



Onderzoeken over *Leptospira Icterohaemorrhagiae*

<https://hdl.handle.net/1874/288501>

A. 4. 1925 + 1927.

ONDERZOEKINGEN OVER LEPTOSPIRA
ICTEROHAEMORRHAGIAE

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT

W. AEG. TIMMERMAN

s.
cht

1

ONDERZOEKINGEN OVER LEPTOSPIRA
ICTEROHAEMORRHAGIAE

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK UTRECHT



3969 3340

Diss. Utrecht 1927

ONDERZOEKINGEN OVER LEPTOSPIRA ICTEROHAEMORRHAGIAE

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE
AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP
GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS **PROF. DR.
B. J. H. OVINK**, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT
DER LETTEREN EN WIJSBEGEERTE, VOLGENS
BESLUIT VAN DEN SENAAAT DER UNIVERSITEIT,
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER
GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN OP **DINSDAG
13 DECEMBER 1927**, 'S NAMIDDAGS 4 UUR, DOOR

WILLEM AEGIDIUS TIMMERMAN,
ARTS, GENEESKUNDIGE AAN HET RIJKS SEROLOGISCH INSTITUUT,
GEBOREN TE 'S-GRAVENHAGE



BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

1927

DRUKKERIJ Fa. SCHOTANUS & JENS, UTRECHT

Aan Mijn Vrouw en Kinderen.

Niet gaarne zou ik, bij het verschijnen van dit proefschrift, nalaten de namen te noemen van enkelen, aan wie ik bij mijn studie veel ben verschuldigd.

En dan voel ik wel in de eerste plaats behoefte U dank te zeggen, hooggeleerde *ALDERSHOFF*, niet alleen voor Uw bereidwilligheid als mijn promotor op te treden, maar evenzeer omdat Gij mij steeds met raad en daad hebt bijgestaan en mij, waar de drukke werkzaamheden in het Rijks Serologisch Instituut het slechts toelieten, in de gelegenheid hebt gesteld, mijn, veelal tijdroovende onderzoekingen te verrichten.

Hooggeleerde *BOEKE*, dat Gij mij, zoowel tijdens als na mijn studententijd toegang hebt gegeven tot Uw woning, en mij daardoor in de gelegenheid hebt gesteld, Uw, zoo ruime opvatting van de studie der Biologie beter te leeren kennen, stemt mij tot dankbaarheid. Ik hoop dat ik ook in de toekomst op Uw steun en raad zal mogen rekenen.

Hooggeleerde *FLU*, toen ik na mijn terugkomst uit Indië een gelegenheid zocht mij in de techniek der Bacteriologie te oefenen, hebt gij mij niet alleen in Uw Instituut onderdak verschaft, doch bovendien Uw tijd op de meest tegemoetkomende wijze beschikbaar gesteld. Gij hebt door Uw voorbeeld de liefde tot de microbiologie bij mij aangewakkerd.

Hooggeleerde *SCHÜFFNER*, Gij waart het die mij het eerst leiding hebt gegeven bij de zoo moeilijke onderzoekingen over leptospirae. Gij wist iets van Uw groot enthousiasme op mij over te dragen en hebt daardoor den stoot gegeven, die mij tot een nauwkeuriger studie der leptospirae drong. Ik ben U daarvoor grooten dank verschuldigd.

De in dit proefschrift beschreven onderzoekingen vinden hun aanleiding in een opdracht, welke ik eenigen tijd geleden ontving. In verband met het bekend worden van verschillende gevallen der ziekte van *Weil* in ons land, waarvan enkele met doodelijken afloop, achtte de directeur van het Rijks Serologisch Instituut het wenschelijk een antiserum in voorraad te houden, temeer, omdat in het buitenland gebleken was, dat van een dergelijk serum gunstige resultaten konden worden verwacht. De moeilijkheden, welke ik in den beginne bij de cultuur van de *leptospira icterohaemorrhagiae* onderzond, en de vele eigenaardigheden van dit belangwekkende micro-organisme, prikkelden mij tot nadere onderzoekingen, waarvan eenige in de volgende bladzijden worden beschreven.

HOOFDSTUK I

INLEIDING TOT DE STUDIE DER LEPTOSPIROSEN

Sedert de ontdekking van den veroorzaker der ziekte van *Weil* zijn slechts een twaalfstal jaren verlopen. In Duitschland toonden *Uhlenhuth* en *Fromme* (1) *) in 1915 in het bloed van hun patiënten een micro-organisme aan, dat ze als spirochaet herkenden en betitelden met den naam van spirochaeta icterogenes. Onafhankelijk van hen namen ook *Hübner* en *Reiter* (2) dit organisme waar, waarvoor zij den naam spirochaeta nodosa voorstelden. Het volgend jaar bleek, door mededeelingen in the *Journal of experimental Medicine* (3) en in het *Korrespondenzblatt für Schweizer Aerzte* (4), dat Japansche onderzoekers, *Inada*, *Ido*, *Hoki*, *Kaneko* en *Ito* reeds vóór de Duitschers in Japansche tijdschriften de spirochaet hadden beschreven. Zij noemden hem spirochaeta icterohaemorrhagiae; deze naam heeft dus de oudste rechten. In 1918 ried *Noguchi* aan spirochaeta door leptospira te vervangen, de vele eigenaardigheden van dit micro-organisme rechtvaardigden volgens hem de onderbrenging in een afzonderlijke groep. Hiertegen rezen zoölogische bezwaren, waarom *Schüffner* (5) kort geleden voorstelde, de genera *Saprosira*, *Cristispira* en *Spirochaeta* te onderscheiden, en de laatste stam onder te verdeelen in de subgenera *Borrelia*, *Treponema* en *Leptospira*.

*) De tusschen haakjes () gedrukte cijfers verwijzen naar de geraadpleegde literatuur.

Ofschoon deze ontdekkingen, zooals gezegd, slechts enkele jaren oud zijn, bestaat over de leptospira icterohaemorrhagiae en over de andere vertegenwoordigers uit dezelfde groep reeds een dusdanig uitgebreide literatuur — *Margaretha Zuelzer* geeft tot 1924 ongeveer 600 titels op van monografieën en artikels, en is bovendien niet geheel volledig — dat het eenige moeite kost een en ander te overzien.

Deze groote belangstelling is ongetwijfeld voor een deel het gevolg van het tijdstip waarop de verschillende ontdekkingen vielen. Wij waren toen midden in den grooten oorlog en op vrijwel alle Europeesche fronten kwam de ziekte van *Weil* voor. Nu kan ons dit niet meer verwonderen, omdat we thans de rol kennen, die de, in de loopgraven alom tegenwoordige rat in de epidemiologie van de ziekte waarschijnlijk speelt. Toen wist men dat echter niet, en het behoeft ons derhalve niet te verbazen, dat men op alle mogelijke wijze trachtte het wezen van deze aandoening, die voor de gevechtswaarde van de legers een niet te onderschatten gevaar dreigde te worden, beter te begrijpen en zoo in staat te zijn haar te bestrijden en te genezen.

Maar voor een ander gedeelte mogen wij deze belangstelling toch zeer zeker ook wel toeschrijven aan het buitengewoon aanlokkelijke dat de studie van deze eigenaardige micro-organismen biedt.

