weer voor den dag.

De stammen P1 en P3 geleken op de gewone voedingsbodems volkomen op elkaar, wat betreft de kleurstofvorming. Ze gaven op agar na één dag in het bovenste gedeelte een donkergroene kleur, die zich den tweeden dag aan den geheelen voedingsbodem mededeelde; de kleur werd dan gedurende eenige dagen nog donkerder en bevatte veel blauw. De voedingsbodem behield deze kleur soms eenige weken en werd dan meer en meer bruin. P2 daarentegen deelde een meer lichtgroene kleur aan de gewone agar mede, deze kleur werd in de eerste dagen slechts weinig donkerder en begon na vier dagen reeds bruin te worden, na een week was de geheele voedingsbodem bruin van kleur.

In gewonen *bouillon* heeft de kleurstofvorming het beste plaats in het bovenste gedeelte; door langdurig, krachtig schudden gelukt het de geheele vloeistof groen te kleuren. Ook in *bouillon* was bij P1 en P3 de kleur donkerblauwgroen, bij P2 lichtgroen.

In *gelatine* was de kleurstof bij alle 3 de stammen vrij licht.

In *serum* en *peptonkeukenzout* had slechts geringe kleurstofvorming plaats.

Melk werd eerst gecoaguleerd, daarna wederom vervloeid.

Indol werd *niet* gevormd, in *suikers* werd geen gasvorming waargenomen.

Om de *geesels* te kleuren werd de methode van *Tribondeau* toegepast, waarbij een tannine-aluin-gentiaan-violet-oplossing kokend op de vooraf gefixeerde bacteriën werd gebracht. Alle 3 de stammen bleken te voldoen aan den eisch van Burchhardt, dat ze n.l. slechts één geesel bezitten. Ook de voedingsbodems volgens *Gessard* werden bereid en nu deed zich het eigenaardige verschijnsel voor, dat P2, die op gewone agar en in gewonen *bouillon* zulk een lichtgroene, fluoresceerende kleurstof vormde, op de voedingsbodems volgens *Gessard* zoowel in het pepton-water als in de pepton-glycerine-agar in één dag een fraaie, donkerblauwe kleurstof vormde, terwijl de kleur van den *bouillon* blauwgroen was. P3 vertoonde dezelfde kleurstofvorming, doch in geringer mate.

P1 daarentegen vormde in 1 dag slechts een geringe

hoeveelheid blauwe kleurstof in de *agar*, in bouillon en peptonwater was geen kleurstofvorming waar te nemen. Eerst na 6 dagen was de bouillon licht-groenblauw, het peptonwater lichtgrijsblauw en de *agar* diep donkerblauw. De stammen voldeden dus aan de eischen van *Gessard*.

Wat betreft de pathogeniteit bleek, dat deze in belangrijke mate afhing van de wijze van infectie. Witte muizen verdroegen een volle öse *agarcultuur*, als deze met de platinanaald onder de huid werd geschoven. Werd daarentegen eenzelfde hoeveelheid, vermengd met physiologische keukenzoutoplossing, onderhuids of intraperitoneaal ingespoten, dan stierf de muis binnen 24 uur.

Een *cavia* verdroeg de onderhuidsche applicatie van 2 ösen *agarcultuur* van *B. pyocyaneus*, zonder eenig ziekteverschijnsel te vertoonen.

IV

CULTUURPROEVEN

1. *Pyocyaneus*-agarculturen.

Alvorens tot een bepaalde werkwijze te komen voor het onderzoek naar de antagonistische eigenschappen van den *B. Pyocyaneus*, werden eerst eenige oriëntatieproeven verricht om eenig inzicht in genoemde eigenschappen te verkrijgen.

Proef 1. Een 24 uur oude agar-serum-cultuur van *B. Pyocyaneus* wordt met steriele physiologische keukenzoutoplossing van bacteriën gereinigd.

Een 10 dagen oude cultuur van *B. pyogenes* op serumagar ondergaat dezelfde bewerking.

Beide buisjes worden geënt ieder met 1 öse van, met bouillon verdunde miltpulpa van een rund, gestorven aan miltvuur.

Als contrôle dient een serumagarcultuurbuisje, waarop 1 öse van hetzelfde miltvuurmateriaal wordt uitgestreken.

Resultaat. Miltvuur is goed gegroeid op serumagar en op de pyogenes-serumagar, daarentegen *niet* op de pyocyaneus-agar. Na een week bleek de *B. pyocyaneus* op dezen voedingsbodem goed gegroeid te zijn, terwijl het niet gelukte in uitstrijkpraeparaten, gekleurd volgens Gram, miltvuurbacillen of sporen ervan aan te toonen.

Uit deze proef bleek : 1° Dat de pyocyaneusvoedings-

bodem na een dag òf geen geschikte voedingsbodem voor miltvuur was òf dat de *B. pyocyaneus* zich zoo snel ontwikkelde, dat de miltvuurbacil geheel overwoekerd werd.

2°. Dat de opgebrachte miltvuurbacillen niet meer waren aan te toonen.

3°. Dat de *B. pyocyaneus* zelf nog goed groeide op dezen pyocyaneusvoedingsbodem, zoodat voor deze bacterie de bodem dus nog niet was uitgeput.

4°. Dat de *B. pyogenes* voor de miltvuurbacil in agar geen antagonistische stoffen produceert (ofschoon de cultuur veel ouder was en er dus eventueel meer stofwisselingsproducten hadden kunnen worden gevormd of meer uitputting van den voedingsbodem had kunnen plaats vinden).

Om het overwoekeren van de miltvuurbacillen door de pyocyaneusbacillen tegen te gaan en daardoor dezen sub 1 genoemden factor uit te sluiten, werd verricht:

Proef 2.

Twee ééndaagsche pyocyaneus-agar-culturen werden op dezelfde wijze van bacillen gereinigd en gedurende 30 minuten bij 65° verhit.

Eén buisje werd geënt met 1 öse *miltvuuragarcultuur*, het andere met 1 öse cultuur van de *Klein'sche kippenziekte*. Als contrôle dienden 2 buisjes cultuuragar, die ieder werden geënt met eenzelfde hoeveelheid van een der culturen.

Na één dag was in de pyocyaneus-culturen geen groei waar te nemen, terwijl de contrôlen goed gegroeid waren.

Conclusie.

Een ééndaagsche pyocyaneusagarcultuur, van bacillen ontdaan en gesteriliseerd, is geen geschikte voedingsbodem voor *miltvuur* of *Klein'sche kippenziekte*, het zij dan, dat er antagonistische stoffen worden gevormd of dat er zoodanige voedingsstoffen aan onttrokken worden, dat genoemde bacillen er niet goed meer op groeien.

Om uit te sluiten, dat de remming van groei een gevolg zou zijn van uitputting van den voedingsbodem, werd de volgende proef genomen :

Proef 3.

Vijf ééndaagsche pyocyaneusculturen werden op de gewone wijze gereinigd, gedurende 30 minuten bij 95° verhit en aan ieder buisje toegevoegd de helft van de daarin aanwezige hoeveelheid cultuuragar. Nadat goed gemengd was, werd de vloeistof schuingestold.

Als contrôlen dienden schuingestolde agarbuisjes, die in verhouding evenveel gedestilleerd water bevatten als de proefbuisjes pyocyaneus-agar. Dus 2 deelen water tegen 1 deel cultuuragar.

De pyocyaneusbuisjes werden ieder respectievelijk geënt met 1 öse van de volgende culturen : *miltvuur*, *coli*, *proteus*, *typhus*, *paratyphus A*.

Resultaat. Op geen van de buisjes was na 24 uur bij 37° eenige groei waar te nemen. Daarentegen waren de, met dezelfde bacteriën geënte contrôlebuisjes goed begroeid.

Nog duidelijker bleek, dat de remming niet het gevolg was van uitputting van den voedingsbodem, toen de genoemde bacteriën ook niet groeiden op een mengsel van *gelijke* deelen pyocyaneusagar en normale cultuuragar.

Proef 4.

Om aan te toonen, dat de remming van groei met, op de beschreven wijze, bewerkte agarculturen van één dag, specifiek is voor *B. Pyocyaneus*, werden 4 ééndaagsche agarculturen ieder van *B. coli* en *B. proteus*, na reiniging en sterilisatie (30 minuten bij 95°) samengesmolten met gelijke deelen normale cultuuragar, schuingestold en ieder geënt met eenige nader te noemen bacteriënsuspensies. Deze suspensies werden bereid door telkens een öse agarcultuur gelijkmatig te verdeelen in 1 cc bouillon.

Met dezelfde suspensies werden geënt: 4 ééndaagsche P-agarculturen, welke op dezelfde wijze waren bewerkt, en 4 contrôlebuisjes, bereid van gelijke deelen agar en gedestilleerd water.

	P-agar	Coli-agar	Proteus-agar	Controle-agar
geënt met :				
<i>B. pyocyaneus</i> :	geringe gr.	goede gr.	goede gr.	goede gr.
„ <i>proteus</i> :	geen groei	„ „	„ „	„ „
„ <i>coli</i> :	„ „	„ „	„ „	„ „
„ <i>anthracis</i> :	„ „	„ „	„ „	„ „

Uit bovenstaande tabel blijkt, dat er een groot ver-

schil in remming bestaat tusschen de pyocyaneusbodems en de coli- en proteus-bodems.

Daar beide genoemde bacteriesoorten behooren tot de zeer welig groeiende, gelden bovenstaande proeven tevens om aan te toonen, dat van uitputting van den voedingsbodem geen sprake is; zoodat de remming met reden mag beschouwd worden als specifiek voor den *B. pyocyaneus*.

Nadat door deze voorbereidende proeven tot een bepaalde werkwijze was besloten, werden de proeven over meerdere bacteriën uitgebreid.

Tevens werden *verschillende* pyocyaneusstammen gebruikt om de voedingsbodems te bereiden, op welke naderhand de verschillende bacteriesoorten zouden worden beproefd. Dit geschiedde om te zien, of de verschillende stammen verschil in antagonistische werking vertoonden. De eerste serie proeven betreft ééndaagsche agarculturen van de stammen P1, P2 en P3. De cultuurbuisjes werden alle op dezelfde wijze „gereinigd” van bacteriën, door middel van physiologische keukenzoutoplossing, daarna gedurende 30 minuten verhit bij 99°, vervolgens samengesmolten met gelijke deelen verse cultuuragar en — nadat het verdampte water was vervangen door dezelfde hoeveelheid steriel gedestilleerd water — schuingestold en tenslotte geënt met een öse suspensie van een der nader te noemen bacteriesoorten. Het resultaat werd gedurende drie opeenvolgende dagen opgenomen.

Onderzoek van agarculturen van *B. pyocyaneus* op antagonistische eigenschappen:

Onderzocht micro-organisme.	G R O E I op :							
	1-daagsche			2-daagsche			3-d.	4-d.
	P 1 agar	P 2 agar	P 3 agar	P 1 agar	P 2 agar	P 3 agar	P 3 agar	P 2 agar
<i>B. Anthracis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. Proteus</i>	—	z.ger.	z.g.	—	ger.	z.ger.	z.g.	ger.
<i>B. coli</i>	—	+	+	—	+	z.g.	z.g.	ger.
<i>B. typhi</i>	—	ger.	ger.	—	ger.	z.g.	z.g.	ger.
<i>B. paratyph. A</i>	—	z.ger.	—	—	z.g.	—	—	z.ger.
<i>B. paratyph. B</i>	—	ger.	+	—	ger.	z.g.	z.g.	ger.
<i>B. enteritidis</i> Gärt.....	—	ger.	—	—	—	—	—	—
<i>B. v. d. Klein'sche k.z.</i>	—	ger.	—	—	—	—	—	—
<i>staphylococ. (mensch)</i>	—	ger.	z.g.	—	z.g.	—	—	—
„ (varken)	—	ger.	—	—	—	—	—	—
„ (rund)	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>streptococ. mastit.</i>	—	+	—	—	—	—	—	—
„ <i>equi</i> ²⁾	—	+	—	—	—	—	—	—
<i>B. viscosus equi</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. suis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. cholerae gall.</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. abortus infectiosi</i> ¹⁾	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Vibrio cholerae</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
„ <i>El Tor</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. dys. Shiga Kruse</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. pyocyaneus</i> 1 *)	+	+	+	+	+	+	+	+
„ 2 *)	+	+	+	+	+	+	+	+
„ 3 *)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. rhusiopath. suis</i> 6.....	+	+	—	—	—	—	—	—
„ „ 7.....	+	+	+	—	+	—	—	+
„ „ 8.....	+	—	—	—	—	—	—	—
„ „ 1.....	+	—	—	—	—	—	—	—
„ „ 2.....	ger.	—	—	—	—	—	—	—
„ „ 3.....	z.g.	—	—	—	—	—	—	—
„ „ 5.....	+	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. mallei</i> ³⁾	—	z.g.	—	—	—	—	—	—
<i>B. diphtheriae</i> ²⁾	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. tuberculosis bov.</i> ³⁾	—	—	—	—	—	—	—	—

N.B. + is : goede groei ; — is : geen groei ; ger. is : nauwelijks zichtbaar ; z.g. is : slechts met loupe waarneembaar enkele dwerg-kolonies. *) : slechts kolonies van kleinere afmetingen, ofschoon overigens goede groei.

¹⁾ : aan de p-agar is runderserum toegevoegd ; ²⁾ : aan de P-agar is paardenserum toegevoegd ; ³⁾ : de *Pyocyaneus* was gegroeid op glycerine-agar, terwijl ook glycerine-agar was toegevoegd. De groei van *B. tuberculosis* werd gedurende een maand gecontrôleerd.

Van alle bacteriën waren de contrôlen goed gegroeid !

Stam P1. bleek voor alle in de tabel genoemde bacteriën sterk remmende stoffen te produceeren, behalve voor de 3 pyocyaneusstammen en voor verscheidene vlekziekte-stammen. De bacteriën, waarvan na één dag geen groei was waar te nemen, vertoonden ook na 2 en 3 dagen geen groei, wel was vermeerdering van groei waar te nemen van de pyocyaneus- en vlekziekte-stammen.

Stam P2 bleek in ééndaagsche culturen veel minder antagonistische stoffen te hebben geproduceerd dan *P1*. *B. coli* vertoonde goeden groei; *Proteus* en *Paratyphus A.* nauwelijks zichtbaar; *Typhus*, *Paratyphus B.*, *Enteritidis*, *Klein'sche kippenziekte*, *Staphylo-* en *Streptococcen* vertoonden geringen groei; terwijl de 3 pyocyaneusstammen en 2 vlekziekte-stammen zeer goed groeiden en zelfs *B. Mallei* op een glycerine-agar-pyocyaneusbodem eenigen groei vertoonde.

Na respectievelijk 2 en 3 dagen verblijf in de broedstoof, was de groei van de genoemde bacteriën toegenomen; de andere bacteriën, die in het geheel geen groei hadden vertoond, vertoonden deze ook niet na 2 of 3 dagen.

Stam P3 belemmerde den groei der bacteriën wederom sterker dan *P2*, zoodat slechts *coli* en *paratyphus B.* na één dag waren gegroeid, evenals de 3 pyocyaneusstammen en 1 van de 2 vlekziekestammen; de groei van *proteus* en *coli* was met de loupe nauwelijks waarneembaar, die van *typhus* gering en van de rest der onderzochte bacteriën nihil. Na 2 dagen in de broedstoof bij 37° was bij *paratyphus A.* en bij den *bacil* van de *Klein'sche*

kippenziekte met de loupe eenige groei waar te nemen, welke den 3en dag nog was toegenomen. De bacteriën, die den eersten dag eenigen groei hadden vertoond, gaven na 2 en 3 dagen nog duidelijker cultuur te zien; terwijl de andere bacteriën, die absoluut niet waren gegroeid in één dag, ook in 2 en 3 dagen niet waren opgekomen.

De tweede serie proeven heeft betrekking op *Pyocyaneus*-culturen, die gedurende tweemaal 24 uren bij 37° in de broedstoof hebben gestaan. De cultuurbuisjes werden op dezelfde wijze behandeld als hierboven van de één-daagsche culturen werd beschreven.

Wat betreft *Stam P1*, vertoonde geen der onderzochte bacteriën behalve *B. pyocyaneus* eenigen groei, zelfs niet na 2 en 3 dagen verblijf in de stoof.

Stam P2 vormde in 2 dagen ook minder remmende stoffen dan *P1*, doch meer dan er in één-daagsche culturen gevormd waren, zoodat den eersten dag geen groei was waar te nemen van den bacil van de *Klein'sche kippenziekte* en van de beide *streptococcen*-stammen, terwijl deze op de één-daagsche *P2* agar wel gegroeid waren.

De bacil van de *Klein'sche K.Z.* vertoonde den tweeden dag eenigen groei, die den derden dag was toegenomen, en de *streptococcus-equi* gaf na 3 dagen eenige kolonies te zien. Overigens was de groei als bij de één-daagsche *P2* agar.

Wat betreft de overige bacteriën, zoo gold ook van deze, wat bij de culturen van één dag van *P2* en *P3*

was opgemerkt, nl. dat van de in-één-dag-groeiende, de groei na 2 en 3 dagen was toegenomen, terwijl de overblijvende ook na 2 en 3 dagen geen groei vertoonden.

De tweedaagsche P3-culturen gaven een duidelijke antagonistische werking te zien, zoodat na één dag slechts de 3 *pyocyaneus*-stammen goed tot ontwikkeling waren gekomen; *B. proteus* en de bacteriën van de *typhus-coli*-groep vertoonden een nauwelijks waarneembaren groei, terwijl de overige bacteriën in het geheel niet tot ontwikkeling waren gekomen. Na twee dagen was van *vlekziekte*-stam-7 eenige groei te bespeuren, terwijl *proteus*, de bacteriën van de *typhus-coli*-groep en de 3 *pyocyaneus*-stammen zich iets beter ontwikkeld hadden.

De overige bacteriën vertoonden ook na 3 dagen geen groei. De proeven met P2 en P3 werden nog iets verder uitgestrekt, door van P3. 3-daagsche en 6-daagsche en van P2. 4- en 7-daagsche culturen op de herhaaldelijk beschreven wijze te bewerken. De remming van den groei der verschillende bacteriën kwam dan vrijwel overeen met die van de tweedaagsche P-agar-culturen.

Uit de bovenbeschreven proeven blijkt het volgende :

Agarculturen van *B. Pyocyaneus*, van bacillen gereinigd, gesteriliseerd bij 99° C., samengesmolten met gelijke deelen cultuuragar onder toevoeging van evenveel steriel, gedistilleerd water als het verdampte water bedraagt, zijn van zoodanige samenstelling, dat zij geen geschikten voedingsbodem vormen voor de meeste pathogene bac-

teriën. Tal van bacteriën vertoonen op dezen bodem geen groei, van verscheidene — en wel van de in het algemeen het best groeiende — wordt de groei den eersten dag belangrijk geremd, terwijl soms na 2 of meer dagen iets betere groei optreedt. Sommige vlekziektestammen kunnen zich op dezen bodem goed ontwikkelen, andere daarentegen vertoonen geen groei; alleen de *B. Pyocyaneus* ontwikkelt zich goed, ofschoon de zeer kleine kolonies er op wijzen, dat ook deze bacil eenigszins in zijn groei wordt tegengegaan. Twéé- of méérdaagsche pyocyaneus-voedingsbodems remmen sterker dan één-daagsche.

Daar door toevoeging van een voldoende hoeveelheid voedende bestanddeelen de mogelijkheid van een uitputting van den voedingsbodem was uitgesloten — tegen welke mogelijkheid bovendien pleitte het feit, dat andere goedgroeiende bacteriën de bedoelde remmende eigenschappen niet in agarvoedingsbodems wisten te veroorzaken — daar bovendien als contrôle voor de mogelijkheid van groei der gebruikte bacteriesoorten agarvoedingsbodems werden gebruikt, die zeker niet meer voedende bestanddeelen bevatten dan de aangewende pyocyaneus-bodems en waarop al deze bacteriën goeden groei vertoonden, komt men tot de volgende

Conclusie: Bij zijn groei op cultuuragar worden door den *B. Pyocyaneus* in de agar stoffen gevormd, die antagonistisch werken op alle onderzochte bacteriën en wel het *sterkst* op:

B. anthracis, *B. viscosus equi*, de bacillen van de haemmorrhagische septichaemie, *B. abortus infectiosi*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio El Tor*, *B. dysenteriae* (Shiga Kruse), *B. mallei*, *B. tuberculosis* en *B. diphtheriae*.

Iets minder op den bacil van de Klein'sche kippenziekte.

Nog minder op staphylo- en streptococcen.

Nog minder op *B. proteus vulgaris* en de bacteriën van de coli-typhusgroep.

Zeer inconstant op *B. rhusiopathiae suis*.

Het minst op *B. pyocyaneus* zelf.

Zooals reeds uit de tabel blijkt, trok het feit, dat de vlekziektebacil zich ten opzichte van de pyocyaneusvoedingsbodems anders gedroeg dan alle andere bacteriën (behalve *B. pyocyaneus* zelf), de aandacht.

Verschillende stammen werden toen onderzocht en nu bleek al dadelijk, dat er verschil in neiging bestond om op P-voedingsbodems te groeien. Om de mogelijkheid uit te sluiten, dat een geringe hoeveelheid bouillon — met de öse op de agar gebracht — den groei zou bevorderen, werden de suspensies in plaats van met bouillon, met gedistilleerd water gemaakt, nl. zooveel mogelijk een gelijke hoeveelheid van agarculturen gesuspenderd in 1 cc aqua dest. en hiervan telkens één öse uitgestreken op den pyocyaneusagar.

Het resultaat was, dat de vlekziekte-bacil herhaaldelijk op de ééndaagsche P-agar groeide, terwijl geen van de andere onderzochte bacteriën eenigen groei vertoonde.

Het gelukte zelfs suspensies te maken van verschillende bacteriën in steriel gedistilleerd water, hierbij ook vlekziektebacillen van agarculturen te brengen, van een dergelijk mengsel een öse uit te strijken op ééndaagsche P-agar en dan na 24 uur verblijf in de stoof, waar te nemen, dat slechts de vlekziekte-kolonies waren gegroeid, terwijl de overige bacteriën zich niet hadden kunnen ontwikkelen.

Op de contrôle-agar (agar met aq. dest. *aā*) waren daarentegen de andere bacteriën overvloedig gegroeid en traden zelfs in verhouding tot de vlekziekte-kolonies op den voorgrond.

Het bovenbeschreven resultaat werd b.v. bereikt bij een suspensie van telkens 1 öse agarcultuur van *coli*, *suipestifer* en *vlekziekte*, goed gemengd in 1 cc aq. dest. en op de beschreven wijze uitgestreken op P-agar. Alleen de *vlekziekte*-kolonies waren zichtbaar. In de contrôle daarentegen was slechts *spaarzaam vlekziekte* waar te nemen, terwijl *coli* en *suipestifer* flink waren gegroeid.

Bij eerste beschouwing leek het dus, dat het mogelijk zou zijn de aldus bereide pyocyaneus-agar te benutten als electieve voedingsbodem voor vlekziekte, waardoor men instaat zou zijn uit een mengsel van verschillende bacteriën de vlekziekte-bacil onmiddellijk in reincultuur te verkrijgen. Bij nader onderzoek bleken echter *verschillende vlekziekestammen* verschillende neiging te hebben om op dezen bodem te groeien. Probeerde men den groei te bevorderen door meer normale cultuuragar

toe te voegen, dan werd de voedingsbodem ook weer meer geschikt voor andere bacteriën, zoodat deze bij proeven met mengculturen meer op den voorgrond traden.

De *tweedaagsche* P-1-agar bleek — op de gewone wijze bereid — den groei van de vlekziektebacil geheel te remmen. Door toevoeging van meer cultuur-agar kon deze groei verbeterd worden. Bij een verhouding van 1 deel tweedaagsche P 1-agar op $2\frac{1}{4}$ deel normale agar kon b.v. bij een bepaalden stam (9) goede groei worden verkregen, welke groei door toevoeging van agar, zóódanig, dat de verhouding $1 : 2\frac{1}{2}$ en $1 : 3$ werd, nog verbeterde. Daarentegen vertoonden *coli*, *miltnuur* en *proteus* eerst bij een verhouding van $1 : 3$ eenigen groei.

Ook kwam bij het werken met *andere* pyocyaneus-stammen het verschil in gesteldheid, wat betreft de antagonistische eigenschappen voor den dag, zoodat b.v. P-1-agar, — die in het algemeen sterker antagonistisch werkte dan P-3-agar — stam 6 van vlekziekte niet remde, terwijl zulks wel geschiedde door P-3-agar. Eveneens bleek tweedaagsche P-2-agar stam 6 en 7 van vlekziekte *niet* te remmen, doch ook van verschillende andere bacteriën den groei niet tegen te gaan; daarentegen werden deze beide vlekziekte-stammen wel door *tweedaagsche* P-3-agar geremd.

2. *Pyocyaneus*-Bouilloncultuur.

Proeven met jonge bouillonculturen.

a. Om na te gaan, of de *B. pyocyaneus* in *bouillon-culturen* ook antagonistisch-werkende stoffen vormt, werd een buisje ééndaagsche P-1-bouilloncultuur gefiltreerd door een Maass-kaars. Het filtraat werd gemengd met dezelfde hoeveelheid cultuur-agar en dit mengsel schuingestold.

Daarna werd het buisje geënt met één öse opzwemming van één öse *coli*-agarcultuur in 1 c.c. bouillon.

Een gefiltreerde ééndaagsche *coli*-bouilloncultuur en een buisje normale bouillon werden op dezelfde wijze behandeld met agar en op dezelfde wijze geënt met *coli*.

Resultaat: Groei in alle drie de culturen even goed.

b. Een veertien-daagsche P-1-bouilloncultuur werd gefiltreerd, 2 c.c. van het filtraat gemengd met 15 c.c. gesmolten cultuur-agar en dit mengsel schuingestold. Voor contrôle werden 2 c.c. normale bouillon gemengd met 15 c.c. agar. Beide buizen werden geënt met een öse suspensie van *B. coli* in bouillon.

Resultaat: De groei op beide buizen was goed, doch op den *pyocyaneus*-bodem waren de kolonies kleiner (of-schoon er voldoende ruimte was geweest voor het ontstaan van grootere kolonies).

c. De gefiltreerde ééndaagsche en veertiendaagsche P-1-bouillonculturen werden elk, om de eventueel daarin aanwezige antagonistische stoffen meer te concentreeren,

tot de helft van het volume ingedampt tusschen 80 en 90° C. 1 c.c. van elk dezer ingedampte filtraten werd gemengd met 5 c.c. cultuur-agar en het mengsel daarna schuingestold. Als contrôle diende 1 c.c. normale bouillon in 5 c.c. cultuur-agar. De 3 buisjes werden elk geënt met een öse coli-suspensie.

Resultaat : De groei is op de P.-bouillon-agar iets minder dan op de normale bouillon-agar.

d. Het filtraat van 20 c.c. ééndaagsche pyocyaneus-bouillon werd gemengd met 10 c.c. gesmolten agar; van dit mengsel werden 3 buisjes schuingestold en geënt met *miltnuur*, *coli* en *proteus*.

Resultaat : Alle drie de culturen zijn normaal gegroeid.

e. Vier ééndaagsche pyocyaneus-bouillon-culturen werden eerst gedurende 30 minuten bij 90° verwarmd, daarna gedurende 1 uur *gecentrifugeerd* om de bacteriën te verwijderen. De van bacillen ontdane vloeistof werd daarna weer 30 minuten gesteriliseerd bij 90°. Na onderzoek op steriliteit werden 3 van de buisjes den volgenden dag geënt, respectievelijk met *miltnuur*, *pyocyaneus* en *coli*, terwijl het 4e als controle diende.

Resultaat : Na één dag bij 37° was de groei als in normalen bouillon.

Proef e. werd genomen om na te gaan of de geringe antagonistische werking van den pyocyaneus-bouillon bij de vorige proeven een gevolg was van het feit, dat daarin aanwezige antagonistisch-werkende stoffen door den

filter werden tegengehouden. Uit deze proef blijkt dus, dat zulks niet het geval is geweest.

f. Om te onderzoeken of bedoelde stoffen wellicht thermolabiel waren en dus bij 90° werden vernietigd, werd de volgende proef genomen.

Zes buisjes ééndaagsche *P. bouillon* werden gedurende 30 minuten bij 56° verhit, gecentrifugeerd en de van bacillen ontdane vloeistof gedurende dertig minuten bij 56° gesteriliseerd. Na contrôle op steriliteit werden de buisjes den volgenden dag geënt met :

miltvuur, pyocyaneus, proteus, coli, typhus en *paratyphus B.*

Resultaat : Na verblijf van 24 uren in de broedstoof bij 37° was de groei van de 6 culturen even goed als die in den normalen bouillon, welke als contrôle diende.

g. Dezelfde proef werd genomen met *tweedaagsche P. bouillon*-culturen.

Ook hier was het resultaat, dat er geen verschil in groei viel waar te nemen.

Ofschoon algemeen wordt aangenomen, dat van de eigenlijke blauwe kleurstof van den *B. pyocyaneus* het „pyocyanine” geen remmende werking uitgaat (Dopter en Sacquepée pag. 355 zeggen o.a. „La pyocyanine n'est pas toxique”), werd bij de agarculturen opgemerkt, dat de meest intensief groen-blauwgekleurde culturen het best te gebruiken zijn om de antagonistische werking tot haar recht te doen komen. Dit is niet uitsluitend het

gevolg van het feit, dat bij den besten groei van den *B. pyocyaneus* ook het meeste van deze kleurstof wordt gevormd, men zal ook bemerken, dat een stam, die door langdurig voortkweeken zijn vermogen om kleurstof te vormen heeft ingeboet, bij even weligen groei als een goede kleurstofvormer, toch in agarculturen minder remmend op den groei van verschillende bacteriën zal werken dan deze kleurstofvormer. Een dergelijke stam heeft dus, met zijn vermogen om kleurstof te vormen, tevens een belangrijk deel van zijn antagonistische werking ingeboet.

Daar bovendien in *pyocyaneus*-agar-culturen blijkt, dat in het bovenste dunne gedeelte van den schuingestolden agar de kleurstofvorming het eerste en het meeste optreedt, en tevens in bouillon-culturen, die men stil laat staan, alleen aan de oppervlakte kleurstof wordt gevormd, terwijl men de geheele cultuur slechts door krachtig schudden gekleurd kan krijgen, mag men aannemen, dat de lucht, c.q. de zuurstof van de lucht, een belangrijke factor is bij de kleurstofvorming. (Het is ook bekend, dat de *B. pyocyaneus* in waterstof-omgeving geen kleurstof vormt).

Hiervan uitgaande werd er naar gestreefd het oppervlak van de bouillon-culturen zooveel mogelijk te vergrooten, door in steriele glasdoozen telkens 10 c.c. van met *pyocyaneus* geënten bouillon te brengen. Na één dag verkreeg men dan intensief groenblauw-gekleurde *pyocyaneus*-bouillon.

h. Werd deze bouillon-cultuur gefiltreerd en het fil-

traat geënt met *miltvuur* of *coli*, dan trad in geen der beide culturen groei op.

i. Werd nu van deze *ééndaagsche pyocyaneus-glasdoosbouillon-cultuur* na filtratie telkens $2\frac{1}{2}$ c.c. na 30 minuten verwarming bij 55° C., gemengd met gelijke deelen cultuuragar, in cultuurbuisjes schuingestold, en werd deze pyocyaneus-bouillonagar dan telkens geënt met 1 öse van een suspensie van bacteriën (1 öse agarcultuur in 1 c.c. bouillon), dan kreeg men na een dag verblijf in de broedstoof bij 37° het volgende resultaat :

Miltvuur : geen groei.

Coli : groei, doch minder dan de contrôle.

Proteus : geen groei.

Paratyphus B. : minder dan de contrôle.

Typhus : goede groei.

Paratyphus A. : goede groei.

Als contrôlen dienden buisjes, waarbij de agar verdund was met gelijke deelen gedistilleerd water. Op al deze contrôlen trad goede groei op.

Proeven met oude bouillonculturen.

Met het doel om pyocyanase te bereiden werd een literkolf met bouillon geënt met *B. pyocyaneus*. Om het aan de lucht komende oppervlak zooveel mogelijk te vergrooten werd daarvoor gekozen een platte, ronde kolf met een diameter van grond- en bovenvlak van ongeveer 20 cM., welke beide vlakken slechts een 4-tal c.M.'s van elkander verwijderd waren, terwijl de cylinder-

vormige hals, met een diameter van ongeveer 3 c.M. zich loodrecht in het centrum van het bovenvlak bevond; Deze hals werd met een wattenprop afgesloten. Reeds na één dag vormde zich in dezen bouillon aan de oppervlakte een vlies en kon men aldaar de vorming van de groenblauwe kleurstof bemerken. Volgens voorschrift werd deze vloeistof eenige malen per week krachtig geschud, waarbij dan het zich telkens weer vormende vlies ten deele werd opgelost, terwijl dan tevens de geheele vloeistof de donkergroene kleur aannam. Na ongeveer zes weken was de kleur donkergroen-bruin en de consistentie dik en slijmerig. Deze vloeistof werd door een Maass' filter door middel van de waterluchtpomp gefiltreerd en het filtraat opgevangen in een vooraf gesteriliseerde buis. Alvorens verder te gaan met de bereiding van de pyocyanase, werd het filtraat onderzocht op antagonistische eigenschappen.

j. Hiertoe werden in steriele buisjes telkens 2 c.c. van het filtraat gebracht en bij elk buisje 1 öse van de volgende bacteriën-agarculturen gevoegd:

Miltvuur, coli, proteus, typhus, paratyphus A., paratyphus B., streptococcus- en staphylococcus mastitidis.