De onderzoekingen van de eerste jaren zijn, zooals in verband met den oorlogstoestand te verwachten was, voor een belangrijk gedeelte gericht op de praktijk. De schrijvers geven de middelen aan om tot een zekere diagnose te komen, hetzij door spirochaeten in bloed of urine aan te toonen, hetzij door in het bloed naar antistoffen te zoeken, trachten immuunsera te bereiden of bestudeeren de epidemiologie. De publicaties die het vraagstuk van een zuiver wetenschappelijk standpunt bezien, zijn, vooral in de eerste jaren na 1915, belangrijk in de minderheid. Bij de bestudeering van de literatuur valt dit verschijnsel duidelijk op. Reeds in de allereerste mededeeling van *Uhlenhuth* en *Fromme* (1) merken de schrijvers

op dat ze in staat zijn virulent caviabloed, door toevoeging van reconvalescentenbloed of -serum, avirulent te maken. Naar aanleiding hiervan schrijven ze: „Ob diese Schutzstoffe für die Behandlung verwertbar sind, ist ab zu warten". Ook begonnen ze onmiddellijk dieren actief te immuniseeren. In hun tweede mededeeling (6) berichten ze, dat ze reconvalescentens serum met goed gevolg hebben ingespoten na de infectie, waaruit dus blijkt dat ook na dit tijdstip het serum zijn beschermende werking kan ontvouwen, terwijl ze ook serum van actief geïmmuniseerde dieren met succes hebben toegepast. De wijze van toediening, doseering en tijdstip van behandeling worden in een derde artikel (7) nader onder de oogen gezien.

Zien wij dus dat *Uhlenhuth* en *Fromme* zich onmiddellijk beijverden hun vondsten dienstbaar te maken aan de therapie van de ziekte, niet minder duidelijk blijkt dit streven uit de mededeelingen van *Hübner* en *Reiter*, die er evenals *Uhlenhuth*, maar onafhankelijk van hem, in slaagden de ziekte van den mensch op caviae over te brengen, (2) en de beschermende werking van menscheijk reconvalescentens serum op reeds geïnfecteerde caviae konden aantonen (2) (8). Bovendien maken zij enkele opmerkingen over de epidemiologie en denken evenals *Hecker* en *Otto* (9) (10) dat reeds eerder deden, aan de mogelijkheid dat insecten de ziekte zouden overbrengen (11) *Reiter* en *Ramme* (12) zijn van meening dat baden niets met de infectie heeft uit te staan. In dezelfde mededeeling komen kweekproeven ter sprake. Dit behoeft geen verwondering te wekken, omdat reïnculturen van spirochaeten bij actieve immunisatie van proefdieren veel nauwkeuriger zijn te doseeren, dan emulsies van organen of virulent bloed, zooals men tot nu toe noodgedwongen moest gebruiken. Zij kweekten de spirochaeten in verdund konijneserum op het voetspoor van *Ungermann* (13), wien dit het eerste schijnt te zijn gelukt.

Terwijl nu *Uhlenhuth* en *Fromme* (14) hun immuniteitsproeven verder uitwerkten en uitbreidden, publiceerden de Japanners hun vondsten in Europeesche en Amerikaansche

tijdschriften. *Inado, Ido, Kaneko, Hoki, Ito* en *Wani* (4) deelen mede dat zij in vele organen van hun patiënten een spirochaet hebben gevonden en dat zij er in geslaagd zijn een goed werkend paardeserum te bereiden. Ook met geiten-immuun-serum bleken ze reeds succes te hebben verkregen. (3) *Ito* en *Matsuzaki* (5) beschrijven geslaagde kweekproeven, zoowel in vloeibare als vaste milieus. *Ido, Hoki, Ito* en *Wani* (16) toonen aan dat caviae actief geïmmuniseerd kunnen worden met culturen of orgaanemulsies, waaraan $\frac{1}{2}\frac{0}{0}$ carbol is toegevoegd. Deze vondst is voor Japan van groot belang, want daar komt de ziekte van *Weil* veelvuldig voor, is in sommige streken vrijwel endemisch en vertoont een hooge lethaliteit. De wenschelijkheid van een actieve immunisatie in deze bedreigde provinciën dient dus zeker onder de oogen te worden gezien. Men heeft langen tijd in twijfel verkeerd of de Japan-sche spirochaeta gelijk mocht worden gesteld aan de Europeesche. *Sobernheim* (17) kon aantonen dat de biologische en serologische eigenschappen van beide micro-organismen overeen kwamen.

Het spreekt wel vanzelf, dat door al deze ontdekkingen, een ieders aandacht op de ziekte en den verwekker werd geconcentreerd en dat een groot aantal onderzoekingen werden verricht en gepubliceerd. Een belangrijk gedeelte hiervan geeft een beschrijving van de aan het ziekbed waar te nemen verschijnselen. *Trembur* en *Schallert* (18) wijzen op de veelal vergroote lever en op de bij al hun gevallen — een twaalfstal — waargenomen teekenen van nierprikkeling. *Schott* (19) vestigt de aandacht op het veelvuldig voorkomen van herpes. *Goebel* (20) beschrijft twee gevallen van laboratorium infectie, waar het virus door de niet gelaedeerde huid zou zijn gedrongen. Dit feit kon door de onderzoekingen van *Courmont* en *Durand* (21) worden bevestigd. *Stokes* en *Ryle* (22) beschrijven in 1916 een tiental door hen waargenomen gevallen. Reeds het volgend jaar konden zij er meer dan 100 verzamelen (23), alle voorgekomen in het Britsche leger in Vlaanderen. *Renaux* (24) beschrijft de gevallen in het Belgische leger; later zet

hij dit voort in samenwerking met *Wilmaers* (25) (26). Hij vestigt bovendien de aandacht op de veranderingen die in het bloedbeeld optreden, in den beginne leucocytose, in een later stadium van de ziekte een absolute leucopenie.

Nauwkeurige klinische gegevens zijn in dezelfde jaren verstrekt door Fransche onderzoekers. *Clément* en *Fiessinger* (27) vonden de leptospirae in het braaksel, *Costa* en *Troisier* (28) toonden de virulentie van het ruggemergsvocht aan, later ook van de hersenen (29). *Garnier* en *Gerber* (30) wijzen op de vermindering van de ureum uitscheiding. *Brulé* en *Moreau* (31) trachten de oorzaak van de icterus op het spoor te komen, terwijl *Pagniez* (32) een belangrijke vertraging in den stollings-tijd van het bloed meent te kunnen aantoonen, alsook een vermindering van het aantal bloedplaatjes. Het zijn vooral de Duitschers geweest, die het vraagstuk van de pathologisch-anatomische zijde hebben beschouwd. (*Herxheimer* (33), *Beitschke* (34), *Miller* (35), *Hart* (36).)

Voorts worden een groot aantal onderzoeken gewijd aan het opsporen van antistoffen in het lichaam van den zieken mensch (*Garnier* en *Reilly* (37), *Costa* en *Troisier* (38), *Martin*, *Pettit* en *Vaudremer* (39) e.a.) en aan de mogelijkheid reconvalescenten-serum (*Fraenkel* (40), *Uhlenhuth* (41), *Heidenheim* (42)) of immuunserum van verschillende dieren afkomstig (*Uhlenhuth* en *Fromme* (14), *Martin* en *Pettit* (43), *Inada* (44), en vele anderen) als therapeutica toe te passen.

De kennis der epidemiologie van de ziekte van *Weil* breidde zich belangrijk uit door de ontdekking der Japanners (45), dat de rat zeer vaak leptospirendrager was. Vele onderzoekers konden hun onderzoeken bevestigen. *Nicolle* en *Lebailly* (46) wezen er op, dat voornamelijk de volwassen rat met leptospirae was besmet. Dit werd ook vastgesteld door *Kuenen* en *Schüffner* (47) die bij hun onderzoeken in Amsterdam vonden dat van de volwassen mus *decumanus* 45 0/0 leptospirendrager was, terwijl de jonge ratten ze slechts in een gering percentage herbergden.