Na 24 uren bij 37° was in geen der buisjes groei waar te nemen.

k. Thans moest worden nagegaan, of de te onderzoeken vloeistof ook *bactericide* eigenschappen bezat.

Hiertoe werd telkens 1 öse van ieder buisje uitgestreken op steriele agar, nadat de bacteriën dus 24 uren aan

de inwerking van de vloeistof waren blootgesteld geweest.
Het resultaat was :

<i>Miltvuur :</i>	vertoont groei.
<i>Coli :</i>	„ „
<i>Proteus :</i>	„ „
<i>Typhus :</i>	„ „
<i>Paratyphus A.</i>	„ geen groei.
<i>Paratyphus B. :</i>	„ groei.
<i>B. Pyocyaneus :</i>	„ „
<i>Streptococcus :</i>	„ geen groei.
<i>Staphylococcus :</i>	„ groei.
<i>B. Rhusiopathiae suis:</i>	„ „

Alleen voor den streptococcus en den *B. paratyphi A.* scheen deze vloeistof dus bactericide te zijn.

1. Teneinde de antagonistische werking nader te onderzoeken werd het beschreven filtraat van de 6-weken-oude *pyocyaneus bouilloncultuur* gemengd met gelijke deelen gesmolten cultuur-agar en hierop, op de gewone wijze, telkens een öse bacteriënsuspensie gebracht.

Het resultaat was als volgt :

<i>B. Pyocyaneus</i>	goede groei.
<i>proteus</i>	geringe „
<i>coli.</i>	goede „
<i>anthracis.</i>	zeer gering.
<i>paratyphi A.</i>	gering.
<i>paratyphi B.</i>	gering.
<i>typhi</i>	goede groei.
<i>rhusiopathiae suis.</i>	„ „

staphylococcus pyogenes	gering.
bacil van de Klein'sche kippenziekte.....	zeer gering.
streptococcus equi	gering.
B. cholerae gallinarum	geen groei.
viscosus equi	„ „
vibrio cholerae	zeer gering.
„ El Tor	„ „
B. dysenteriae Shiga Kruse	geen groei.

Na 2 dagen was de groei van de met „gering” genoteerde bacteriën toegenomen, terwijl de bacteriën, die den eersten dag geen groei vertoonden, ook na 2 en 3 dagen niet tot ontwikkeling waren gekomen.

m. Werd de bovenbeschreven vloeistof gemengd met gelijke deelen cultuurbouillon en dit mengsel geënt met de bovengenoemde bacteriën, dan bleken na 24 uur alle bacteriën even goed gegroeid te zijn als in normalen bouillon.

n. Een P1-bouilloncultuur op dezelfde wijze, als vroeger beschreven, in een platte kolf bij 37° gegroeid gedurende 30 dagen, werd gedurende drie weken geplaatst in een ijskast bij een temperatuur van 4—8° C.

Deze cultuur bleek toen geen levensvatbare pyocyaneusbacillen meer te bevatten, zoodat het mogelijk was deze cultuur ongefiltreerd en onverwarmd te onderzoeken op hare antagonistische eigenschappen.

Hiertoe werd deze vloeistof in steriele cultuurbuisjes gemengd met gelijke deelen gesmolten en tot 45° afgekoelde cultuuragar, daarna schuingestold en op de gewone wijze geënt met bacteriën.

Onderzochte bacteriesoort.	Groei na 24 u.	Groei na 2×24 u.	Groei na 3×24 u.
B. Anthracis	—	—	—
B. Coli	+	+	+
„ Paratyphi B.	+	+	+
„ Paratyphi A.	gering	+	+
„ Typhi	gering	+	+
„ Proteus vulg.	+	+	+
Staphylococ. pyogenes	—	—	—
Bacil v. d. Klein'sche kippenziekte	zeer ger.	zeer ger.	zeer ger.
B.rhusiopathiae suis VI	—	—	—
id. id. VII	gering	+	+
Streptococcus mastitid.	—	—	—
Streptococcus equi	—	—	—
B. cholerae gallinarum	—	—	—
B. viscosus equi	—	—	—
Vibrio cholerae	—	—	—
Vibrio El Tor	—	—	—
B. dysenteriae Shiga Kruse	—	—	—
B. mallei	—	—	—
B. diphtheriae	—	—	—

Conclusie.

De B. Pyocyaneus vormt in bouillon stoffen, die antagonistisch werken op den groei van sommige bacteriën.

In ééndaagsche culturen worden deze stoffen slechts gevormd bij rijkelijk toetreden van de lucht. Bij 6 weken-oude culturen treden de genoemde stoffen duidelijker op, waarbij valt op te merken, dat de antagonistische werking van gefiltreerde culturen geringer is dan die van niet-gefiltreerde.

Bactericide eigenschappen vertoonen geen van beide vloeistoffen.

3. Proeven met gemengde culturen

De snelle groei van *B. pyocyaneus* en de, voor den groei van andere bacteriën, antagonistische eigenschappen van deze bacterie gaven reden te onderstellen, dat in mengculturen de *B. pyocyaneus* tal van bacteriën zou overwoekeren, den voedingsbodem ongeschikt zou maken voor den groei van sommige bacteriën en zelfs aan sommige bacteriën hun levensvatbaarheid zou ontnemen.

Van de verschillende ter beschikking staande bacteriën werd één öse agarcultuur gebracht in cultuurbuisjes met 10 cc bouillon.

Deze buisjes werden gedurende 18 uur in de stoof geplaatst en nadat bij alle goeden groei was waargenomen, geënt met 1 öse ééndaagsche *pyocyaneus* bouilloncultuur. Deze cultuur was bereid, door in cultuurbouillon 1 öse van elk der 3 stammen P1, P2 en P3 te brengen.

In alle culturen was reeds na 24 uur een duidelijke groenkleuring door groei van *B. pyocyaneus* waar te nemen.

In verband met voorafgaande proeven, waaruit eenigszins kon worden opgemaakt, hoeveel tijd ongeveer noodig zou zijn om sommige bacteriën ongeschikt te maken tot cultuur, en ter besparing van materiaal werd het eerste onderzoek eerst verricht na 10 dagen. Van elk mengsel van bacteriën werd dan 1 öse uitgestreken achtereenvolgens op 3 buisjes cultuuragar en den volgende dag nagegaan of, behalve de pyocyaneus, de oorspronkelijk gekweekte bacterie nog was aan te toonen.

Na 10 dagen waren de volgende bacteriën niet meer uit het mengsel te kweken, m.a.w. deze bacteriën hadden hun levensvatbaarheid in 10 dagen of minder verloren: *B. mallei*, *streptococcus equi*, *B. anthracis*, *B. rhusiopathiae suis*, *B. viscosus equi*, *streptococcus mastitidis*, *B. dysenteriae Shiga Kruse*, *B. septichaemiae haemorrhagicae*.

B. proteus vulgare was na 10 dagen nog te kweken, na 15 dagen echter niet meer.

B. paratyphi B, *staphylococcus pyogenes* en *vibrio El Tor* waren na 15 dagen wel, na 20 dagen niet meer te kweken.

B. cholerae gallinarum was reeds na 2 dagen niet meer te kweken.

B. diphtheriae verloor zijn levensvatbaarheid tusschen 7 en 13 dagen,

B. coli commune, *vibrio cholerae* en de bacil van de Klein'sche k.z. tusschen 20 en 24 dagen.

B. typhi, *B. paratyphi A*. en *B. salmonicidae* leefden nog na 24 dagen.

Conclusie.

De *B. pyocyaneus* groeit zeer goed in alle, met de vermelde bacteriën reeds volgegroeide, bouillon-culturen. Na 24 dagen zijn van 20 onderzochte bacteriën er nog slechts 3 uit de mengculturen te kweken en wel *B. typhi*, *parathyphi A* en *salmonicidae*.

De *B. pyocyaneus* zelf is na genoemden tijd nog uit alle culturen te kweken.

Bij een andere serie proeven werd in buisjes met 10 cc bouillon in elk buisje 10 ösen van een suspensie van een van de volgende bacteriën: *Typhus*, *parathyphus A* en *paratyphus B* gebracht en daarna 1 öse van een suspensie van *pyocyaneus*.

Na 6 dagen waren de genoemde bacteriesoorten nog slechts in geringen getale en na 13 dagen waren ze niet meer te kweken, de *B. pyocyaneus* daarentegen bleek alle andere overwoekerd te hebben, ofschoon de andere bacteriën in 10 maal grooteren getale waren ingebracht.

Bedenkt men, dat in de eerst vermelde proeven de andere bacteriën in zoo ontzaggeijk veel grooter aantal aanwezig waren dan het aantal der ingebrachte *P*-bacillen en tevens, dat de reeds gegroeide bacteriën een groot deel van de voedende bestanddeelen van den bouillon hadden verbruikt en bovendien den voedingsbodem waarschijnlijk minder geschikt hadden gemaakt door hun stofwisselingsproducten, dan geeft deze bacterie wel den indruk zelf weinig eischen aan zijn voedingsbodem te

stellen, zich ook onder minder gunstige omstandigheden snel te vermenigvuldigen en den voedingsbodem voor andere bacteriën ongeschikt te maken, ja zelfs bactericide te werken.

In verband met de sterk bactericide eigenschappen van *B. bulgaricus* in melk, leek het interessant na te gaan hoe *pyocyaneus*, die zich in bouillon zoo sterk antagonist toonde, zich zou gedragen in mengcultuur met genoemde bacterie. Hiertoe werd in 10 cc steriele melk 1 öse uit een cultuur in melk van *B. bulgaricus* en 1 öse van een *P*-agarcultuur gebracht. Als contrôlen dienden buisjes melk, waarin 1 öse van ieder der genoemde bacteriën afzonderlijk was gebracht.

Na 5 dagen werd van 2 der buisjes uitgestreken op agar. Van de contrôle *P*-melk was *P* goed gegroeid, van de mengcultuur daarentegen niet.

Van de onderzochte bacteriën was dus de *B. bulgaricus* de eenige, die in staat was *B. pyocyaneus* in mengcultuur te dooden. Hierbij moet echter wel in aanmerking worden genomen, dat dit ook de eenige bacil was, die met *P* in *melk* werd samengebracht.

V

PROEVEN MET GEDOODE PYOCYANEUSBACILLEN

Om na te gaan of pyocyaneusbacillen zelf stoffen dragen, die antagonistisch werken op den groei van verschillende bacteriën, werden de volgende proeven genomen :

A. *Met pyocyaneusbacillen, gegroeid gedurende 24 uur op normale cultuuragar.*

De bacillen van P1-culturen werden telkens met 5cc gedistilleerd water afgewasschen en deze bacillen-suspensies gemengd met 5 cc gesmolten cultuuragar, nadat de bacteriën eerst door 30 min. verhitten bij 100° waren gedood. Dit mengsel werd goed geschud en schuingestold, daarna werd elk buisje geënt met een öse van een bacteriën-suspensie in bouillon. Als contrôlen dienden buisjes met gelijke deelen agar en aq. dest., waarop evenveel der bacteriënsuspensies werd gebracht.

Na 24 uur werden de culturen onderzocht. Het resultaat kan blijken uit de volgende tabel.

Onderzochte bacteriesoort.	Groei.	Contrôle.
B.anthraxis	—	+
Coli comm.	+	+

<i>Onderzochte bacteriesoort.</i>	Groei.	Contrôle.
proteus	gering	+
typhi	+	+
paratyphi A.	gering	+
paratyphi B.	+	+
rhusiopathiae suis	—	+

B. Met pyocyaneusbacillen, gegroeid gedurende 24 uur in normale cultuurbouillon.

Voor dit onderzoek werden 50 cc P1-bouillon gedurende 45 minuten gecentrifugeerd, nadat de bouillon eerst gedurende 45 minuten bij 60° in een waterbad was verhit. De neergeslagen bacteriën werden gemengd met 10 cc verse bouillon en van deze vloeistof werd telkens 1 cc gebracht in steriele buisjes.

Intusschen was van de nader te noemen bacteriesoorten telkens 1 öse agarcultuur gebracht in 1 cc bouillon en van dezen bouillon werd dan één öse gebracht in den gedooode-pyocyaneus-bacteriën-bouillon. Onmiddellijk na het inbrengen werd, na schudden, 1 öse uit deze vloeistof gebracht in 15 cc. gesmolten en tot 45° afgekoelde agar en hiervan platen gegoten. Den volgenden dag werd dan het aantal kolonies geteld. Tevens werd na 24 uur verblijf bij kamertemperatuur uit elk buisje telkens van een öse een agarplaat gegoten en den daaropvolgenden dag van deze platen het aantal kolonies geteld.

Het resultaat wordt weergegeven in de volgende tabel :

Onderzochte bacteriesoort.	Aantal kolonies uit 1 öse, onmiddel- lijk na inbrengen.	Aantal kolonies uit 1 öse na 24 uur.
B. anthracis	8	ontelbaar
coli commune	64	id.
proteus vulg.	120	id.
Typhi	320	id.
paratyphi A.	200	id.
„ B.	64	id.
staphylococ. pyog. aur.	2560	id.

Conclusie: Gedooide *pyocyaneusbacillen*, gekweekt op agar en vermengd met agar, gaven een remmenden invloed te zien op enkele der onderzochte bacteriën.

Gedooide *pyocyaneusbacillen*, gekweekt in bouillon en vermengd met bouillon, vertoonden, in de genomen proeven, geen remmenden invloed op den groei der onderzochte bacteriën.

VI

DIERPROEVEN MET *B. PYOCYANEUS*

Bij de proeven over het antagonisme van den *B. pyocyaneus* ten opzichte van bacteriën, die gelijktijdig met dezen bacil in het lichaam van proefdieren werden gebracht, werd bij voorkeur gebruik gemaakt van witte muizen, eensdeels om oeconomische redenen, anderdeels, omdat deze proefdieren de subcutane infectie met pyocyaneusbacillen goed doorstaan.

Proeven met B. pyocyaneus en B. anthracis.

I. De eerste proef was een „oriëntatieproef”.

a. Uit een verse runder-miltvuur-milt werd 1 cc bloed gemengd met 10 cc physiologische NaCl-oplossing.

b. Van een ééndaagsche pyocyaneusagarcultuur werd een suspensie gemaakt met 10 cc Physiologische NaCl-oplossing.

Contrôle-muis M. werd 0.25 cc van vloeistof *a* onder de rughuid ingespoten.

Proefmuis MP kreeg subcutaan rug 0.25 cc van *a*, gemengd met 0.25 cc. van *b*.

Contrôle-muis P kreeg slechts 0.25 cc van *b*.

De muizen *MP* en *P* stierven na ruim 24 uur. Muis *M* stierf na 2×24 uur. Bij sectie bleek muis *MP* bloedige infiltratie van de entplaats en een gezwollen milt te

hebben. Uitstrijkpraeparaten gekleurd volgens Gram gaven van de entplaats tal van pyocyaneus-bacillen, gemengd met miltvuurbacillen te zien, die van bloed en organen vertoonden slechts pyocyaneusbacillen in geringen getale.

Hetzelfde resultaat leverden agarculturen: van de entplaats een mengsel van beide bacteriën, van de organen slechts pyocyaneus. Uit muis *P* werden tinctorieel en cultureel P-bacillen aangetoond en wel in grooter aantal dan bij MP.

Muis *M* stierf aan miltvuur.

Uit deze voorloopige proef bleek, dat de *B.pyocyaneus* in de aangewende hoeveelheid en op de beschreven wijze ingebracht te pathogeen was voor witte muizen, zoodat de muizen te spoedig aan pyocyaneusinfectie te gronde gingen, waardoor een eventueele antagonistische werking geen tijd zou hebben behoorlijk tot haar recht te komen.

Bij de later genomen proeven werden daarom geringere hoeveelheden pyocyaneuscultuur genomen. Daar het bezwaren opleverde steeds met virulent miltvuur-bloed te werken en dit bovendien geen noodzakelijkheid was tot het verkrijgen van een oordeel over de antagonistische werking van den *B.pyocyaneus*, werd in den vervolge slechts met culturen gewerkt.