Zoo zien we dat in de eerste jaren na de ontdekking van de leptospira icterohaemorrhagiae een groot aantal onderzoekingen zijn verricht en gepubliceerd, veel meer dan ik hier heb aangehaald. In de volgende jaren gaat deze stroom van publicaties door. Reeds spoedig wordt het onderzoeksterrein uitgebreid, want in 1918 deelen *Ido, Ito* en *Wani* (48) mede dat volgens hun opvattingen ook de Japansche zeven-daagsche koorts of Nanukayami door een leptospira wordt veroorzaakt. Dan begint *Noguchi* in 1919 zijn reeks publicaties over de leptospira icteroides, als veroorzaker van de gele koorts. Deze serie artikelen van *Noguchi* is zeer lezenswaard en kan als voorbeeld dienen hoe een probleem grondig aan te vatten. Allereerst beschrijft hij (49) symptomatologie en pathologische anatomie van een gele koorts epidemie, welke heerschte in Guayaquil in Ecuador. Teneinde het agens te leeren kennen, spuit hij bloed van patiënten in bij vele vogels en zoogdieren, die daarop echter geen van alle reageerden. Alleen de caviae maken hierop een uitzondering (50). Sommige krijgen symptomen die gelijkenis vertoonen met die van gele koorts bij den mensch. In hun bloed, lever en nieren vond *Noguchi* een leptospira, die hij kweken kon op een halfvaste voedingsbodem en die, opnieuw bij caviae ingespoten, dezelfde verschijnselen gaf. Niet alle dieren sterven aan de besmetting, sommige worden slechts licht ziek, maar zijn daarna wel immuun (51), zooals blijkt uit infectie met een zeker doodelijke dosis infectieuze orgaan emulsie, 25 dagen later (52). Daarna mengt *Noguchi* reconvalescentenserum en leptospira cultuur, doet hiermede de proef van *Pfeiffer* en ziet dat deze in 83 % van de gevallen positief is (53). In een volgend artikel (54) komen kweekproeven ter sprake; *Noguchi* gelooft dat een niet te groote hoeveelheid zuurstof voor den groei noodzakelijk is. Ook meent hij dat deze leptospira icteroides, zooals hij hem heeft gedoopt, wat kleiner is dan de leptospira icterohaemorrhagiae. Hij toont ook de leptospira direct onder het microscoop in patiëntenbloed aan (3 van 27 gevallen) (55). Caviabloed is na 72 uur altijd

infectieus. Eigenaardig is nu *Noguchi's* mededeeling (56) dat per 100 wilde ratten uit Guayaquil 67 een leptospira herbergden, die evenwel geen leptospira icteroides was, doch identiek scheen te zijn met de leptospira icterohaemorrhagiae. Agglutinatie en lysis, zoowel als kruisimmunitetsproeven wezen uit dat de leptospira icteroides geheel andere eigenschappen had, terwijl icterohaemorrhagiae-stammen een groote overeenkomst, zoo al niet identiciteit met deze door *Noguchi* gevonden stam bij ratten schenen te vertoonen. Het behoeft niet te verwonderen dat *Noguchi* ook infectieproeven deed met stegomia fasciata (aedes egypti) (57), omdat, sedert *Finlay* wel niemand meer twijfelt aan de rol van deze mug in de epidemiologie. Het bleek voor stegomia niet gemakkelijk te zijn zich te infecteeren op menschen of caviae. Wel gelukte het soms, en dan konden de muggen ook een enkele maal caviae besmetten; overtuigend zijn deze proeven echter niet. In een volgende reeks (58) breidde *Noguchi* zijn immuniseeringsproeven uit. Het bleek hem nu dat de immuniteit toch niet een zuiver specifieke was. Tegen leptospira icteroides geïmmuniseerde dieren bleken tegenover icterohaemorrhagia infectie iet of wat anders te reageeren dan de contrôles: het incubatietijdperk was wat langer en het ziekteverloop soms wat lichter. Andersom viel hetzelfde vast te stellen. Actieve immunisatie met doode culturen gaf, ongeveer 14 dagen na de laatste inspuiting, volledige bescherming (59). Passieve immunisatie beschutte slechts enkele dagen. Homoloog immuunserum van een paard bleek in staat te zijn besmette caviae nog te beschermen, als de icterus korter dan 24 uur bestond (60).

Salvarsan bleek geen genezende werking te hebben, ofschoon het in vitro wel eenigen invloed op de leptospirae uitoefende (61).

Hoe volledig deze proeven nu ook schenen te zijn, toch is het gele koorts vraagstuk nog lang niet opgelost, en is ook met name de verhouding tusschen de leptospira icteroides en de leptospira icterohaemorrhagiae niet duidelijk. Ik hoop op

een en ander in een volgend hoofdstuk nog terug te komen.

In 1922 wordt het leptospiren vraagstuk nog ingewikkelder als *Uhlenhuth* en *Zuelzer* (62) mededeeling doen van leptospirae die ze gevonden hebben in rivieren en kanalen, maar ook in weinig gebruikte waterleiding kranen, die dus blijkbaar saprophytisch leven, maar morphologisch niet van de pathogene zijn te onderkennen.

Doch niet alleen tot de genoemde ziekten bleven de leptospiravondsten beperkt. *Schüffner* (63) zag in 1918 een leptospira bij zwartwaterkoorts. *Blanchard* en *Lefrou* (64) en *Van Hoof* (65) deden gelijksoortige waarnemingen, ook *Noc* en *Esquier* (66) beschrijven leptospirae door hen gevonden in de lever van een aan zwartwaterkoorts overleden patient in Dakar. In 1922 publiceert *Vervoort* (67) zijn spirochaeten-vondsten in Sumatra bij acute koortsige ziekten. Ook deze spirochaeten zijn van het leptospiratype en de vraag rijst onmiddellijk in hoeverre leptospirae verantwoordelijk mogen worden gesteld voor de vele kortdurende koortsen die in de Tropen voorkomen. *Van de Velde* (68) gaat dan zoeken in bloeditstrijken van zijn koortsende patiënten en vindt in een serie van 360 personen 23 maal spirochaeten. Daarna slaagt hij (69) er in caviae te besmetten, die een typisch *Weil*-ziekte- en sectiebeeld vertoonen, ook aan *Baermann* (70) gelukt dit. *Kouwenaar* (71) kon in de urine van 19 icterusgevallen 15 maal en van 45 koortsgevallen 28 maal leptospirae aantonen.

Tenslotte moet ik nog melding maken van een mededeeling van *Prausnitz* en *Lubinski* (72) die bij een overigens onschuldige epidemie van acute kortdurende koortsaanvallen, met op *Weil* gelijkende symptomen, doch zonder icterus, éénmaal een leptospira konden isoleeren, maar niet konden voortkweeken.

Het spreekt wel vanzelf dat men bij vele andere ziekten deze spirochaeten heeft meenen te vinden, zoowel bij ziekten

van den mensch (maligne tumoren, multiple sclerose) als bij dierziekten (paardenanaemie. Stuttgarter Hundeseuche, e.a.) Deze vondsten staan echter geenszins vast, maar zijn integendeel veelal reeds voldoende weerlegd. Ik zal ze dus hier buiten bespreking laten.

Wanneer ik nu den stand van onze kennis in enkele woorden samenvat, dan zou ik dit op de volgende wijze willen doen.

Vast staat dat de ziekte van *Weil*, de Japansche zeven-daagsche koorts of *Nanukayami* en sommige acute koortsige ziekten in de Tropen door leptospirae worden veroorzaakt. Het is bovendien zeker dat leptospirae voorkomen in leiding- en grachtwater en uitgescheiden kunnen worden door ratten met hun urine.

Zeer waarschijnlijk worden sommige gevallen van zwart-waterkoorts door een leptospira veroorzaakt. Mogelijk speelt bij de gele koorts ook een leptospira een rol, zoo niet de hoofdrol.

Hoe nu de onderlinge verhouding van deze verschillende leptospirae is, in welk verband ze tot elkander staan, of ze geheel verschillende stammen vertegenwoordigen of in elkander kunnen overgaan, zijn vragen, die ik in het volgende hoofdstuk ter sprake zal brengen.

HOOFDSTUK II

DE LEPTOSPIRAE IN ONDERLINGE VERGELIJKING

Is het mogelijk de verschillende leptospirae van elkander te onderscheiden? Met andere woorden, kennen wij verschillen in morphologische, biologische of serologische eigenschappen tusschen de tot nu toe beschreven leptospirae en zoo ja, zijn deze verschillen groot en standvastig genoeg om ons in staat te stellen er een betrouwbare differentieel diagnose op te bouwen, of moeten we aannemen dat zij alle in elkander kunnen overgaan en dus ook de verschilpunten slechts gra-dueel en niet constant zullen zijn? Uit het volgende overzicht zal blijken, dat onze kennis uiterst onvolledig is en dat wij nog ver van een helder inzicht verwijderd zijn.

Voor een vergelijkend onderzoek zijn natuurlijk slechts die stammen ter beschikking, van welke het gelukt is reïnculturen aan te leggen en aan te houden. Dit zijn leptospira icterohaemorrhagiae, l. hebdomadis, l. icteroides, de leptospira gekweekt uit bloed of urine van koortsende patienten in Sumatra en Java, de rattenleptospirae, de spirochaeta pseudo-icterogenes van Uhlenhuth en Zuelzer.

Morphologie. Slechts dan is het mogelijk micro-organismen naar hun vorm te vergelijken, wanneer ze even oud zijn, op denzelfden voedingsbodem en bij dezelfde temperatuur zijn gekweekt. Zeer sterk geldt dit voor de leptospirae. Het is

een bekend feit, dat de lengte van deze organismen in hooge mate afhankelijk is van het milieu, waarin ze groeien. De leptospira icterohaemorrhagiae, die in caviaserum cultuur, volgens metingen van Zuelzer (73) een gemiddelde lengte bereikt van 8 tot 12 μ ., is iets langer in konijneserum en veel langer, zelfs tot 85 μ ., wanneer hij gekweekt wordt in verdund ezelserum. Ik heb zelf bij kweekproeven kunnen vaststellen, dat in verdund schapeserum vaak een uiterst snelle groei optreedt — na 3 tot 4 dagen incuberen bij 30° is het aantal per gezichtsveld bij 200voudige vergrooting ten eenenmale niet meer te schatten — terwijl de individuen kort blijven, gemiddeld ongeveer 10 μ . Men kan niet ontkomen aan den indruk, dat de jonge individuen zich deelen voordat ze volwassen zijn. In den regel was een dergelijke „vervroegde” deeling een voorteken, dat de cultuur aan het afsterven was. Schüffner (5) heeft er onlangs op gewezen dat ook de waterstofionenconcentratie van den voedingsbodem grooten invloed op de lengte kan hebben. Het beste zou volgens hem zijn, leptospirae direct uit de peritoneaalholte van proefdieren te onderzoeken, waarin ze altijd zeer regelmatig groeien. Ik wil er in dit verband de aandacht op vestigen, dat het mij is opgevallen dat sommige Weilstammen toch een andere gemiddelde lengte schijnen te hebben dan andere. Een van de stammen die reeds enkele jaren in cultuur is, afkomstig van een Hollandsche patiënt, is steeds wat langer dan andere stammen, waarmede hij tegelijk en op denzelfden voedingsbodem wordt overgeënt. Na dierpassage is hij iets korter, maar krijgt al spoedig zijn grootere lengte terug. In hoeverre dit verschijnsel een raseigenschap is, of wellicht wijst op achteruitgang in vitaliteit, waag ik niet te beoordeelen. Men dient er intusschen rekening mede te houden. Mochtar (74) zag verschillen in twee cultuurbuizen, uit eenzelfde stam geënt en onder geheel gelijke omstandigheden gekweekt: in de eene buis korte en zeer beweeglijke exemplaren, in de andere lange en rustige. Noguchi (75) is van meening, dat de leptospira icteroides kleiner is dan de leptospira

spira icterohaemorrhagiae en deze weer kleiner dan de *leptospira hebdomadis*: als gemiddelde maten geeft hij op 4—14 μ , 8—24 μ en 10—30 μ .

Andere onderzoekers kunnen dit echter niet bevestigen. Het is wel zeker dat deze verschillen, zoo zij al bestaan, toch niet zoo belangrijk en constant zijn, dat ze met eenige zekerheid een behoorlijke grondslag voor een microscopische diagnose zouden kunnen bieden. Ook de verschillende rattenstammen vertoonen ten opzichte van de andere, reeds beschreven stammen, geen duidelijke lengteafwijking. *Van Thiel* (76) gelooft, dat de gemiddelde lengte van zijn ratspirochaet gekweekt in een gewijzigde *Vervoort's* voedingsbodem, waarvan in een volgend hoofdstuk de juiste samenstelling ter sprake zal komen, zeker grooter is dan die van een saprophytische waterspirochaet in zijn verzameling. In hetzelfde artikel wijst hij er op, en ook op *Schüffner's* fotos is dat te zien, dat de primaire windingen van deze reeds genoemde waterspirochaet wat vlakker zijn en verder uit elkander liggen, dus meer gerekt schijnen en ook gemakkelijker geteld kunnen worden, dan die van de *Weil*-stammen. Hiermede roeren we een ander morphologisch kenmerk aan. Of dit ons echter tot het doel kan voeren, meen ik te mogen betwijfelen. Want de steilheid van de windingen is buitengewoon wisselend, zelfs in een en dezelfde cultuur kan dit het geval zijn. Ik behoef hiervoor slechts te verwijzen naar de foto van een Sumatra stam uit het aangehaalde artikel van *Schüffner*, de onderlinge verschillen springen hier wel zeer duidelijk in het oog.

Zuelzer en *Oba* (77) wijzen op verschillen tusschen *leptospira icterohaemorrhagiae* en *leptospira hebdomadis*: de laatste zou sterker lichtbrekend zijn, dikker en losser gewonden dan de eerste. Dat wij aan deze kenmerken ook niet veel zullen hebben, blijkt uit de noodzakelijkheid, waarin zij verkeerden de pseudospirochaeten ook weer in verschillende typen te onderscheiden, waarvan één pseudo-hebdomadistype. In welke opzichten verschilt deze morphologisch van de echte hebdomadis?

Biologie. Ik zal in dit gedeelte mogelijke verschilpunten in gedrag bij kweeking in enkele voedingsbodems en tegenover eenige chemische, of physische agentia ter sprake brengen. In hoeverre is het mogelijk de leptospirae te onderscheiden in verband met de voedingsbodems waarop ze in staat zijn te groeien? Ook hier zijn tot nu toe alleen enkele verschillen opgemerkt tusschen de *Weil-leptospira* eenerzijds en de waterleptospira anderzijds. De laatste is veel minder kieskeurig, hetgeen te verwachten was in verband met zijn natuurlijke voedingsbodem, dan de eerste, en groeit soms welig in milieus die voor de eerste minder geschikt zijn. Vooral blijkt dit duidelijk als we keukenzout gaan toevoegen. Het gelukt volgens *Uhlenhuth* en *Zuelzer* (78) niet de leptospira icterohaemorrhagiae te kweken in welken voedingsbodem dan ook, als de keukenzoutconcentratie tot 0.95 % wordt opgevoerd; de waterspirochaet past zich daarentegen gemakkelijk aan een dergelijke verhouding aan. Ook schijnt de hardheid van het water, waarmee het konijneserum wordt verdund, van invloed te zijn op den groei van de *Weil-leptospira*. *Van Thiel* (76) heeft groeiverschillen kunnen waarnemen tusschen waterleptospira en ratleptospira bij kweeking op *Noguchi's* halfvloeibaren voedingsbodem (agar-serum-haemoglobine). De rat-leptospira groeit hierop na ongeveer een week bebroeden uitermate dicht, de waterspirochaet in het geheel niet. Hier krijgen we dus den indruk dat de laatste toch ook niet zoo licht in zijn eischen is.