Proef 2.

a. 1 öse miltvuuragarcultuur wordt gesuspendeerd in 1 cc sterielen bouillon.

b. 1 öse P1-agarcultuur wordt gesuspenderd in 1 cc steriele bouillon.

Contrôlemuis A krijgt 1 öse van suspensie *a* (subcutaan rug); *contrôlemuis C* krijgt 1 öse van suspensie *b* (subcutaan rug); proefmuis *B* krijgt 1 öse van suspensie *a* en daarna 1 öse van suspensie *b*.

Resultaat: *Contrôlemuis A* sterft na 6 dagen aan miltvuur, de muizen *B* en *C* blijven leven.

Proef 3. Bij proef 2 bleek de miltvuurstam niet zeer virulent te zijn, daarom werd thans gebruikt een miltvuurcultuur, gekweekt uit een, aan miltvuur gestorven muis. Tevens werd een proef genomen met een andere pyocyaneusstam (P2).

a. 1 öse miltvuuragarcultuur en *b*. 1 öse P 2-agarcultuur worden ieder afzonderlijk gesuspenderd in 20 cc. phys. NaCl-oplossing.

Bij *contrôle-muis A* wordt onder de rughuid 0,1 cc van suspensie *a* ingespoten.

Proefmuis B krijgt eerst een injectie van 0,1 cc van *a*, daarna 0,1 cc van suspensie *b*, op eenigen afstand van de eerste injectie.

Contrôlemuis C krijgt 0.1. cc van *b*.

Resultaat:

Contrôlemuis A sterft na 3 dagen. Uit alle organen wordt miltvuur gekweekt.

Proefmuis *B*, die met een mengsel van miltvuur en pyocyaneus was geïnfecteerd, stierf reeds na 2 dagen.

Microscopisch en cultureel bleek de miltvuur-entplaats

veel miltvuur en slechts enkele pyocyaneus-bacillen te bevatten, omgekeerd was het aantal miltvuurbacillen gering en dat der P-bacillen groot in de P-entplaats. Uit hart, lever en nier werden slechts miltvuurbacillen gekweekt, uit de milt ook enkele P-kolonies.

Doodsoorzaak: Miltvuur, vermoedelijk verhaast door de P-infectie.

Contrôlemuis C blijft leven.

De kans op snelle verspreiding van de miltvuurbacillen in de bloedbaan moet bij aanwending van de methode als beschreven bij proef 3 grooter worden geacht dan bij proef 2. Door de betrekkelijk groote hoeveelheid vloeistof wordt een opname in de bloedbaan bevorderd, waartoe de aanwendingswijze nog bijdraagt, daar door de injectie op de plaats van aanwending een zekere spanning ontstaat. Bij proef 3 speelde dus behalve de grootere hoeveelheid miltvuurcultuur de aanwendingswijze een groote rol in het ongunstige resultaat van het experiment met pyocyaneus. Bij de volgende proeven werd overwogen 1° de culturen met zoo min mogelijk vloeistof in te brengen, 2° de hoeveelheid pyocyaneusbacillen zoo groot mogelijk te nemen in verhouding tot de miltvuurbacillen. Toen bij een voorbereidende proef bleek, dat een muis een volle öse van een ééndaagsche agarcultuur van P 1 (die na een kleine snede met een schaar, voorzichtig onder de rughuid werd ingebracht) goed verdroeg, werd in het vervolg zooveel mogelijk de pyocyaneus-

cultuur op deze wijze aangewend. Eveneens werd aan stam P1 de voorkeur gegeven boven P2, omdat deze laatste in culturen reeds minder antagonistisch werkte dan P1 en ook bij proef 3 niet veel vertrouwen had gewekt.

Proef 4.

a. 1 öse miltvuuragarcultuur wordt gesuspendeerd in 0.2 cc bouillon.

b. Een ééndaagsche P1-agarcultuur wordt gereedgehouden.

Contrôlemuis A krijgt subcutaan rug 1 öse van suspensie a (hetgeen overeenkomt met 1/180 öse miltvuurcultuur).

Proefmuis B krijgt eerst een öse van cultuur b, daarna 1 öse van suspensie a, op dezelfde plaats van infectie.

Proefmuis C, bij welke 48 uur van te voren 1 öse van een ééndaagsche P1-agarcultuur onder de rughuid was ingebracht, wordt thans geïnfecteerd met 1 öse van suspensie a op dezelfde plaats.

Resultaat.

Contrôlemuis A sterft binnen 2×24 uur aan miltvuur.

De proefmuizen B en C blijven leven.

Opmerking. Alvorens muis C met miltvuur te infecteren, werd een onderzoek ingesteld of in de gemaakte wond nog levensvatbare P bacillen aanwezig waren. Dit bleek (door inbrengen van platinadraad en uitstrijken op agar) het geval te zijn.

Om de resultaten, verkregen bij proef 4, nader te be-

vestigen werden de proeven 5 en 6 op ongeveer dezelfde wijze genomen, wat betreft hoeveelheden en wijze van infectie, als beschreven bij proef 4, muis B.

Proef 5.

Contrôlemuis A wordt geïnfecteerd met 1/180 öse miltvuurcultuur.

Proefmuis B ontvangt eerst 1 öse P 1-cultuur, daarna 1/180 öse miltvuurcultuur.

Proefmuizen C en D subcutaan eerst 1/180 öse miltcuur, daarna 1 öse P 1.

Resultaat.

A sterft binnen 4×24 uur aan miltvuur.

B „ „ 3×24 uur „ Pyocyaneusinfectie.
(zoowel uit de entplaats als uit de organen konden slechts pyocyaneusbacillen gekweekt worden).

Proefmuizen C en D blijven leven.

Proef 6.

Controlemuis A subcutaan 1/180 öse miltvuurcultuur.

Proefmuizen B en C subcutaan eerst een öse P-agarcultuur, daarna 1/180 öse miltvuurcultuur.

Proefmuis D subcutaan eerst 1/180 öse miltvuur, daarna 1 öse P-cultuur.

Proefmuis E, die 2 dagen tevoren subcutaan geïnfecteerd was met 2 ösen P 3-agarcultuur, thans op dezelfde plaats 1/180 öse miltvuur.

Resultaat.

A sterft binnen 4×24 uur aan miltvuur.

B „ „ 2×24 uur „ pyocyaneusinfectie.

(Van entplaats en organen konden tinctorieel en cultureel slechts P-bacillen worden aangetoond.)

C en *D* blijven leven.

E sterft binnen 5×24 uur. Uitstrijkpraeparaten van de *entplaats* geven weinig miltvuurbacillen, veel P-bacillen te zien, eveneens levert de cultuur uit de entplaats veel P- en slechts enkele miltvuurkolonies.

Daarentegen worden uit de *organen* slechts *miltvuur*-kolonies gekweekt, terwijl ook uitstrijkpraeparaten uit bloed en organen slechts miltvuurbacillen vertoonen.

Doodsoorzaak : miltvuur.

Conclusies naar aanleiding van de miltvuur-pyocyaneus-proeven.

1°. Bij de pogingen, om een algemeene miltvuur-infectie tegen te gaan door middel van culturen van *B. pyocyaneus*, krijgt men den indruk, dat de wijze van infectie en de doseering een belangrijke rol spelen. Vooropgesteld moet worden, de dosis van de P-cultuur zoodanig te kiezen, dat deze niet doodelijk is voor het proefdier, daar de P-infectie sneller letaal kan verlopen dan de miltvuurinfectie.

2°. Is het van belang de dosis miltvuurbacillen klein te nemen in verhouding tot die der P-bacillen.

3°. De beide bacteriesoorten moeten zoo innig mogelijk met elkander in contact komen, om zoo spoedig mogelijk inwerking van P op miltvuurbacillen te verkrijgen.

4°. De hoeveelheid vloeistof, die met de bacteriën

wordt ingebracht en de druk, waaronder ze worden ingebracht, moeten zoo klein mogelijk zijn.

Daar bij de proeven 1 en 3 met deze factoren geen rekening werd gehouden, wordt bij de beoordeeling van het resultaat der proeven in het algemeen slechts melding gemaakt van de uitkomsten der proeven 2, 4, 5 en 6, daar bij deze proeven de genoemde gedachtengang wel werd gevolgd.

Wij zien dan, dat van de gelijktijdig met miltvuur en stam P 1 geïnfecteerde muizen *bleven leven* :

bij proef 2:	1	van	1.
„ „ 4:	1	„	1.
„ „ 5:	2	„	3.
„ „ 6:	2	„	3.

P 1, 48 uur tevoren ingebracht, voorkwam miltvuurdood bij proef 4, zoodat bleven leven :	1	„	1.
--	---	---	----

Met stam P 1 en miltvuur geïnfecteerd bleven leven :	7	van	9.
--	---	-----	----

De 4 contrôlemuizen, gebruikt bij deze proeven stierven aan *miltvuur*. Uit 2 muizen, gestorven na infectie met P 1 en *miltvuur*, werd slechts de *B. pyocyaneus* gekweekt, zoodat deze mag beschouwd worden als de veroorzaker van den dood, ofschoon de *B. anthracis* zeer zeker een invloed in ongunstigen zin moet hebben uitgeoefend.

De muis geïnfecteerd met P 3 en *miltvuur* stierf aan *miltvuur*.

Van 10 met *Pyocyaneus* en miltvuur geïnfecteerde muizen bleven 7 in leven, 1 stierf aan miltvuur en 2 aan *pyocyaneus*infectie.

Bedenkt men bovendien, dat bij de proeven 5 en 6 met stam P 1, uit de gestorven muizen uit de entplaats der beide bacteriesoorten, de *B. anthracis* noch cultureel, noch tinctorieel was aan te toonen, terwijl dit bij de gestorven P 3-muis slechts in zeer gering aantal mogelijk was, dan mag uit de voorafgaande proeven de conclusie getrokken worden, *dat de B. pyocyaneus in vivo een antagonistische werking op den B. anthracis uitoefent, hetzij dan direct of indirect en dat stamverschillen een rol kunnen spelen voor de mate, waarin deze werking plaats heeft.*

Proeven met *B. pyocyaneus* en *B. septichaemiae haemorrhagicae*.

Voor deze proeven werd uitgegaan van een cultuur, gekweekt uit de longen van een rund, welke ter vaststelling van de doodsoorzaak naar de Rijksseruminrichting waren gezonden. Deze cultuur vertoonde alle eigenschappen der bacillen van de groep der haemorrhagische septichaemie, zoodat de diagnose: Wild- und Rinderseuche werd gemaakt. Gemakshalve zal in den vervolge van „ovale bacillen” worden gesproken. De cultuur werd door muizenpassage voldoende virulent gemaakt.

Proef I.

a. 2 ösen ovale bacillen worden gesuspenderd in 1 cc. physiologische NaCl-oplossing.

b. 1 öse P 1-bacillen wordt gesuspendeerd in 1/2 cc phys. NaCl opl.

Contrôlemuis A wordt subcutaan aan den rug ingespoten met 1/2 cc suspensie a.

Proefmuis B wordt subcutaan rug ingespoten met een mengsel van 1/2 cc suspensie a en 1/2 cc suspensie b.

Resultaat :

A sterft binnen 2×24 uur. Uit alle organen worden ovale bacillen gekweekt.

B sterft binnen 24 uur. Uit entplaats en organen worden slechts P-bacillen gekweekt.

Conclusie: De wijze van infectie was vermoedelijk oorzaak, dat de *B. pyocyaneus* te pathogeen was, dan dat er tijd was om een algemeene antagonistische werking te ontplooiën. Van plaatselijk antagonisme was vermoedelijk wél sprake. Terwijl men mag aannemen, dat beide infecties elkander ongunstig hebben beïnvloed.

Proef 2.

a. 3 ösen ovale bacillen worden gesuspendeerd in 1,5 cc physiol. NaCl-oplossing.

b. 1 öse P 1-bacillen wordt gesuspendeerd in 1 cc. phys. NaCl-oplossing.

Contrôlemuis A wordt subcutaan aan den rug ingespoten met 0.5 cc. van suspensie a.

Proefmuis B krijgt op dezelfde wijze een mengsel van 0.5 cc van a en 0.1 cc van b.

Proefmuis C was 4 dagen te voren geïnfecteerd met

1 öse P 1-bacillen subcutaan rug en kreeg thans op dezelfde plaats een injectie van 0.5 cc van suspensie a.

Resultaat.

Muis A sterft in 24 uur, uit alle organen worden *ovale bacillen* gekweekt.

B. sterft in 24 uur; uit de organen worden ovale bacillen in grooten getale, P-bacillen daarentegen in geringe aantal gekweekt. Uit de entplaats worden slechts P-bacillen gekweekt.

Proefmuis C sterft in 24 uur, uit de organen worden slechts ovale bacillen gekweekt.

Conclusie. Noch de gelijktijdige, noch de voorafgaande infectie met P-bacillen konden den dood tengevolge van de infectie met ovale bacillen verhoeden. Wel schenen op de entplaats de ovale bacillen door P-bacillen zoodanig te zijn geïnfluenceerd, dat ze niet meer te kweken waren. Neemt men in aanmerking, dat uit de organen de ovale bacillen wél gelijktijdig met de P-bacillen konden worden gekweekt, dan mag hieruit wel tot een lokaal antagonisme van *B. pyocyaneus* worden geconcludeerd.

Daar de contrôlemuis eenige uren later stierf dan de beide proefmuizen, kan hier wat betreft de algemeene werking eerder worden gesproken van samenwerking dan van een antagonisme der beide bacteriesoorten.

Proef 3.

Controlemuis A krijgt subcutaan 1 öse agarcultuur van ovale bacillen.

Proefmuis B krijgt eerst 1 öse agarcultuur van ovale bacillen, daarna 1 öse P 1-bacillen subcutaan aan den rug.

Resultaat.

A sterft binnen 48 uur.

B sterft binnen 48 uur.

Uit de organen van beide muizen worden slechts ovale bacillen gekweekt.

Proef 4.

Om even als bij de proeven met miltvuur de verhouding van het aantal P-bacillen zoo groot mogelijk te maken ten opzichte van dat der andere, te onderzoeken bacteriën, werden minder ovale bacillen ingebracht.

a. 2 ösen ovale bacillen worden gesuspenderd in 0,1 cc. bouillon.

Contrôle-muis A krijgt 2 ösen van *a* subcutaan (dit komt overeen met $1/25$ öse ovale bacillen).

Proefmuis B krijgt eerst een öse *a*, daarna 1 öse P 1-agarcultuur, daarna weer 1 öse *a*, alle terzelfder plaatse onder de rughuid.

Proefmuis C kreeg 4 weken tevoren 1 öse P 2 en een week voor de proef 1 öse P 1, thans 2 ösen van *a*.

Resultaat.

A sterft binnen 48 uur, uit alle organen worden ovale bacillen gekweekt.

B sterft binnen 48 uur, uit entplaats en organen worden de beide bacteriesoorten gekweekt.

C sterft eveneens binnen 48 uur. Uit entplaats en organen worden slechts ovale bacillen gekweekt.

Conclusie.

Bij de proeven 3 en 4 was noch bij gelijktijdige, noch

bij voorafgegane enting met *B. pyocyaneus* van eenige antagonistische werking op de ovale bacillen iets te merken.

B. pyocyaneus en B. rhusiopathiae suis.

Een vlekziekte-agarcultuur, gekweekt uit de nier van een aan vlekziekte gestorven varken, werd door passage door een muis virulenter voor deze diersoort gemaakt.

De oppervlakten van 2 agarculturen, gekweekt uit de organen van deze muis, werden gesuspendeerd in 0.5 cc bouillon (suspensie V).

Contrôlemuis A krijgt subcutaan 2 ösen V.

Proefmuis B krijgt subcutaan eerst 1 öse V, daarna 1 öse P 1, daarna wederom 1 öse V.

Proefmuis C. 1 öse V + 1 öse P 2 + 1 öse V.

Proefmuis D. 1 öse V + 1 öse P 3 + 1 öse V.

Resultaat.

Contrôlemuis A sterft binnen 4 dagen. Uit entplaats en organen worden slechts vlekziektebacillen gekweekt.

B. sterft binnen 4 dagen. Uit de entplaats worden enkele vlekziekte-, daarentegen veel P-kolonies gekweekt. Uit de organen is het aantal gekweekte vlekziekte-kolonies veel grooter dan dat der P-kolonies.

C sterft eveneens binnen 4 dagen. Ook hier vnl. vlekziekte uit de organen en vnl. P uit de entplaats.

D sterft binnen 3 dagen. Uit de entplaats worden slechts P-bacillen, uit de organen worden beide bacteriesoorten gekweekt.