Zuelzer deelt in *Prowazek's* handboek mede dat druiven-, melk- en rietsuiker ook in zwakke oplossing, schadelijk werken op den groei van leptospira icterohaemorrhagiae. Ik heb zelf 4 *Weil*-stammen gedurende vrij langen tijd, ongeveer 6 maanden en iedere week overenten, gekweekt in het gewijzigd milieu van *Vervoort*, waaraan respectievelijk waren toegevoegd glucose, lactose en maltose, in een zoodanige hoeveelheid dat de eindconcentratie van deze stoffen 1 % bedroeg. Ik heb hiervan in het geheel geen invloed gezien: groeiselheid, vorm, grootte en beweging waren geheel gelijk aan die van

de contrôles. *Noguchi* (79) geeft op dat koolhydraten geen invloed uitoefenen op den groei van *leptospira icterohaemorrhagiae*.

Ik heb ook nog proeven genomen over den invloed van nutrose in een hoeveelheid van 1 % aan de culturen toegevoegd. 3 van 4 stammen groeiden hierin beter dan in de contrôle-culturen. Toch geloof ik dat dit verschijnsel van weinig belang is, want het gebeurde een enkele maal dat de verschillen ten gunste van de nutrose verdwenen waren en later soms wel, soms niet meer voor den dag kwamen.

Kort geleden is een proevenreeks gepubliceerd van *Sardjito* en *Postmus* (80). Deze onderzoekers vergeleken de cultureele eigenschappen van verschillende leptospirae, en wel: 1 gele koortsstam, 2 *Weilstammen* (1 Hollandsche en 1 Indische), 1 stam *Vervoort*, en 4 ratstammen (1 Hollandsche, 2 Indische en 1 Amerikaansche). Al deze stammen werden gekweekt op *Vervoort's* voedingsbodem, waaraan verschillende suikers werden toegevoegd, tot een eindconcentratie van ongeveer 1 %. Deze suikers waren: glucose, lactose, manniet, maltose, saccharose, dulciet, mannose, sorbiet, levulose, arabinose, xylose, isodulciet en inuline. Uit hun proeven is gebleken dat hun rat-, *Weil*-, en *Vervoort*stammen op de suikers gelijk en goed groeiden. De gele koortsstam doet dit evenzeer, doch met één uitzondering. In 1 % levulose groeit hij niet en gaat te gronde. Maar ook op de andere leptospirae heeft de levulose eenige, zij het geringe, remmende invloed. Zeer eigenaardig is het dat deze zelfde gele koorts stam, evenals de andere, goed groeit als de levulose niet toegevoegd is aan *Vervoort's* vloeibaar medium, maar aan *Noguchi's* halfvaste serum-agar. De schrijvers hebben bovendien waargenomen dat 1 % arabinose of inuline een gunstigen invloed uitoefent op den groei van alle leptospirae, die van de gele koorts inbegrepen.

Hier zien we dus een cultureel verschil tusschen de *leptospira icteroides* en de andere onderzochte stammen. Mochten deze proeven worden bevestigd, dan zou dit inderdaad een stap dichtër kunnen blijken te zijn bij de oplossing van het

vraagstuk welke verhouding er bestaat tusschen leptospira icterohaemorrhagiae en leptospira icteroides.

Shiga (81) sloeg een andere weg in, teneinde nadere verschilpunten tusschen eenige waterstammen en *Weilstammen* vast te stellen. Op het voetspoor van *Beger* (82) ging hij de oligodynamische werking na van metalen op culturen van zijn leptospirae. Hij vond dat toevoeging van gepoederd koper, lood, ijzer of kwikzilver in den beginne in het geheel geen invloed op den groei der waterleptospirae uitoefende. Pas na langeren tijd — 1 week voor kwikzilver, 3 weken voor koper en ijzer — ondervonden zij den schadelijken invloed, en gingen te gronde. Zijn *Weilstammen* daarentegen verdroegen geen dezer metalen, en waren na enkele dagen geheel uit het gezichtsveld verdwenen. Ook tegenover ultraviolette stralen bleek de waterspirochaet veel resistenter te zijn, dan die van *Weil*. Evenals *Uhlenhuth* en *Zuelzer* vond hij het aanpassingsvermogen ten opzichte van keukenzout voor de waterspirochaet grooter dan voor de *Weilstammen*; de grenzen liggen volgens zijn onderzoekingen bij 1.2 % en 0.85 %.

Serologie. We zullen achtereenvolgens bespreken agglutinatie en lysis in vitro, lysis in vivo, dus de proef van *Pfeiffer*, om tenslotte nog enkele woorden te wijden aan complement-bindingsreacties.

Dat bloed van herstellende en herstelde *Weil*-patiënten een beschermende en genezende werking kan ontvouwen, is, zooals we in het vorige hoofdstuk zagen, sinds langen tijd bekend. Het lag dus voor de hand na te gaan welken invloed dit bloed of serum op culturen van leptospira icterohaemorrhagiae uitoefende. *Haendel*, *Ungermann* en *Jaenisch* (83) stellen al spoedig de lytische werking van deze sera vast. *Uhlenhuth* en *Fromme* (14), *Corrales* (84), *Mélanidi* (85) en anderen toonden een agglutinatorisch vermogen aan. Spoedig bleek ook dat de sera van actief tegen *Weilsche* ziekte geïmmuniseerde dieren, zoowel wat betreft lysis als agglutinatie grooten invloed hadden op leptospirenculturen (*Uhlenhuth*

en *Fromme* (14)). Evenzoo bleek dat sera van herstelde lijdens aan Nanukayami immuunstoffen met agglutinatorische en lytische werking tegen leptospira hebdomadis bevatten (*Ido, Ito* en *Wani* (48)). Doch tevens werd duidelijk, en dat is van belang, dat deze sera geheel zonder uitwerking waren op culturen van leptospira icterohaemorrhagiae, ook al waren deze stammen afkomstig van Japansche *Weil*-patiënten. Ook *Oba, Katayami* en *Sumi* (86) vonden dat icterohaemorrhagiae en hebdomadis culturen alleen geagglutineerd werden door homogeen antiserum, zonder eenige medeagglutinatatie van de andere stam. *Beger* (87) was in de gelegenheid serum van een lijder aan Nanukayami, die in het laboratorium was geïnfecteerd, te onderzoeken. Ook hij kon geen werking op icterohaemorrhagiae stammen vast stellen.

Eindelijk moet ik nog vermelden de onderzoekingen van *Koshina, Shiozawa* en *Kitayama* (88). Hun bleek dat in Japan, behalve Nanukayami nog een andere acute koortsige ziekte voorkomt, voornamelijk in den herfst. Dit is de zogenaamde *Akyami* waarvan zij een epidemie hebben onderzocht. Deze aandoening wordt ook door een leptospira veroorzaakt. Zij konden evenwel twee stammen aantoonen, die serologisch niet geheel gelijk waren, één ervan dekte de leptospira hebdomadis volkomen, de andere vertoonde enkele afwijkingen. Beide ondergingen in het geheel geen invloed van anti-icterohaemorrhagieserum. Hoewel dus deze onderzoekingen het hebdomadis vraagstuk niet eenvoudiger maken, wijzen ze er toch wel op dat de hebdomadis groep een afzonderlijke plaats inneemt ten opzichte van de icterohaemorrhagiae groep. Trouwens ook *Mochtar* (74) komt in zijn proefschrift, op grond van zijn onderzoekingen met *Weil*-, gele koorts-, Sumatra-, rat- en waterstammen, ten opzichte van hebdomadisstammen tot dezelfde gevolgtrekking. Wel heeft hij in zijn proeven een enkele maal een zeer lichte medeagglutinatatie gezien, overigens alleen in de geringe verdunningen, doch hij meent dit verschijnsel, mijns inziens terecht, te mogen verwaarlozen.

Welke is nu de verhouding tusschen *Noguchi's* gele koorts verwekker, de *leptospira icteroides* eenerzijds, en de *leptospira icterohaemorrhagiae* en *hebdomadis* anderzijds? Ten opzichte van de laatste zijn, voor zoover ik heb kunnen nagaan slechts weinig proeven, althans in vitro genomen. *Battistini* (89) nam waar dat lept. hebdomadis niet degenereerde of agglutineerde in anti-icteroides-serum. Evenmin scheen anti-hebdomadis-serum eenigen invloed te hebben op icteroides culturen. Ook *Mochtar* kon in zijn proefschrift geen invloed aantoonen van anti-hebdomadis-serum op gele koorts culturen of andersom. Deze twee groepen schijnen dus serologisch wel ver van elkaar te staan.

Het is zeer lastig, tot nu toe onmogelijk, de verhouding tusschen 1. icteroides en 1. icterohaemorrhagiae te bepalen. *Noguchi* (58) zelf nam zoo goed als geen agglutinatie waar, wanneer hij icterohaemorrhagiae stammen bij anti-icteroides-serum bracht. Ook andersom stelde hij hetzelfde verschijnsel vast, namelijk zeer zwakke agglutinatie van icteroides stammen in anti-icterohaemorrhagiae-serum, daar tegenover sterke agglutinatie in anti-icteroides-serum.

Tot geheel andere gevolgtrekkingen komen *Schüffner* (90) en *Mochtar* (proefschrift). Samenbrenging van gele koortsen *Weil* stammen met anti-gele koorts-serum of anti-*Weil*-serum, gaf steeds verschijnselen van lysis, zoowel wanneer een homologe menging, dus stam met homoloog antiserum, als wanneer een heterologe menging, dus stam met heteroloog antiserum had plaats gevonden. De lysis trad tot in hooge verdunningen op: 1:25000 tot 1:50000, en verschillen konden in het geheel niet worden vastgesteld. Zij komen dus tot het besluit dat het op deze wijze niet mogelijk is deze twee groepen van elkander te onderscheiden.

Agglutinatie- en lysisproeven zijn ook genomen door *Walch* en *Soesilo* (91). Uit hun onderzoekingen blijkt, volgens hetzelfde, niet duidelijk, dat de door hen gebruikte icteroides-stam, die dezelfde was waarmede *Schüffner* had gewerkt, niet een afzonderlijke groep voorstelde, al vertoonde het hieruit bereide anti-serum wel een zekere affiniteit tot typische *Weil*-

stammen. Bovendien vonden ze dat eenige in Batavia uit ratten geïsoleerde stammen, en een uit een lijder aan *Weilsche* ziekte aldaar geïsoleerde stam, een geheel afzonderlijke groep schenen te vormen, verschillend zoowel ten opzichte van echte icterohaemorrhagiae en gele koorts, als ten opzichte van enkele Delische stammen.

Op welke plaats staan nu, serologisch beschouwd, de verschillende uit ratten geïsoleerde stammen? Allereerst valt op te merken dat de Hollandsche ratstammen niet alle gelijk zijn. *Schüffner* (5) vond dat de ratstam Ht. door alle anti-*Weil*- en anti-gele koorts-sera zeer sterk werd beïnvloed, even sterk als homologe stammen, terwijl anti-sera tegen enkele andere in Holland geïsoleerde ratstammen, nl. F. en K. geen werking ontvouwd. Deze 2 stammen werden op hun beurt weder in het geheel niet beïnvloed door anti-*Weil* en anti-gele koorts-serum. Een van deze twee stammen, nl. F. werd echter, volgens de onderzoeken van *Walch* en *Soesilo* wel opgelost door een polyvalent anti-*Weil*-serum en blijkt hier dus wel dichtbij te staan. Een uit een Baltimoreesche rat gekweekte stam werd door Hollandsche *Weil*-sera weer wel beïnvloed, niet door een anti-F-serum. Uit één en ander volgt dus duidelijk dat lang niet alle ratstammen zich gelijk gedragen, en we hieronder vele afwijkingen en nuances zullen aantreffen. Hetzelfde is het geval met de in Indië uit koortsende patiënten geïsoleerde leptospirae. De stammen van *Vervoort*, die van *Baermann* of de Bataviaansche vertoonen duidelijk groote of kleine verschillen zoowel onderling als ten opzichte van echte *Weil*- of ratstammen.

De leptospira pseudo-icterogenes tenslotte, zooals die onder andere door *Schüffner* uit de Amsterdamsche, door *Van Thiel* uit de Leidsche waterleiding is geïsoleerd, schijnt een zelfstandige groep te vormen, ook met onderlinge verschillen, doch voor den mensch niet pathogeen. Of hij echter pathogeen te maken is, blijft voorloopig een vraag die nader onder de oogen zal moeten worden gezien. Er zijn enkele recente

onderzoekingen, welke hierop schijnen te wijzen. Ik hoop die straks nog nader te bespreken.

Proef van Pfeiffer. Naast de lysis in vitro werd al spoedig de lysis in vivo, dus de proef van *Pfeiffer* te hulp geroepen om een differentieel diagnose mogelijk te maken tusschen de *leptospira icteroides* en de *leptospira icterohaemorrhagiae*. *Noguchi* (58) meent dat wel degelijk verschillen zijn waar te nemen tusschen deze twee groepen. Volgens hem is deze reactie zoo goed als specifiek. In tegenspraak hiermede zijn de onderzoekingen van *Theiller* en *Sellards* (92) en van *Sellards* (93). *Sellards* wijst er op dat de reactie van *Pfeiffer* het voordeel biedt dat de proefdieren later vervolgd kunnen worden en hun gezondheidstoestand kan worden gecontrôleerd, waarmede het subjectieve element in de beoordeeling van de reactie geheel wegvalt. Hij stelt als eisch dat de reactie slechts dan positief mag worden verklaard als de dieren blijven leven. Op deze wijze beschouwd gelukte het hem niet, duidelijke verschillen in reactie tusschen de gele koorts *leptospira* en de *Weil-leptospira* aan te toonen. Bij gelegenheid van een gele koorts epidemie in Parahyba, welke overigens onmiddellijk week na het nemen van doeltreffende anti-muskieten maatregelen, was hij in de gelegenheid sera van 11 reconvalescenten te onderzoeken, zoowel ten opzichte van een icteroides- als van een icterohaemorrhagiaestam. Alle *Pfeiffer'sche* reacties waren negatief en alle dieren gingen dood. Hij is dus van meening dat deze reactie in het geheel niet in staat is hulp te bieden bij de differentieel diagnose tusschen de beide micro-organismen. Ook *Puntoni* (94) kreeg resultaten waaruit niets viel op te maken. *Mochtar* beschrijft in zijn proefschrift evenzoo enkele proeven volgens *Pfeiffer*. Hij heeft slechts een gering aantal proeven genomen, omdat hem bleek dat het serologisch onderzoek in vitro betrouwbaarder was en meer waardevolle resultaten gaf. Uit de verkregen resultaten concludeert hij dat een *Weil*-stam uit Rotterdam overeenkomt met de gebruikte gele koortsstam, maar dat een

stam, afkomstig van een koortsende patiënt in Sumatra ervan verschildte. Uit zijn onderzoekingen blijkt verder nog, dat, zoowel de icteroidesstam als de icterohaemorrhagiaestam tot in dezelfde verdunningen van de antisera werden beïnvloed, dat dus de titer van de sera ten opzichte van beide stammen gelijk was. Dit is van belang in verband met de opvattingen van *Noguchi*, die er juist den nadruk op legt, dat de verschillen tusschen gele koorts- en *Weil-leptospirae* quantitatief zijn, op een meer of minder berusten, waarmede *Mochtar's* ervaringen en die van anderen, in strijd zijn.