Conclusie.

Geen van de 3 pyocyaneusstammen vermocht eenigen invloed in antagonistischen zin uit te oefenen op de algemeene infectie met vlekziekte. Wel was op de entplaats eenige antagonistische werking te bespeuren, vnl. bij muis D. Bij deze laatste werd misschien de dood door de dubbele infectie verhaast.

B. Pyocyaneus en streptococcus equi.

De oppervlakte van een streptococcus-equi-serum-agarcultuur wordt gesuspendeerd in 1 cc bouillon (suspensie D).

Controlemuis A ontvangt subcutaan 2 ösen D.

Proefmuis B krijgt eerst 1 öse P1-agarcultuur, daarna 2 ösen D. ;

Proefmuis C krijgt eerst 1 öse P2-agarcultuur, daarna 2 ösen D. ;

Proefmuis D krijgt eerst 1 öse P3-agarcultuur, daarna 2 ösen D.

Resultaat.

A sterft na 5 dagen. Uit de organen wordt streptococcus equi gekweekt.

B sterft na 5 dagen. Uit de entplaats worden streptococcen en P-bacillen gekweekt, uit de organen alleen P-bacillen.

C sterft na 2 dagen. Uit de organen wordt slechts *B. pyocyaneus* gekweekt.

D blijft leven.

Conclusie.

Het feit, dat bij muis B na 5 dagen de streptococcen

naast de P-bacillen uit de entplaats konden worden gekweekt, duidt op weinig of geen antagonistische werking. Daarentegen trekt het de aandacht, dat uit de organen van deze muis, evenmin als uit die van muis C de streptococcen konden worden gekweekt, zoodat men den indruk krijgt, dat de beide muizen aan de P-infectie zijn gestorven. Daar echter de *B. pyocyaneus*, op de beschreven wijze en in de beschreven hoeveelheid toegediend, niet doodelijk voor de muizen was gebleken, moet in beide gevallen gedacht worden aan een samenwerking der beide bacteriesoorten, waardoor de op zichzelf weinig pathogene *B. pyocyaneus* meer zijn invloed op het organisme van de muis kon doen gelden, zich sneller in het muizenlichaam verbreidde en instaat was den pyocyaneusdood te veroorzaken. — Alleen bij muis D was het mogelijk, dat door de gelijktijdige infectie met P de dood tengevolge der goedaardige droes-infectie werd tegengegaan.

B. pyocyaneus en B. enteritidis Gärtner.

Contrôlemuis A krijgt subcutaan 1 öse uit het condensvocht van een virulente Gärtner-cultuur (G).

Proefmuis B krijgt eerst 1 öse P 1, daarna 1 öse G.

Proefmuis C „ „ „ „ P 2, „ „ „ G.

Proefmuis D „ „ „ „ P 3, „ „ „ G.

Resultaat.

Contrôlemuis A sterft na 3 dagen. Uit alle organen wordt *B. enteritidis* gekweekt.

B sterft na 2 dagen. Uit *entplaats* slechts P-bacillen,

uit *nier* slechts P-bacillen, uit *milt* P- en Gärtner-bacillen, uit het *hart* daarentegen slechts Gärtnerbacillen te kweeken.

C sterft na 1 dag. Uit *entplaats*, *hart* en *nier* worden slechts P-bacillen, uit *lever* en *milt* worden zoowel P- als Gärtner-bacillen gekweekt, doch P in groteren getale.

D sterft na 6 dagen. Uit de *entplaats* worden veel P-, weinig Gärtnerbacillen gekweekt. Culturen uit *lever*, *milt*, *nier* en *hart* bevatten slechts Gärtnerbacillen.

Conclusie.

Bij de muizen B en C heeft de *B. pyocyaneus* op de *entplaats* een belangrijke antagonistische werking uitgeoefend. Overigens schijnen bij deze muizen beide infecties te hebben samengewerkt om het letale einde te bespoedigen.

Bij muis D krijgt men daarentegen eerder den indruk van een vertraging van den dood door de gelijktijdige infectie; zoodat de resultaten zeer zeker als twijfelachtig moeten worden gekwalificeerd.

B. Pyocyaneus en B. mallei.

Voor deze proeven werd gebruik gemaakt van *caviae*. *Contrôle-cavia* A krijgt 1 öse malleusagarcultuur in een vooraf gemaakt huidzakje, aan de binnenvlakte van de rechterdij.

Proefcavia B wordt eerst geïnfecteerd met 2 ösen agarcultuur van P 1 en onmiddellijk daarop met 1 öse éendaagsche malleus-agar-cultuur, beide in een huidzakje, aan de binnenvlakte der rechterdij.

Resultaat. Binnen 7 dagen vertoonden beide caviae echte malleuszweren op de rechterdij, zwelling van de rechter glandula inguinalis en orchitis. Beide dieren werden afgemaakt. Het sectiebeeld was van beide hetzelfde: hevige orchitis en periorchitis purulenta. De rechter testikel was dubbel zoo groot als normaal, de glandula inguinalis sterk vergroot en gevuld met pus, aan de inwendige organen werden geen afwijkingen waargenomen.

Culturen van de entplaats en de aangetaste deelen leverden slechts malleus op. Van *B. pyocyaneus* was niets meer aan te toonen.

Conclusie. Ofschoon de *B. pyocyaneus* in minstens 2× zoo groote hoeveelheid was ingebracht als de *B. mallei*, vermocht eerstgenoemde bacterie in geen enkel opzicht eenigen invloed uit te oefenen op het verloop van de malleus-infectie.

B. pyocyaneus en B. tuberculosis bovis.

Contrôle-cavia A. Van een glycerine-aardappelcultuur van *B. tuberculosis bovis* wordt met een spateltje een geringe hoeveelheid gebracht in een huidzakje, aan de binnenvlakte van de dij.

Proefcavia B krijgt eerst subcutaan aan de dij 1 öse P-agar-cultuur, daarna een even groote hoeveelheid tuberkelbacillencultuur als A.

Controlecavia C krijgt subcutaan aan de dij 1 öse P 1-agarcultuur.

Resultaat.

Na 3 weken vertoonen beide caviae A en B een etterend ulcus aan de binnenvlakte van de rechterdij en gezwollen rechter inguinaalklier.

Cavia C was na een week volkomen hersteld; d.w.z. op de plaats van infectie was slechts een goed genezen litteken te zien, terwijl het dier zelf, gedurende den na de infectie verlopen tijd, geenerlei ziekteverschijnselen had vertoond.

Beide caviae stierven na 7 en 8 weken aan algemeene tuberculose.

Conclusie. Van eenigen invloed van *B. pyocyaneus* op het verloop van de tuberculose-infectie was niets te bespeuren.

De bovenbeschreven proeven samenvattende komt men tot de volgende conclusie: Bij gelijktijdige infectie van witte muizen met: *B. pyocyaneus* en een van de nader te noemen bacteriesoorten: *B. anthracis*, *B. septichaemiae haemorrhagicae*, *B. rhusiopathiae suis*, *streptococcus equi*, *B. enteritidis* Gärtner en van caviae met *B. pyocyaneus* en respectievelijk *B. mallei* en *B. tuberculosis bovis*, is alleen bij de *B. anthracis* een duidelijk waarneembare antagonistische werking te constateeren, terwijl in de andere gevallen óf geen invloed, óf een invloed in omgekeerden zin (dus eerder een samenwerking) valt op te merken.

VII

PYOCYANASE

Bij de proeven met pyocyanase werd niet gestreefd naar een dieper ingaan op de ingewikkelde biologische en chemische eigenschappen van deze substantie, doch werd slechts van deze stof gebruik gemaakt om de door *B. pyocyaneus* in bouillon verwekte, antagonistisch werkende stoffen in zooveel sterker concentratie toe te passen.

Bij de bereiding van de pyocyanase werd het recept gevolgd, aangegeven door *Emmerich* en *Löw* in hun eerste publicatie, waarbij de 4—6 weken oude P-bouilloncultuur, na filtratie en dialysatie werd ingedampt in vacuum bij 20—30° C. op 1/12 van het volume (later concentreerden deze schrijvers op 1/10). De indamping in de volgende proeven geschiedde *niet* in vacuum en had plaats bij een temperatuur van 45° C., (nl. voor een gedeelte van de niet-gedialyseerde pyocyanase.) Voor de gedialyseerde *P* was het noodzakelijk onmiddellijk na de dialysatie in te dampen, door verhitting op een kokendwater-bad, daar de, door het dialyseeren, met water verdunde vloeistof een uitstekende voedingsbodem bleek te zijn voor bacteriën, zich bij de bescheiden hulp-

middelen, waarover te beschikken viel, gemakkelijk infecteerde en daardoor, bij den langen duur van de indamping bij betrekkelijk gunstige temperaturen, gemakkelijk vol zou zijn gegroeid met luchtbacteriën.

Nu geven *E.* en *L.* wel aan, dat de op 1/10 van het volume geconcentreerde, gefiltreerde en gedialyseerde pyocyaneuscultuur door $1\frac{1}{2}$ uur verhitten op een waterbad bij 100° zijn agglutineerende en bacteriolytische werking behoudt; dit komt echter niet overeen met de proeven van *Ohkubo*, die vond, dat het lipoid, waaraan door hem de bacteriolytische werking wordt toegeschreven, de eigenschappen van lecithine bezit, nl. in eiwitoplossing zijn thermostabiliteit verliest.

De proeven met de gedialyseerde, verhitte *P* kunnen toch eenige waarde hebben, nl. om aan te toonen, dat indien er werkelijk bacteriolytisch werkende lichamen in aanwezig zijn geweest, deze dan toch zeker niet thermostabiel zijn.

Daar evenwel het voorschrift van *E.* en *L.* niet kon worden opgevolgd, mogen uit de hier beschreven resultaten geen conclusies worden getrokken over de eigenschappen van het door *E.* en *L.* bereide praeparaat. Daar de niet-gedialyseerde *P* uit den handel hoogstwaarschijnlijk op ongeveer dezelfde wijze wordt bereid als hier wordt beschreven (alleen is de concentratie vermoedelijk 1/10 inplaats van 1/12), kunnen over de bactericide werking van dit praeparaat wel conclusies worden gemaakt, zonder dat daarmee is uitgemaakt of de

bactericide werking te danken is aan een specifieke stof (ferment of lipoid). De niet-verhitte, niet-gedialyseerde *P* bevat, behalve de zouten en alcaliën (waaraan zeker een deel van de werking moet worden toegeschreven) ook alle stoffen, die aanwezig moeten zijn in *P*, bereid volgens E. en L. Uit de injecties bij proefdieren met deze vloeistof en met de Original Pyocyanase SS zijn daarom wel conclusies te trekken over de werking van deze stoffen tegen infectie met bepaalde lagere organismen.

Daar de resultaten van den beginne af ongunstig waren, werden deze *P*-injecties, ter besparing van proefdieren spoedig gestaakt.

Literatuur over Pyocyanase

Emmerich en Löw ²¹⁾, terugziende op de resultaten van Bouchard, die miltvuur kon genezen met levende *P*-bacillen, en Woodhead and Wood, die hetzelfde bereikten met gesteriliseerde *P*-culturen, hadden de verwachting, dat men nog meer zou bereiken met pyocyanus-culturen, waarin het werkzame principe (volgens hen een enzym) 12 maal zoo sterk voorkomt als in normale culturen.

Hun eerste pyocyanase werd bereid door 600 cc *P*-bouilloncultuur (eenige weken oud) in vacuum bij 20—30° C. in te dampen tot 50 cc., te dialyseeren en te filtreeren door een Chamberlandfilter.

Konijnen met stijgende hoeveelheden hiervan ingespoten en tegelijkertijd met anthrax geïnfecteerd, bleven

leven, terwijl de contrôle-dieren stierven. Het gelukte niet een konijn tegen anthrax te immuniseeren door het tevoren in te spuiten met pyocyanase. Vermoedelijk omdat dit te snel uitgescheiden wordt. E. en L. gingen toen uit van de gedachte, dat er in het lichaam een verbinding wordt gevormd tusschen Pyocyanase en een eiwitlichaam, vermoedelijk afkomstig van de leucocyten. Deze verbinding zou moeten zijn „hochmoleculair en trypsinfest”, zou daardoor niet zoo gemakkelijk diosmotisch in de dierlijke cellen doordringen en niet zoo spoedig in verval overgaan. Zij streefden er toen naar, — en het scheen hun ook te gelukken, — volgens een bepaalde chemische methode pyocyanase met dierlijke eiwitten in de gewenschte „hochmoleculaire” verbinding over te brengen.

Deze verbinding noemden zij Pyocyanase-immun-proteïdine. Konijnen, hiermede langzamerhand in stijgende dosis behandeld, werden immuun tegen miltvuur. Behalve deze verbinding, bereid uit bloed, bereidden zij ook een dergelijk praeparaat uit rundermilt, dit werd genaamd Pyocyanase-milt-immunproteïdine.

E. en L. nemen aan, dat de bacteriën bij hun groei enzymen vormen die de bacteriën agglutineeren, dooden en oplossen. Deze enzymen noemen zij nucleasen. De nucleasen worden wederom ingedeeld in conforme en heteroforme, naar gelang zij slechts de eigen soort of ook bacteriën van andere soort kunnen oplossen.

B. pyocyaneus vormt nu van alle bacteriën het krach-

tigste, heteroforme nuclease en dat is de *pyocyanase*.

Volgens Emmerich en Löw is Pyocyanase het alcohol-neerslag der op 1/10 van het volume geconcentreerde, gefiltreerde en gedialyseerde pyocyaneus-bouillon-cultuur.

Voor hun proeven werd dit boven zwavelzuur gedroogd. De droge pyocyanasemassa werd dan telkens voor het gebruik opgelost in gedistilleerd water (1 gew. deel pyocyanase op 3 gew. dd. aq. dest.).

De resultaten met dit praeparaat verkregen bij miltvuur — als proefdieren dienden konijnen — waren opvallend goed; zoodat de schrijvers verklaren, dat hun middel alle miltvuurmiddelen verre overtreft.

Op grond van hun resultaten met pyocyanase en het pyocyanase-immun-proteïdine bouwden de schrijvers zelfs een nieuwe immuniteitsleer op. Volgens hen berust op de bactericide werking der bacteriolytische enzymen (waarvan pyocyanase er een is) en der immuunproteïdinen — welke behalve in het bloed ook in de lichaamsvochten vervat zijn — de natuurlijke en kunstmatige immuniteit.

Het werkzame principe der immuunsera zou nl. niets anders zijn dan deze verbinding van enzym met lichaams-eiwit, terwijl de agglutinatie het eerste stadium zou zijn van de oplossing der bacteriën door het immuunproteïdine.

Het verschil in gedrag der immuunsera tegenover de specifieke, pathogene bacteriën in vitro of in vivo zou berusten op de ál of niet aanwezigheid van zuurstof.

Sluit men deze in vitro uit, zoo worden de specifieke pathogene bacteriën door de immuunsera niet alleen geagglutineerd, maar ook gedood en opgelost, zooals proeven met cholera en typhus uitmaakten.

De pyocyanase lost in hoeveelheden van 1 cc millioenen bacteriën op, en wel van diphtherie, typhus, cholera en pest.

Waar Emmerich en Löw zulke belangwekkende mededeelingen deden, gepaard met zulke ingrijpende conclusies voor de immuniteitsleer en therapie, volgde spoedig strenge kritiek.

Klimoff ²²⁾ bestrijdt de meening van E. en L., bij de werking van de pyocyanase te doen te hebben met typische bacteriolyse en agglutinatie. Hij kan geen verband zien tusschen de werking der bactericide stoffen uit de pyocyaneusbouillon en alexinen, of welke specifieke stof dan ook, van het geïmmuniseerde organisme.

Hij toonde aan, dat 2 uur verblijf in damp van 100° C. de bactericide werking niet opheft.

Dietrich ²³⁾ vond zelfs in zeer verdunde oplossing de bactericide werking van de pyocyanase groot. Volgens hem is er geen evenredigheid tusschen de concentratie, tijd van inwerking en hoeveelheid der gebruikte pyocyanase. De snelheid der bactericide werking was zoo groot, als tot dan toe niet was waargenomen bij tryptische fermenten. Bovendien vond hij een groote thermostabiliteit van de bactericide kracht der pyocyanase, waarvoor

hij bij andere fermenten geen analogie vond. Zij kan zonder bezwaar tegen 2 uur verhitten bij 100°.