Kaneko en *Morihana* (94), benevens *Ido*, *Ito* en *Wani* (95) hebben met behulp van de proef van *Pfeiffer* de leptospira hebdomadis met de leptospira icterohaemorrhagiae vergeleken. Zij besluiten dat de eerste zich ook ten opzichte van de proef van *Pfeiffer* geheel anders gedraagt als de laatste. Anti-hebdomadis-sera gaven steeds een negatieve proef van *Pfeiffer* met icterohaemorrhagiaestammen, steeds een positieve met hebdomadis stammen.

Complementbindingsreactie. Hierover kan ik kort zijn. Er zijn slechts weinige onderzoekingen naar de aanwezigheid van complementbindende stoffen ingesteld. *Haendel*, *Ungermann* en *Jaenisch* (83) konden ze niet aantoonen in serum van *Weil*-patiënten. Als antigeen gebruikten ze zoowel orgaanextracten als spirochaeten culturen. *Costa* en *Troisier* (96) konden wel een „sensibilitrice” aantoonen, welke echter niet specifiek was, aangezien niet-syphilitische *Weil*-patiënten soms ook een positieve reactie van *Wassermann* vertoonden, welke waarneming door *Pettit* (97) kon worden bevestigd. *Noguchi* (58) heeft de complementbindingsreactie nagegaan, zoowel bij gele koorts als *Weilsche* ziekte en kon ook geen absolute resultaten boeken: hij vond namelijk een zwak positieve reactie met het heterologe antigeen, een sterkere met het homologe. Zooals men ziet zijn de verschillende gevolgtrekkingen met elkander in tegenspraak en is deze onderzoekingsmethode voorloepig niet in de praktijk te gebruiken.

Kruisimmuniteitsproeven. Dat caviae actief geïmmuniseerd konden worden tegen opvolgende infectie met leptospirae van denzelfden stam, is reeds in de eerste jaren der leptospira-onderzoekingen bekend geworden. Is deze immuniteit specifiek en doet ze ons een middel aan de hand de leptospirae, en hier geldt het voornamelijk de leptospirae icteroides en ictero-haemorrhagiae van elkander te onderscheiden? Dit bleek niet het geval te zijn. Wel meent *Noguchi* (58) dat de gekruiste immuniteit niet zoo volledig is als de rechtstreeksche, doch andere onderzoekingen zijn hiermede in tegenspraak. *Manson Bahr* en *Wenyon* (98) zagen hun caviae gezond blijven, na immunisatie met *Weil*-stammen, gevolgd door infectie met een dodelijke dosis icteroides cultuur. Ook *Mochtar* ziet een zuivere gekruiste immuniteit tusschen alle *Weil*- en gele koorts-stammen. Deze werkwijze is dus al evenmin in staat de oplossing van het gele koorts-vraagstuk te brengen.

Wel vond *Mochtar* dat caviae, na actief te zijn geïmmuniseerd met hebdomadis- of waterstammen, niet immuun werden tegen *Weil*- en gele koorts-infectie. Deze nemen dus immunologisch een andere plaats in.

Thrombocyto-barinenreactie. Voor ik dit hoofdstuk besluit, dien ik nog even de aandacht te vestigen op een verschijnsel dat het eerst is beschreven door *Rieckenberg* (99), dat door *Kritschewsky* en *Tscherikower* (100) nader is verklaard en later door hen (101) is toegepast op leptospira icterohaemorrhagiae. *Rieckenberg* mengde op een voorwerpglas een druppel bloed van ratten die genezen waren van een trypanosomeninfectie, in dit geval *Naganakoorts*, met wat citraatbouillon en een gelijke hoeveelheid cultuur van de trypanosomen waarmede de rat was geïnfecteerd. Hij nam nu waar dat de trypanosomen met de thrombocyten verkleven, en meende hierin een zeer specifiek verschijnsel te zien. Hij wil het verklaren door het oorzakelijk moment in de thrombocyten te zoeken. *Kritschewsky* en *Tscherikower* zijn het hier-

mede niet eens, want zij vonden het phenomeen ook als zij uitgingen van immuunplasma of immuunserum met willekeurige thrombocyten, doch zonder immuunbloedplaatjes. De reactie verliep negatief als ze alleen de immuunbloedplaatjes gebruikten zonder immuun-plasma of -serum, doch was positief door toevoeging van willekeurige thrombocyten bij immuunplasma. Zij gelooven dus dat de antistoffen, die ze thrombocytobارينen noemen, in de bloedwei aanwezig zijn en dat ze door het antigeen, dus de trypanosomen worden geabsorbeerd. Zij konden dit verschijnsel nu ook waarnemen als ze ratten of muizen met leptospira icterohaemorrhagiae infecteerden en vonden altijd een duidelijke specificiteit ten opzichte van andere spirochaeten. Van Thiel (76) immuniseerde muizen tegen waterleptospirae en vond een sterk positieve thrombocytobارينen-reactie tegenover de homologe stam, een negatieve tegenover zijn ratstam. Misschien zal het mogelijk blijken door middel van deze reactie verschillende leptospirae van elkander te onderscheiden.

Zeer onlangs vestigt Erika Hermann (128) de aandacht op het door haar waargenomen verschijnsel dat twee icteroides-stammen niet groeiden op rattenserum, Weil-stammen daarentegen wel. Misschien dat hierin een differentieel-diagnostisch kenmerk schuilt.

Als we nu de balans opmaken van ons differentieel kunnen, dan mogen wij aan de creditzijde de leptospira hebdomadis plaatsen, die, in zijn beide tot nu toe bekende typen, zoowel serologisch als immunologisch duidelijke verschillen vertoont met alle andere stammen. Ook de saprophytische waterstammen bevinden zich voorshands nog aan dezelfde zijde, omdat ook zij van de andere zijn te onderkennen. Wij zullen echter rekening dienen te houden met de mogelijkheid dat zij in virulente vormen overgaan, waarover straks. Welke echter de verhouding is tusschen de leptospira icterohaemorrhagiae, de leptospira icteroides, sommige rat- en Sumatra stammen is

voorloopig nog onbekend. Vooral de vraag of de leptospira icteroides werkelijk een geheel aparte vorm vertegenwoordigt en als veroorzaker van de gele koorts beschouwd mag worden, is nog in het geheel niet opgelost.

Margaretha Zuelzer slaagde er in 1922 in door geregelde overenting een saprophytische avirulente waterspirochaet in een voor caviae virulente om te zetten. Kort geleden publiceerde zij met *Baermann* (102) een artikel uit Sumatra waarin zij mededeelt verschillende waterstammen door caviapassage virulent te hebben gemaakt. Nieuwe onderzoeken dienen te worden afgewacht. Vooral interesseert ons de vraag hoe de virulente stam zich serologisch tegenover de andere virulente en tegenover zijn eigen avirulente voorouders gedraagt. Als een en ander kan worden bevestigd en dus blijkt dat sommige waterspirochaeten in virulente zijn over te voeren, rijst opnieuw de vraag in hoeverre alle leptospirae in elkander kunnen overgaan. Intusschen mag niet worden vergeten dat virulente vormen onder ongunstige omstandigheden tijdelijk avirulent kunnen worden en dat *Zuelzer* deze stammen voor haar onderzoek — althans gedeeltelijk — kan hebben gebezigd. Dat dergelijke vormen in water en modder kunnen voorkomen, soms nog in virulenten toestand, is bekend. *Buchanan* (103) isoleerde uit slib aan den bovenkant van een mijngang in Schotland, op een plaats die niet toegankelijk was voor ratten, een pathogene leptospira. Hier dus oogen-schijnlijk een saprophytisch levende en toch pathogene leptospira.