Een keukenzout-soda-oplossing van gelijke concentratie had vrijwel dezelfde bactericide werking. Dietrich schrijft deze dan ook toe aan storingen in den osmotischen druk. Vooral de alcalescentie werkt schadelijk. Vermoedelijk zijn er nog schadelijke stoffen van anderen aard in betrokken (b.v. hogere organische basen), want in verdunde oplossing en ondanks toevoeging van voedingsstoffen werkt pyocyanase nog bactericide, terwijl neutrale NaCl-oplossing in dezelfde concentratie en met dezelfde toevoegingen reeds onwerkzaam is.

P. Th. Müller ²⁴⁾ vindt 1° het bewijs niet geleverd, dat het bodembezinksel in oude culturen iets met agglutinatie te maken heeft.

2° gelukt het niet met oude bouillonculturen versche suspensies van *B. pyocyaneus* te agglutineeren, waaruit hij besluit, dat het agglutineeren niet behoort tot de eigenschappen der bouillonculturen.

Emmerich, Löw en Korschun ²⁵⁾ bespreken daarna de kritieken van de 3 genoemde onderzoekers.

Volgens hen verliest ook de *B. pyocyaneus* zijn levensvatbaarheid niet na 1 uur koken. De thermostabiliteit varieert bij variëteiten van *B. pyocyaneus* en bij de pyocyanase-paerparaten, daarvan bereid.

Het peptoniseerend enzym is niet identiek met de pyocyanase.

De op 1/10 van het volume geconcentreerde, gefil-

treerde en gedialyseerde pyocyaneuscultuur, die gedurende een half uur verhit is op een waterbad bij 100°, verliest de eigenschap gelatine te vervloeien, terwijl de agglutinerende en bacteriolytische werking behouden blijft.

Het protoplasma van de *B. pyocyaneus* verwekt volgens E. en L. 6 enzymen: a. katalase, b. een peptoniseerend, op trypsine gelijkend enzym, c. leb, d. casease, e. invertine en f. het bacteriolytische enzym Pyocyanase.

Het peptoniseerend enzym is dus thermolabiel, het bacteriolytische thermostabiel. Deze thermostabiliteit is echter geen bewijs, dat pyocyanase geen enzym is, daar het protoplasma van *B. pyocyaneus* ook thermostabiel is en er bovendien in het dierlijk organisme enzymen voorkomen met nog grooter thermostabiliteit.

De bactericide werking berust noch op osmose, noch op alcaliciteit, daar isotonische NaCl-oplossing niet zoo bactericide werkt en neutralisatie of dialyse aan de bactericide werking geen afbreuk doet. De veranderingen der bacteriën in pyocyanase onderscheiden zich van die in isotonische NaCl-oplossing quantitatief en kwalitatief.

De mogelijkheid dieren te genezen en vooral de mogelijkheid van het bereiden van immuunproteïdine zouden pleiten voor de enzym-natuur.

In denzelfden jaargang van het Centralblatt für Bakteriologie gaat *Dietrich* ²⁶⁾ weer op dit verweer in. Hij toont aan, dat de osmotische druk van pyocyanase gelijk

staat met die van een 3—3, 8% NaCl-oplossing. Bacteriën gaan hierin even snel te gronde als in pyocyanase.

Tevens heeft het alcaligehalte invloed, daar volgens de Vries de alcaliciteit de osmotische werking op plantencellen versterkt.

Dietrich vindt, dat E. en L. het werkzame principe niet voldoende geïsoleerd hebben.

Vaerst ²⁷⁾ bereidde pyocyanase volgens een eigen methode, waarbij hij o.a. gebruik maakte van ammoniumsulfaat. Hij concludeerde, dat pyocyanase miltvuur kan tegengaan en voor miltvuurbacillen oplossende eigenschappen heeft. Konijnen kunnen met waterige pyocyanase-oplossing (1 deel gedroogde P op 10 deelen water) niet geïmmuniseerd worden tegen miltvuur. Wel gelukt immunisatie tegen miltvuur door pyocyanase-serum; daarentegen niet met pyocyanase-milt-extract, evenmin zag hij gunstig resultaat door gebruik te maken van miltvuurculturen, die met pyocyanase waren behandeld.

Tavernari ²⁸⁾ vond de pyocyanase niet zoo thermosta-biel, de activiteit van deze vloeistof neemt af bij verwarming gedurende 30 minuten bij 100° C., maar blijft toch aanzienlijk. Ook hij vermeldt goede resultaten bij miltvuur.

Raubitschek en Russ ²⁹⁾ komen ingevolge hun proeven tot de conclusie: 1° dat de bactericide werking van pyocyanase niet berust op een ferment, daar het werkzame bestanddeel onafhankelijk van temperatuur en reactie

zijn bactericide kracht ontwikkelt, niet door alcohol wordt neergeslagen en bovendien een groote coctostabiliteit bezit, die niet eigen is aan fermenten.

2°. Dat het bactericide vermogen berust op het aanwezig zijn van een lichaam, dat zich door groote thermostabiliteit en door zijn oplosbaarheid in alcohol, aether, benzol, benzine, aceton, petrolaether en chloroform kenmerkt. Verdere onderzoekingen zouden moeten uitmaken of dit lichaam als rein lipoid of als bactericide werkende zeep in de pyocyanase voorhanden is (Noguchi).

Sachs ³⁰⁾ en *Landsteiner* ³¹⁾ vonden eveneens een werkzaam bestanddeel met de eigenschappen van lipoiden. *Ohkubo* ³²⁾ kon door alcohol-aether-extractie uit pyocyanase een sterk bactericide, waarschijnlijk lipoid lichaam bereiden, dat haemolytisch werkte en door complementbinding de haemolyse remde.

In vitro werkte het ontgiftend op diphtherie- en tetanus-toxine.

Het was *thermostabiel*, doch kreeg in *eiwitoplossingen* een *thermolabiel* karakter.

Ook *Pane* ³³⁾ beschouwt het werkzame bestanddeel van de pyocyanase als een lipoid.

Volgens *Emmerich* en *Löw* ³⁴⁾ is de afname der bactericide werking van P door behandeling met aether niet het gevolg van de extractie van een lipoid maar vnl. van de benadeeling van het enzym door de peroxyden en andere verontreinigingen van de aethers. Verder is de bactericide werking van het aetherische extract steeds

geringer dan van de origineele pyocyanase. Tenslotte vinden zij niet bewezen, dat het aetherische extract lipoiden bevat.

Van het groote aantal publicaties over de therapeutische werking van pyocyanase kunnen de volgende referaten een inzicht geven over de waarde welke men aan het praeparaat hechten mag uit een oogpunt van therapie.

Bermbach ³⁵⁾ constateerde bij subcutane injectie van pyocyanase bij den mensch onaangename nevenverschijnselen en adviseert te beginnen met een dosis van 0,01 cc en langzamerhand deze te verhoogen.

Hofbauer ³⁶⁾ gebruikte de pyocyanase bij gonorrhoe van de vrouw. De gonococcen verdwenen spoedig, doch herstel was niet duurzaam door onvoldoende dieptewerking.

Schlippe ³⁷⁾ kon slechts gunstigen invloed van pyocyanase constateeren bij diphtherie, bij gelijktijdige behandeling met serum. Het gelukte niet diphtheriebacillen te dooden bij persisterende en chronische gevallen.

Jehle ³⁸⁾ schrijft de gunstige werking van pyocyanase (in spray ingespoten in de keelholte) op meningococcen daaraan toe, dat het slijm, waarin deze coccen zich bevinden, niet stolt.

Escherich en *Jehle* ³⁹⁾ vermelden goede resultaten bij griep van kinderen.

Zucker ⁴⁰⁾ had succes bij diphtherie en angina (zonder diphtherie).

Mühsam en Weil ⁴¹⁾ konden diphtheriebacillen in één- en tweedaagsche bouillonculturen dooden door toevoeging van 1/10 der hoeveelheid pyocyanase.

Braun ⁴²⁾ had ook goede resultaten bij diphtherie, vooral wat betreft de verweking der membranen. Bij phlegmonen en ulceraties kon hij snelle reiniging van de wonden waarnemen.

Saar ⁴³⁾ vindt *P* een uitstekend lokaal werkend middel voor behandeling van anginen, veroorzaakt door *B. diphtheriae*, strepto- en staphylococcen.

Naast de *P*-behandeling is echter de serumbehandeling bij diphtherie van kinderen noodig. Bij volwassenen daarentegen zou *P* de serumbehandeling overbodig maken.

Löwenstein ⁴⁴⁾ beproefde de bactericide werking van *P* ten opzichte van de bacteriën op cornea en conjunctiva. Hij had hiermede succes bij de volgende lagere organismen: staphylo-, strepto-, gono-, pneumo-, en diplococcen, micrococcus catarrhalis en *B. pyocyaneus*, echter slechts wanneer de bacteriën oppervlakkig waren. — *L.* komt tot de conclusie, dat *P.* voor zulke oppervlakkige gevallen en prophylactisch voor urethritis gonorrhoeica een groote toekomst zal hebben.

Podwissozki ⁴⁵⁾ beveelt *P* aan bij diphtherie en cholera.

Sabolotny ⁴⁶⁾ verklaart de werking van *P* voor problematisch, beweert, dat zij schadelijk kan werken en onderstelt, dat als de werking schadelijk zou zijn voor bacteriën, zij ook schadelijk zou zijn voor het weefsel.

Weil ⁴⁷⁾, *Trautman* ⁴⁸⁾, *Gross* ⁴⁹⁾, *Fackenhain* ⁵⁰⁾, *Strubell* ⁵¹⁾, *Koslowsky* ⁵²⁾, constateeren alle een gunstigen invloed van *P* bij diphtherie. Voornamelijk schijnt deze invloed echter van belang te zijn voor het verweken der membranen, terwijl serumbehandeling tegelijkertijd wordt aanbevolen.

Prohl ⁵³⁾, *Levy* ⁵⁴⁾ konden de bactericide werking van *P* in spray ten opzichte van meningococcen in de keelholte constateeren.

Sellei ⁵⁵⁾ kon bij gonorrhoe geen gunstig resultaat opmerken, door gebrek aan dieptewerking van het praeparaat. *Spatz* kwam tot hetzelfde resultaat en nam bij 36 gevallen 2 maal intoxicatieverschijnselen waar.

Hatzfeld ⁵⁶⁾ had goede resultaten bij ulcus molle.

Guttmann ⁵⁷⁾ behandelde lacunaire tonsillitis met *P*-spray en had hiermede succes.

Schapiro ⁵⁸⁾ onderzocht den invloed van *P* op bacteriën en verdeelde de onderzochte bacteriën in 3 groepen, n.l. die welke *sterk*, *matig* en *niet* veranderd werden. *Groep I*: diphtherie, pseudodiphtherie, xerose, cholera, strepto-, pneumo-, gono-, meningococcen en *B.*-dysenteriae.

Groep 2: *B. typhi*, *paratyphi* en *pneumoniae*.

Groep 3: *B. coli*, *paratyphi B* en *enteritidis*.

Hij bestrijdt de meening, dat de gunstige werking slechts aan de sterke zoutconcentratie is toe te schrijven.

Tevens kon hij waarnemen, dat kleine niet-doodelijke doses choleravibrionen tegelijk ingespoten met *P*, bij proefdieren, doodelijk konden worden.

Bocchia ⁵⁹⁾ vindt de werking van P slechts zwak en beperkt tot een kleine groep van bacteriën n.l. *miltvuur*, *diphtherie* en *cholera*.

De werking is minder op typhus, meningo-, pneumococcen en *B. pyocyaneus*, terwijl zij absoluut geen invloed heeft op staphylo- en streptococcen. Hij komt tot het resultaat, dat de werking niet beter is dan die van de zwakste desinfectantia en beveelt het middel niet aan.

Ohkubo ⁶⁰⁾ vond, dat de P in verdunning van 1 : 100 doodend werkt op trypanosomen en in verdunning van 1 : 500 reeds op spyrillen.

Hij schrijft dit toe aan de werking der lipoïden.

Sorensen ⁶¹⁾ kon bij persisterende diphtheriebacillen beter resultaat opmerken van behandeling met menthol dan van P.

Emmerich en *Löw* ⁶²⁾ oefenen kritiek uit op het artikel van *Bocchia* en verwijten hem, dat hij eigenbereide P, inplaats van P volgens *Emmerich* en *Löw* heeft genomen.

Isabolinsky ⁶³⁾ vond, dat de P uit *Linger's* laboratorium noch in vitro, noch in vivo bactericide eigenschappen had. Zij oefende een zwakken invloed uit op den groei van bacteriën en vertraagde den dood van muizen in geringe mate, bij gelijktijdige injectie van suspensies van bacteriën.

Fortineau ⁶⁴⁾ probeerde de onregelmatige werking van *Emmerich's* P te verbeteren en noemde het nieuwe praeparaat *Pyocyanéine*. De bereiding wordt echter niet vermeld. Hiermede kon hij herstel verkrijgen van milt-

vuur van schapen, zelfs als de injectie geschiedde 24 uur na de miltvuurinfectie. Eveneens had hij goede resultaten bij runderen, terwijl hij bij den mensch in 16 gevallen van miltvuur (waarbij 7 zware gevallen) in eenige dagen herstel kon verkrijgen, door 1—5 dagen na het begin der ziekte 10—20 cc Pyocyanéine in te spuiten.

De behandeling werd gecombineerd met behandeling met jodiumtinctuur en cauterisatie.

Silvestrini ⁶⁵⁾ kon bij experimenteele tetanusinfectie geen gunstigen invloed van P waarnemen, wel was vertraging van den dood te constateeren bij gelijktijdige injectie. In vitro werkte pyocyanase antitoxisch op tetanotoxine; in gunstige omstandigheden kon het hieraan zelfs zijn toxische werking ontnemen. Immunisatie met P tegen tetanotoxine was niet mogelijk.

Sonnenberger ⁶⁶⁾ deed proeven over de bactericide werking van P. Bacteriën hierin gebracht werden spoedig gedood. Pneumococcen in 3 minuten, diphtheriebacillen en streptococcen in 10 minuten, gono- en meningococcen en cholera-vibrionen in 5 minuten, staphylococcen en typhusbacillen in 2 uur, dysenteriebacillen in 3 en pest-bacillen in 6 uur. Nog sterker was de ontwikkeling-remmende kracht.

Bovendien nam hij een oplossende werking van het proteolytische ferment waar. Volgens schrijver staat de werking als geneesmiddel van de pyocyanase vast.

Volgens *Dawson* ⁶⁷⁾ kan men konijnen immuniseeren tegen miltvuur door middel van P; schapen echter niet.

Honecker ²⁰⁾ spoot muizen intraperitoneaal of subcutaan in met pyocyanase in doses van 0.01—0.1 cc prophylactisch, gelijktijdig en na de injectie met miltvuurbacillen, welke in doses van $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{200}$ öse intraperitoneaal werden ingespoten. In geen van de gevallen kon hij den miltvuurdood beletten, wel werd het leven tot 48 uur verlengd.

Cultuurproeven met Pyocyanase

Een pyocyaneus-bouilloncultuur werd na verblijf van 31 dagen in de broedstof bij 37°, gedurende 3 weken bewaard in de ijskast bij 4—8° C. Zooals vroeger reeds werd vermeld waren de pyocyaneusbacillen na verloop van dien tijd niet meer levensvatbaar. Na filtratie door een Maass' filter onder steriele cautelen werd een deel van de verkregen vloeistof bij 45° in Petri-doozen verdampt tot $\frac{1}{12}$ van het oorspronkelijke volume van den bouillon. Van dit ingedampte filtraat werd telkens 0.5 cc in steriele buisjes overgebracht en hierin werd dan telkens een öse van een ééndaagsche agarcultuur van verschillende bacteriën gesuspendeerd.

Een ander deel van het filtraat werd ingedampt op een waterbad bij 100° en op dezelfde wijze behandeld.

Van de beide soorten buisjes werd na één dag en vervolgens na 7 dagen een platina-öse uitgestreken op cultuuragar en den dag daaropvolgende nagegaan, of de verschillende bacteriën gegroeid waren. Het resultaat kan blijken uit de volgende tabel.

Onderzochte Bacteriesoort.	Groei na één dag in:		Groei na 7 dagen in:		Contrôle Groei na één dag in steriel aqua dest.
	niet verhitte	verhitte	niet verhitte	verhitte	
	Pyocyanase.				
B. Coli	+	+	+	+	+
„ Proteus	+	+	+	+	+
„ Typhi	+	+	+	+	+
„ Par. A.	+	+	+	+	+
„ Par. B.	+	+	+	+	+
„ Anthracis	+	+	+	+	+
„ v/d Klein'sche K.Z.	+	+	+	+	+
Staphylococ. pyog.	+	+	+	+	+
Streptococ. equi	—	—			+
Streptococ. mastitidis	—	—			+
B. rhus. suis VII	—	+		—	+
B. cholerae gall.	—	—			—
B. viscosus equi	—	—			—
B. mallei	—	—			+
B. salmonicidae	—	—			+
Vibrio cholerae	—	—			+
„ El Tor	—	—			+
B. dys. Shiga-Kruse	—	+		—	+
B. diphtheriae	—	—			+
B. pyocyaneus	+	+	+	+	+

Uit deze proeven blijkt, dat de bactericide werking van pyocyanase — tot 1/12 van het oorspronkelijke

volume van den bouillon ingedampt — vrijwel gelijk is voor bij 45° of bij 100° C. ingedampte pyocyanase.

Zij is nihil voor *B. coli*, *proteus*, *typhi*, *paratyphi A* en *B. anthracis*, de bacil van de Klein'sche kippenziekte, *staphylococcus pyogenes* en *B. pyocyaneus*.

Integendeel deze bacteriën vertoonen groei in dit medium. Daarentegen worden de volgende bacteriën in de genoemde vloeistoffen binnen 24 uur gedood: *streptococcus equi*, *streptococcus mastitidis*, *B. cholerae gallinarum*, *viscosus equi*, *mallei*, *salmonicidae*, *vibrio cholerae*, *vibrio El Tor*, *B. diphtheriae*.

B. rhusiopathiae suis en de bacil van Shiga Kruse werden in de eerste vloeistof binnen 24 uur, in de 2e binnen 7 dagen gedood. Werden de genoemde vloeistoffen nog weder ingedampt tot $\frac{1}{2}$ van haar volumina (dus $\frac{1}{24}$ van het oorspronkelijke volume van den bouillon), dan werden in 24 uur alle in de vorige proeven vermelde bacteriën gedood, behalve *B. anthracis* en *staphylococcus*.

In deze vloeistoffen verloor de *staphylococcus* na 2 dagen zijn levensvatbaarheid, de *B. anthracis* was echter na 31 dagen nog goed hieruit te kweken.

Vervolgens werd de op de bovenbeschreven wijze bereide pyocyanase (1 : 12) gedialyseerd. In een wijdmondsche stopflesch, gevuld met 300 cc gedestilleerd water werd de met 13 cc pyocyanase gevulde dialysator opgehangen. Beide vaten waren vooraf gesteriliseerd bij 100°, terwijl de voor den dialysator gebruikte varkensblaas gefractionneerd gesteriliseerd was, door verhitting bij

85°. Het geheel werd daarna geplaatst in de ijskast bij 4—8° C. Na 4 dagen werd toen de buitenvloeistof onderzocht op het zoutgehalte door titratie met Ag—NO_3 -oplossing, met kaliumchromaat als indicator.

Het zoutgehalte bleek toen nog 1 : 1000 te zijn; de pyocyanase zelf bevatte oorspronkelijk 2½% zouten. De gedialyseerde vloeistof werd weer ingedampt. Op de herhaaldelijk beschreven wijze werden buisjes gevuld, ieder met ½ cc van de gedialyseerde pyocyanase, in ieder buisje werd wederom 1 öse agarcultuur van bacteriën gebracht en het resultaat na één, twee en zeven dagen opgenomen.

De tabel op bldz. 85 geeft hiervan een overzicht.

Opmerking. Na verblijf van één dag in deze pyocyanase was van verschillende bacteriën duidelijk zichtbare groei waar te nemen, zoodat na 2 dagen alleen die bacteriën op agar werden onderzocht, die geen groei hadden vertoond.

Uit nevenstaande tabel blijkt, dat het bactericide vermogen der pyocyanase door de dialyse aanzienlijk is afgenomen. Een belangrijk deel van deze werking moet dus op rekening gesteld worden van de zoutconcentratie, die zooals boven vermeld werd 2,5% bedroeg, terwijl de sterk alcalische reactie bovendien zijn invloed deed gelden. Dit komt overeen met de proeven van Dietrich, die voor de niet-gedialyseerde pyocyanase een osmotischen druk vond overeenkomend met een zout-

gehalte van 3—3,8% NaCl-oplossing en aantoonde, dat bacteriën in een dergelijke vloeistof even snel te gronde gaan als in pyocyanase. Eveneens toonde de Vries reeds aan, dat de alcaliciteit de osmotische werking op plantencellen verandert en versterkt.

Onderzochte bacteriesoort.	Groeï na verblijf in pyocyanase gedurende		
	1 dag.	2 dagen.	7 dagen.
B. Coli	+		+
B. Proteus	+		+
B. Typhi	+		+
B. Paratyphi A.	+		+
B. Paratyphi B.	+		+
B. Anthracis	+	+	+
B. v/d Klein'sche K.Z.	+		+
Staphylococcus	+		+
Streptococcus Equi	—		
id. Mast.	+	+	—
B Rhusiopath. Suis VII	+	+	—
B. Cholerae Gallin.	+	—	
B. Viscos. Equi	+	—	
B. Mallei	+		+
B. Salmonicidae	+		—
Vibrio Cholerae	+	+	—
Vibrio El Tor	+	+	—
B. Dys. Shiga Kruse	+	+	—
B. Diphtheriae	+		—
B. Pyocyaneus	+		+

**Pyocyanase bereid in: „Sächsisches Serumwerk und
Institut für Bakteriotherapie” te Dresden**

Volgens Kolle und Wassermann wordt in genoemd instituut Pyocyanase bereid volgens voorschrift van Emmerich und Löw. Het praeparaat komt in den handel: „dialysiert” en „niet-dialysiert”. Naar het niet-gedialyseerde praeparaat werd een onderzoek ingesteld op het bactericide vermogen.

De donkerbruine vloeistof komt in den handel in fleschjes van bruin glas, gesloten met geparafineerde kurkjes, met een inhoud van 10, 20, 50 en 100 cc.

Bij de eerste zending bleek reeds dadelijk, dat de in de gebruiksaanwijzing geroemde „bakteriëntötende” kracht wel niet groot zou zijn, daar bij opening van het fleschje de troebele donkerbruine vloeistof een ondragelijken geur verspreidde. Bij nader onderzoek bleek de vloeistof, behalve anaerobe bacteriën, ook Grampositieve en -negatieve coccen, coliachtige bacteriën en andere, ook met behulp van „Matzushita's Diagnostik” niet nader te determineeren, bacteriën te bevatten.

De tweede zending bleek bij onderzoek geen levende bacteriën te bevatten; deze vloeistof werd onderzocht op haar bactericide vermogen. Daartoe werd in steriele buisjes telkens $\frac{1}{2}$ c.c. pyocyanase gebracht.

Van eendaagsche agarculturen van bacteriën werd telkens 1 öse gesuspenseerd in 1 c.c. steriele bouillon en van deze suspensies werd dan telkens 1 öse gebracht in de pyocyanase, terwijl tegelijkertijd een dergelijke öse met tot 45° afgekoelde agar werd vermengd en dit mengsel uitgegoten in steriele petrischalen.

Na een dag werden de kolonies in deze agarplaten geteld.

Na een dag verblijf in de pyocyanase werd telkens 1 öse van ieder buisje op dezelfde wijze in gesmolten en tot 45° afgekoelde agar gebracht, deze agar werd uitgegoten in petrischalen en den volgenden dag hiervan het aantal kolonies geteld.

Onderstaande tabel geeft een overzicht van het aantal ingebrachte bacteriën en het aantal daarin aanwezig na een verblijf van 24 uur in de vloeistof.

Onderzochte bacteriesoort.	Aantal ingebrachte bacteriën	Aantal bacteriën na 24 uur.
B. Anthracis	1500	2000
Proteus vulg.	2000	10.000.000
Coli comm.	100.000	12.000.000
Typhi	100.000	15.000.000
Paratyphi A.	50.000	280.000
Paratyphi B.	150.000	50.000.000
Pyocyaneus	1.500	8.000
B. v/d Klein'sche K.z.	3.500.000	3.500.000
B. Viscos Eq.	300.000	0
Streptococ. Mast.	15.000	1.500.000
Staphylococ. Mast.	120.000	40.000

Op de boven beschreven wijze gelukte het niet de volgende bacteriën : *Vibrio cholerae*, *V. El Tor*, *B. cholerae gallinarum*, *B. dys. Shiga Kruse* en *B. rhusiopathiae suis* te onderzoeken, daar genoemde bacteriën, op deze wijze behandeld, op de agarplaten niet tot ontwikkeling kwamen.

Voor onderzoek van een 2^{de} fleschje Pyocyanase SS werd nagegaan of de ingebrachte bacteriën na respectievelijk 1, 2 en 7 dagen nog levensvatbaar waren. Hiertoe

werd telkens één öse van een ééndaagsche agarcultuur gebracht in een steriel buisje waarin $\frac{1}{2}$ cc pyocyanase. Na verblijf van het genoemde aantal dagen werd dan van elk buisje 1 öse uitgestreken op cultuuragar en den volgenden dag de groei beoordeeld.

Onderzochte bacteriesoort.	Na 1 dag	Na 2 dagen	Na 7 dagen	Contrôle Onderzoek na 1 dag in aq. dest.
	in Pyocyanase. SS.			
B. Anthracis	groei	groei	groei	geen gr.
B. Proteus Vulgaris	„	„	„	
B. Coli commune	„	„	„	
B Typhi	„	„	„	
B. Paratyphi A.	„	„	„	
B. Paratyphi B.	„	„	„	
B. Pyocyaneus	„	„	„	
B. v. d. Klein'sche K.z.	„	„	„	
V. Viscos Eq.	geen gr.	—	—	
Streptococcus Mast.	z. ger.	z. ger.	z. ger.	
Staphylococc. Pyog.	groei	groei	groei	geen gr.
B. Rhusiopathiae suis	„	geen gr.	—	
Vibrio Cholerae	geen gr.	—	—	
Vibrio El Tor	„	—	—	
B. van Shiga Kruse	groei	groei	groei	
B. Mallei	geen gr.	—	—	
B. Cholerae Galli- narum	„	—	—	
B. Diphtheriae	groei	—	—	

De volgende tabel geeft een overzicht van de bactericide werking van de verschillende pyocyanasen in 24 uur.

Onderzocht microorganisme in:	niet verhitte niet gedialys.	verhitte niet gedialys.	niet gedialys. „original”	gedialys.
	Pyocyanase.			
	Werd 1 öse agarcultuur der bacteriesoort in 24 uur gedood in $\frac{1}{2}$ cc. pyocyanase?			
B. Coli	neen	neen	neen	neen
Proteus	„	„	„	„
Typhi	„	„	„	„
Parat. A	„	„	„	„
Parat. B.	„	„	„	„
Anthraxis	„	„	„	„
B. v/d Kleinsche' K.z.	„	„	„	„
Staphylococ. pyog.	„	„	„	„
Streptoc. equi	ja	ja	ja	ja
Streptococ. mast.	„	„	neen	neen
B. Rhusiopath. suis	„	neen	„	„
Cholerae gallin.	„	ja	ja	„
Viscos. equi	„	„	„	„
Mallei	„	„	„	„
Salmonicidae	„	„	„	„
Vibrio cholerae	„	„	„	„
„ El Tor	„	„	„	„
B. dys. Shiga Kruse	„	neen	neen	„
Diphtheriae	„	ja	„	„
Pyocyaneus	neen	neen	„	„

Uit dit overzicht blijkt, dat de bactericide werking van de twee zelf-bereide pyocyanasen veel overeenkomst vertoont met die van de „Original-Pyocyanase”, alleen is zij krachtiger voor streptococcus mastitidis en voor B.-diphtheriae, daarentegen mag de bactericide werking van de gedialyseerde pyocyanase nihil genoemd worden.

Dierproeven met Pyocyanase

Proef 1.

Niet gedialyseerde, door verhitting bij 99° ingedampte Pyocyanase.

Contrôlemuis A wordt ingespoten aan den rug met 0.1 cc miltvuurbacillen-suspensie (uit een suspensie van 1 öse miltvuuragarcultuur in 20 cc phys. NaCl-oplossing).

Proefmuis B krijgt eerst een injectie van 0.1 cc. Pyocyanase, daarna 0.1 cc miltvuur-suspensie.

Contrôlemuis C krijgt subcutaan 0.1 cc Pyocyanase.

Resultaat. *Contrôlemuis A* sterft binnen 2 dagen. Uit alle organen wordt miltvuur gekweekt.

B sterft binnen 3 dagen. Uit alle organen wordt miltvuur gekweekt.

C blijft leven.

Proef 2.

Muis C van de vorige proef, die dus met pyocyanase was ingespoten, werd 12 dagen na die injectie intraperitoneaal ingespoten met 1 öse P-bacillen in 0.1 cc Phys. NaCl-oplossing.

Deze muis stierf binnen 24 uur. Immunitet ten opzichte van den *B. pyocyaneus* scheen niet aanwezig te zijn.

Proef 3.

Deze proef werd gelijktijdig verricht met dierproef 5 van de miltvuurproeven.

Controlemuis A kreeg 1/180 öse miltvuurcultuur subcutaan.

Proefmuis E had 3 dagen tevoren 0.2 cc pyocyanase subcutaan gekregen en werd nu geïnfecteerd met 1/180 öse miltvuurcultuur.

Proefmuis F kreeg eerst 0.1 cc. pyocyanase, daarna 1/180 öse miltvuurcultuur.

Resultaat. *A.* sterft binnen 4 dagen aan miltvuur.

E. „ „ 10 „ „ „

F. „ „ 2 „ „ „

Conclusie: De nietgedialyseerde, door verhitting ingedampde pyocyanase kan, noch van te voren, noch gelijktijdig met de miltvuurbacillen ingespoten, den miltvuurdood verhoeden.

Krijgt men van de preventieve enting den indruk van een vertraging van den letalen afloop, andererseits zou men bij gelijktijdige injectie aan een versnelling denken.

Proef 4.

Gedialyseerde pyocyanase.

Deze proef werd gelijktijdig verricht met dierproef 6 van de miltvuurproeven.

Contrôlemuis A krijgt subcutaan 1/180 öse miltvuur-agarcultuur.

Contrôlemuis B krijgt subcutaan 0.1 cc gedialyseerde pyocyanase.

Proefmuis F krijgt eerst 0.1 cc gedialyseerde pyocyanase, daarna 1/180 öse miltvuurcultuur.

Resultaat.

A sterft binnen 4 dagen aan miltvuur.

B blijft leven.

F sterft in 2 dagen aan miltvuur.

Conclusie. De antagonistische werking van gedialyseerde pyocyanase bij gelijktijdige injectie met miltvuur is nihil.

Proef 5.

Original Pyocyanase S S en *Niet-gedialyseerde, verhitte pyocyanase.*

Deze proef werd gelijktijdig verricht met proef 4 omtrent *B. septichaemiae haemorrhagicae*.

Contrôlemuis A krijgt 1/25 öse ovale bacillen subcutaan.

Proefmuis D. Deze muis was 30 dagen tevoren ingespoten met 0.1 cc Pyocyanase SS en kreeg thans 0.1 cc niet-gedialyseerde, door verhitting bij 99° ingedamppte pyocyanase en daarna 1/25 öse ovale bacillen.

Resultaat.

Contrôlemuis A sterft binnen 2 dagen. Uit alle organen worden ovale bacillen gekweekt.

B. sterft in 1 dag. Uit entplaats en organen worden ovale bacillen gekweekt.

Conclusie.

Van antagonistische werking van pyocyanase ten opzichte van ovale bacillen was bij deze proef niets te

bemerken, noch preventief van de „original” Pyocyanase, noch van de gelijktijdige injectie van de verhitte pyocyanase.

Proef 6.

Gedialyseerde pyocyanase.

Deze proef werd gelijktijdig verricht met de dierproeven omtrent *B. rhusiopathiae* suis.

Contrôlemuis A krijgt subcutaan 2 ösen suspensie van vlekziektebacillen (oppervlakte van 2 agarculturen in 0.5 cc bouillon).

Proefmuis E. Eerst 0.1 cc gedialyseerde pyocyanase, daarna 2 ösen V;

Proefmuis F. Eerst 0.1 cc gedialyseerde pyocyanase, daarna 2 ösen V.

Proefmuis G. Deze muis had 5 dagen te voren 0.1 cc gedialyseerde pyocyanase subcutaan ontvangen en werd thans geïnfecteerd met 2 ösen V.

Resultaat.

Contrôlemuis A sterft binnen 4 dagen aan vlekziekte.

E sterft binnen 4 dagen. Uit entplaats en organen worden vlekziektebacillen gekweekt.

F sterft binnen 3 dagen. Uit entplaats en organen worden vlekziektebacillen gekweekt.

G sterft eveneens in 3 dagen aan vlekziekte.

Conclusie.

De antagonistische werking van gedialyseerde pyocyanase bij dierproef ten opzichte van vlekziektebacillen was in de vermelde proeven nihil.

*Proef 7.**Gedialyseerde pyocyanase.*

Deze proef werd gelijktijdig verricht met de dierproeven betreffende *goedaardige droes*.

Contrôlemuis A ontvangt subcutaan 2 ösen van een suspensie van streptococcus equi (bereid door de oppervlakte van een serumagarcultuur in 1 cc bouillon te suspendeeren.)

Proefmuis E krijgt eerst een injectie van 0.1 cc pyocyanase (gedialyseerd) daarna 2 ösen suspensie van streptococcus equi.

Resultaat.

A sterft na 5 dagen, *E* na 3 dagen. Uit de organen van beide wordt de streptococcus equi gekweekt.

Conclusie.

De antagonistische werking van gedialyseerde pyocyanase ten opzichte van streptococcus equi, bij gelijktijdige onderhuidsche applicatie, was bij de beschreven proeven nihil.

Résumé.

Bij gelijktijdige injectie van pyocyanase en miltvuurbacillen stierf bij proef 3 de proefmuis in 3, de contrôlemuis in 4 dagen aan *miltvuur*.

Hetzelfde resultaat leverde proef 4.

Bij proef 5 stierf de proefmuis in 1 dag, de contrôlemuis in 2 dagen aan infectie met *ovale bacillen*.

Bij proef 6 stierf één muis gelijktijdig, de andere een dag eerder dan de contrôlemuis. Ook de muis, die preven-

tief was ingespoten, stierf een dag eerder aan infectie met *plekziektebacillen*.

Bij proef 7 stierf de proefmuis in 3, de contrôlemuis in 5 dagen aan infectie met *streptococcus equi*.

In al deze gevallen ziet men dus een versnelling van het letale verloop na injectie van pyocyanase. Waar deze vloeistof 3 dagen te voren was geïnjectieerd, zag men bij proef 3 een vertraging van den miltvuurdood.

Bij proef 6, waar 5 dagen te voren was geïnjectieerd, zag men daarentegen weer een versnelling van het letale einde.

Alleen bij proef 1 zag men bij gelijktijdige injectie van pyocyanase en miltvuurbacillen de proefmuis één dag langer leven dan de contrôlemuis.

Conclusie. Van een gunstigen invloed op het ziekteproces bij injectie van *pyocyanase* en gelijktijdige infectie met *miltvuur*, *ovale bacillen*, *plekziektebacillen* of *streptococcus equi* is dus geen sprake, eerder ziet men een ongunstigen invloed, waarbij de mogelijkheid bestaat dat door den grooteren vochtrijkdom ter plaatse van de infectie de verspreiding in de bloedbaan gemakkelijker plaats vindt.

VIII

CONCLUSIES

1. *B. pyocyaneus* vormt in agar en bouillon stoffen, die antagonistisch werken op den groei van tal van bacteriën. In bouillon heeft overvloedig toetreden van lucht en ouderdom der culturen een gunstigen invloed op het vormen dezer stoffen. In agar treden ze reeds na 2 dagen maximaal op.

2. De antagonistische werking van *gefiltreerde* bouillonculturen is geringer dan van *niet-gefiltreerde*.

3. Steriele *pyocyaneus*bouillonculturen bezitten *geen bactericide* eigenschappen, noch gefiltreerd, noch ongefiltreerd.

4. De op bovenbeschreven wijze bereide *niet-gedialyseerde* pyocyanase werkt bactericide op : *streptococcus equi*, *streptococcus mastitidis*, *B. cholerae gallinarum*, *B. viscosus equi*, *B. mallei*, *B. salmonicidae*, *V. cholerae*, *V. El Tor*, *B. diphtheriae*, *B. rhusiopathiae suis*, en *B. dysenteriae* (*Shiga Kruse*.)

De werking is nihil voor *B. anthracis*, *coli*, *typhi*, *proteus*, *paratyphi A* en *B*, de bacil van de Klein'sche K.z., *staphylococcus pyogenes* en *B.-pyocyaneus*.

5. *Gedialyseerde, verhitte* pyocyanase werkt *niet* bactericide.

6. *B. pyocyaneus* groeit goed in tal van met andere bacteriën volgegroeide bouillonculturen. Na 24 dagen zijn van 20 onderzochte bacteriesoorten in een dergelijke gemengde cultuur met *B. pyocyaneus* er nog slechts 3 te kweeken. (Wat betreft streptococcen is dit resultaat in tegenstelling met dat van Tarro ⁷¹), die vond, dat streptococcen goed groeien in *pyocyaneus*voedingsbodems.)

7. In gemengde cultuur in melk wordt *B. pyocyaneus* binnen 5 dagen gedood door *B.-bulgaricus*.

8. Op agar gegroeide en wederom met agar vermengde, gedooide P-bacillen vertoonen antagonistische eigenschappen voor enkele bacteriesoorten.

9. *B. pyocyaneus* is in staat bij gelijktijdige subcutane infectie met *B. anthracis* bij witte muizen den miltvuurdood te voorkomen.

10. De antagonistische werking van *B. pyocyaneus* bij dierproeven is nihil voor *B. septichaemiae haemorrhagicae*, *B. rhusiopathiae suis*, *streptococcus equi*, *B. enteritidis* (Gärtner), *B. mallei* en *B. tuberculosis bovis*.

11. Van een gunstige werking van pyocyanase bij infectie van witte muizen met een der volgende bacteriesoorten: *B. anthracis*, *septichaemiae haemorrhagicae*, *rhusiopathiae suis* of *streptococcus equi* was niets te bespeuren.

IX

LITERATUUR

1. *Pasteur*. Etudes sur la maladie charbonneuse. (Comptes rend. ac. sc. 1877 t. 95 p. 107).
2. *Babès*. (Journal des connaissances medic. 1885 en 1886).
3. *Bouchard* (compt. rend. ac. sc. 1888.)
4. *E. de Freudenreich*. De l'Antagonisme des bactéries et de l'immunité qu'il confère aux milieux de culture. (Ann. de l'Inst. Past. 1888. II p. 200.)
5. *Charrin et Guignard*. Action du bacille pyocyanique sur la bactériémie charbonneuse. (C. rend. ac. sc. T 108. 1889.)
6. *Woodhead et Wood*. (C. rend. ac. sc. T 109. 1889.)
7. *Bouchard*. Actions des produits sécrétés par les microbes pathogènes. Paris 1890.
8. *Blagovestchensky*. Sur l'antagonisme entre les bacilles du charbon et ceux du pus bleu. (Ann. de l'Inst. Past. 1890.)
9. *Rumpf*. Die behandlung des Typhus abdominalis mit abgetöteten Kulturen des B. pyocyaneus. (D. Med. Wochenschrift 1893, n. 41.)
10. *Palleboni*. (La riforma med. 1894 ex Centr. Bl. f. Bakt. Bd. 18. p. 174.)

11. *Gross u. Kraus* (Archiv. f. Derm. u. Syph. Bd. 45. 1898.)
12. *Honl u. Bukowsky* Therapie der Schenkelgeschwüre mit Bakteriën-proteinen. (C. Bl. f. Bakt. Abt. I Bd. 26. 1899. p. 305.)
13. *Krause* (C. Bl. f. B. Bd. 31 Or. p. 673.)
14. *Zanfognini.* (Bull. dell. R. Accad. med. di Genova ex C. Bl. f. B. Bd. 37 Ref. p. 650.)
15. *Faltin.* Studien über Hetero- und Isantagonismus. (C. Bl. f. Bakt. Bd. 46 Or. 1908. p. 222.)
16. *Sellei.* (Z. schr. f. Urologie. Bd. 3. 1909. p. 271.)
17. *Fortineau* (Ann. de l'Inst. Past. 1910 p. 957.
18. *d'Agata* (Ann. de l'Inst. Past. 1910 p. 331.
19. *L. et Ch. Fortineau.* Essais de traitement du charbon bactérien par les injections de cultures pyocyaniques stérilisés. (C.r. ac. sc. T 158, 1914.)
20. *Honecker.* Ueber Antagonisten des Milzbrandbazillus. Inaug. Diss. Univ. Marburg. 1919.
21. *Emmerich u. Low.* Bakteriolytische Enzyme als Ursache der erworbenen Immunität und die Heilung von Infektionskrankheiten durch dieselben. (Zschr. f. Hyg. u. Inf./Krankh. Bd. 31 1899.)
22. *Klimoff.* Zur Frage der Immunstoffe des Organismus. (Zelfde tijdsch. Bd. 37 1901. p. 120.)
23. *Dietrich.* Beruht die Bakterienvernichtende Wirkung bakterieller Stoffwechselprodukte nach den von E. u. L. angeführten Beweisen auf proteolytischen Enzyme. (Nukleasen) (C. Bl. f. B. Bd. 30. p. 574.)

24. *P. Th. Müller.* Ueber Agglutination der Bakterien. (C. Bl. f. B. Bd. XXX.)
25. *Emmerich, Löw u. Korschun.* Die bakteriolytische Wirkung der Nucleasen und Nucleasen-Ummunproteïdine als Ursache der natürlichen und künstlichen Immunität (C. Bl. f. B. Bd. 31. Or. 1902.)
26. *Dietrich.* Sind alle Einwände gegen die Natur und Wirkungsweise der sogenannten Nukleasen widerlegt? (C. Bl. f. B. Or. 31 p. 165.)
27. *Vaerst.* Immunisierung gegen Milzbrand mit Pyocyanase und Kombinationen derselben. (zelfde Band p. 293.)
28. *Tavernari.* Die Pyocyanase E. u. L.'s bei dem experimentellen Milzbrand. (id. p. 786.)
29. *Raubitschek u. Russ.* (id. Or. 48. p. 114.)
30. *H. Sachs.* (Wien, klin. Wochenschr. 1908.)
31. *Landsteiner.* (C. Bl. f. B. 1908.)
32. *Ohkubo.* Ueber bakterizide, hämolytische, Komplement- und Giftbindende Eigenschaften der lipoidartigen Bestandteile der Pyocyanase. (Zschr. f. Imm. forschung. Or. Bd. 5. 1910.)
33. *Pane.* Ueber die bakteriziden von einigen Milzbrandbazillen-antagonisten-Microben ausziehbaren Substanzen. (C. Bl. f. B. Or. 54. 1910.)
34. *Emmerich u. Löw.* (C. Bl. f. B. Or. 49. p. 571.)
35. *Bermbach.* (Deutsche Med. Woch. schr. 1908 p. 251) (C. Bl. Or. 45).
36. *Hofbauer.* (Id. p. 350.)

37. *Schlippe*. (Id. p. 588).
38. *Jehle*. (id. p. 231) (Wiener kl. W. sch. 1907, N°. 1).
39. *Escherich en Jehle*. (id. p. 232).
40. *Zucker*. (id. id.).
41. *Mühsam en Weil*. (id. id.).
42. *Braun*. (id. p. 442).
43. *Saar*. (id. p. 1542).
44. *Löwenstein*. (id. 2e helft, p. 1575).
45. *Podwissozki*. (id. id. id., p. 1656).
46. *Sabolotny*. (id. id. id. id.).
47. *Weil*. (D. M. W., dl. I, 1909, p. 167).
48. *Trautman*. (id. id. id., p. 424).
49. *Gross*. (id. id. id., p. 265).
50. *Fackenhain*. (Ther. Monatshefte. 1908 August) ex C. Bl. Ref. 42.
51. *Strubell*. (Berl. Kl. W. sch. 1910, CBl. Ref. 46).
52. *Koslowsky*. (C.Bl. Ref. 46).
53. *Pröhl*. (D.M.W. 1909, dl. I, p. 500).
54. *Lévy*. (Klin. Jahrber. Bd. 25 1911, p. 121, CBl. Ref. 53).
55. *Sellei*. (D. M. W. 1909, dl. I, p. 501).
56. *Hatzfeld*. (D. M. W., 1910, p. 2215).
57. *Guttman*. (id. 1909, dl. I, p. 1164).
58. *Schapiro*. Ueber das bakterizide Verhalten der Pyozyanase und ihre Wirkung auf Versuchstiere. (C.Bl. Ref. 42, p. 616).
59. *Bocchia*. (Soc. Med. par. Juni 1908, C.Bl. Ref. 42 p. 617).

60. *Ohkubo*. (C.r. soc. de biol. T. 68, 1910, p. 655, C.Bl. Ref. 47).
61. *Sörensen*. (Münch. Med. W. sch., 1911, p. 625).
62. *Emmerich und Löw*. (C.Bl. or. 51).
63. *Isabolinsky*. (C.Bl. Or. 67. Abt. I, 1913, p. 532).
64. *L. Fortineau*. Traitement du charbon par la Pyocyane. (Paris médical 1912, N°. 44, p. 402, C.Bl. Ref. 55).
65. *Silvestrini*. (C.Bl. Ref. 59, p. 201).
66. *Sonnenberger*. (Abh. a. d. Gesamtgebiete der prakt. Med. Bd. 13, 1913; C.Bl. Ref. 60, p. 589).
67. *Dawson*. (U. S. Dep. of Agriculture Bureau of animal Industry. Bull. 137, 1911. CBl. Ref. 51, p. 404).
68. *Burchhardt*. Die Begeisselung als differential diagnostisches Merkmal in der Fluorescensgruppe. (C.Bl. Abt. I, Or. Bd. 79, 1917, p. 321).
69. *Gessard*. (Ann. de l' Inst. Past. 1920, N°. 2 T 34). Technique d' identification des germes pyocyaniques.
70. *Smirnow*. The value of glycerinated potato as a culture medium. (C.Bl., Ref. 59, p. 353).
71. *Kolle u. Wassermann*. Handb. der path. Mikroorganismen. 2. Aufl.
72. *Kolle u. Hetsch*. Experimentelle Bakteriologie. Deel I, 1919.
73. *Kraus und Levaditi*. Handb. der Technik und Meth. der Imm.forschung, 1919.

74. *Wolfgang Weichardt*. Ergebnisse der Hyg. Bakt. Imm.forsch. und exper. Therapie, 1919.
75. *Bongert*. Bakteriöl. Diagnostik., 1919.
76. *Ziegler*. Allgem. Pathologie.
77. *Glage*. Kompendium der Bakteriologie.
77. *Kitt*. Bakterienkunde und pathologische Mikroskopie.
78. *Dopter et Sacquepée*. Bactériologie. Paris. Baillière et fils.
79. *Macée*. Traité de Bactériologie.
80. *Matzuschita*. Bakt. Diagnostik.
81. *Dr. Ivar Bang*. Chemie und Biochemie der Lipoide.

STELLINGEN

1. De door Gram aangegeven kleurmethode wordt in de handboeken op zóó verschillende wijze voorgeschreven en zóó verschillend toegepast, dat het gewenscht is, nadere voorschriften vast te stellen, gebaseerd op het Gram'sche principe en waarbij rekening gehouden wordt met latere omtrent die methode gedane onderzoeken.
2. Bij menschenpestepidemiëen dient rekening te worden gehouden met de mogelijkheid van besmetting van katten.
3. Bij luxatie van de pees van den musculus flexor digitalis pedis sublimis geeft doorsnijden van die pees beneden den tarsus de meeste kans op herstel.
4. Het toepassen van de intracutane methode van tuberculinatie naast de ophthalmo-reactie verdient in Ned.-Indië aanbeveling.

-
5. Het is gewenscht aan gouvernementsveeartsen in Ned.-Indië het uitoefenen van particuliere praktijk slechts toe te staan op plaatsen, waar geen andere diergeneeskundige hulp kan worden verkregen.
 6. Voor de bestrijding van rabies in Ned.-Indië is het gewenscht den hond in die eilandengroep te doen uitsterven. Dit kan binnen twintig jaar geschieden door: 1. Verbod van invoer van honden binnen den archipel; 2. Registratie van de bestaande honden; 3. Wettelijke verplichting tot afmaken van alle nieuwgeboren honden.
 7. Hoezeer een operatieve behandeling van saccharomycosis bij het paard in Ned.-Indië aanbeveling zal verdienen in een diergeneeskundige kliniek, in de gewone praktijk zal jodipinebehandeling voor die ziekte de voorkeur verdienen.
 8. Bij moeilijke partus van kleine, waardevolle honden zal in het algemeen een spoedig toegepaste sectio caesaria de meest aanbevelenswaardige behandelingsmethode zijn.

-
9. Het door Max Müller (Münch. Med. Woch.schr. 19 Maart 1920) aangegeven systeem van beoordeeling van vleesch van tuberculeuze dieren, — waarbij afschaffing der sterilisatie wordt bepleit, — verdient geen aanbeveling.
-



BIBLIOTHEEK
DIERGENEESKUNDE
UTRECHT