Om tot een helder inzicht in de verhouding der leptospirae te komen is een grondige bestudeering noodzakelijk. Men zal zich echter niet uitsluitend tot de serologische eigenschappen mogen bepalen, maar zoowel vorm, bouw als biologie aan een nader onderzoek moeten onderwerpen. Misschien zal het op die wijze gelukken dit ingewikkelde en interessante vraagstuk nader bij zijn oplossing te brengen.

HOOFDSTUK III

EEN EN ANDER OVER BOUW EN BE- WEEGLIJKHEID VAN LEPTOSPIRA ICTEROHAEMORRHAGIAE

Het standpunt van *Gonder* (104), die van meening was dat de leptospira icterohaemorrhagiae slechts 2 of 3, meestal vlakke windingen bezat, wordt tegenwoordig wel door niemand meer verdedigd. De aanwezigheid van een groot aantal, steile windingen, de zoogenaamde primaire windingen staat onomstootelijk vast. Vooral met de *Giems*kleuring na fixeering in osmiumzuurdampen, die tegenwoordig algemeen wordt gebruikt, is het mogelijk buitengewoon mooie praeparaten te vervaardigen. Met deze kleurmethode wordt de fijnere structuur veel minder beschadigd, dan met de ook veel gebezigde verzilveringsmethode.

Martin en *Pettit* (105) zijn van meening dat de leptospira icterohaemorrhagiae in het bezit is van één of meer cilia. Zij gronden deze meening op praeparaten, vervaardigd volgens *Löffler* of volgens de verzilveringsmethode. Op hun microfoto's ziet men inderdaad aan de uiteinden, en soms ook niet geheel eindstandig, dunne draadjes, veelal uitlopend in een rond schijfje, hetwelk intensief gekleurd is.

De overgang van het dikke gedeelte van de leptospira in het dunne, geschiedt niet geleidelijk, doch plotseling, zoodat, volgens de opvatting van *Martin* en *Pettit*, de eigenlijke leptospira overal vrijwel even dik is, om dan, aan één of

aan beide uiteinden in de „zweepdraad” over te gaan, aan welks uiteinde zich dan de cirkelvormige verdikking bevindt. Bij nauwkeurige beschouwing van de fotografieën blijkt dit „cilium” niet overal even dik te zijn, maar bevinden er zich hier en daar dikkere en donkerder gedeelten in. Het knopje aan het uiteinde weten *Martin* en *Pettit* niet te verklaren. De aanwezigheid hiervan pleit er mijns inziens wel sterk tegen, dat we met een zweepdraad te maken hebben. Immers de functie hiervan, zou door een dergelijke verdikking aan het vrije einde, sterk worden gestoord, zoo niet onmogelijk gemaakt. Dergelijke schijfvormige uiteinden zien we bovendien ook vaak bij de levende leptospirae in het donkere veld en evenzoo in *Giemsa*-praeparaten. Ze bevinden zich dan echter bij de uiteinden van de leptospirae zelf, dus bij den wortel van eventueel aanwezige zweepdraden en niet aan de uiteinden hiervan, zooals *Martin's* foto's zouden doen vermoeden. Bovendien pleit het abrupt eindigen van de cilindervormige spirochaet in de praeparaten van *Martin* en *Pettit* er tegen, dat deze plaats inderdaad overeenkomt met het uiteinde zelf, waar we immers, zoowel in het donkere veld als in het *Giemsa*-praeparaat duidelijk waarnemen, dat de leptospira zich langzamerhand en regelmatig naar zijn uiteinden toe verdunt, terwijl ook de primaire windingen vrijwel tot het einde toe doorloopen. Ook de, reeds genoemde, plaatselijke verdikkingen en verdunningen van het cilium zijn niet goed te verklaren.

Ik ben dan ook van meening dat we hier met kunstproducten te maken hebben, veroorzaakt door de gevolgde techniek. Voor zoover mij bekend, hebben latere onderzoekers deze vormsels nooit kunnen waarnemen. Ik heb zelf verscheidene praeparaten volgens *Löffler* vervaardigd, doch het is mij nooit mogen gelukken op cilia gelijkende aanhangsels zichtbaar te maken, ook niet wanneer ik veranderingen in de techniek aanbracht.

Een ander vraagstuk dat we onder de oogen moeten zien

is het al of niet aanwezig zijn van een asdraad. — *Dietrich* (106) schrijft hierover het volgende: „Die Windungen sind von groszer Regelmässigkeit, nur an den Enden scheinen sie bisweilen etwas aus einander gezogen. Aus diesem Grunde und mit Rücksicht besonders auf die Bilder im *Giemsa* Ausstrichspräparat erscheint es möglich, dass die Windungen durch einen ungefähr der idealen Längsachse folgenden elastischen flexiblen Achsenfaden gestützt werden, wenn es bei der Kleinheit der Objekte und mangels geeigneter Differenzialfärbung auch nicht gelungen ist, diesen Faden im Spirochätenleib sicher Erkennbar dar zu stellen.” — Hieruit blijkt dus wel, dat *Dietrich* een asdraad waarschijnlijk, althans mogelijk, acht. Maar in hetzelfde artikel beschrijft hij nog een ander kenmerk. Hij mengt zijn cultuur met een gelijke hoeveelheid reconvallescenten serum en meent dan al gauw een opzwellling te zien, gevolgd door een uiteenvallen in een soort fibrillen. Wanneer hij nu hiervan *Giemsa*-praeparaten maakt, vindt hij bijna altijd onder deze fibrillen één sterker gekleurde, die tegelijk de langste is en de sterkst gewondene. Juist omdat deze zoo lang is, gelooft *Dietrich* dat hij zal loopen langs de buitenkant der windingen. Hierin zou de grootste bewegingsenergie gezeteld zijn. — *Dietrich* geeft hiervan een mooie teekening maar geen foto's. — We hebben dus hierin een ander organel te zien dan een asdraad. — Min of meer in tegenspraak hiermede schijnen de onderzoeken van *Margaretha Zuelzer*. Zij gelooft ook aan de aanwezigheid van een asdraad. Deze maakt ze op de volgende manieren zichtbaar. — Bij de levende cultuur wordt immuunserum gevoegd en het mengsel onder het microscoop in het donkere veld bekeken. De spiraal, welke de primaire windingen vormt, begint al spoedig op te lossen. Eerst aan de uiteinden, daarna hoe langer hoe meer naar het midden toe. Bij deze oplossing ziet men, dat een recht draadje, centraal gelegen, in het geheel niet wordt aangestast. Eerst als de spiraal geheel is opgelost, trekt dit laatst overgebleven draadje zich samen en verandert in één onherkenbare massa. Hetzelfde neemt zij waar, na toevoeging van

1:10 taurocholas natricus. *Zuelzer* meent dus een andere inwerking van immuunserum te zien, als *Dietrich* beschrijft. Waaraan deze verschillen zijn toe te schrijven, heb ik niet kunnen opsporen. Het is uit het artikel van *Margaretha Zuelzer* (107) niet na te gaan of zij sera van actief geïmmuniseerde dieren gebruikt, of, evenals *Dietrich* sera van reconvalescenten.

Ook op andere wijze is het aan *M. Zuelzer* gelukt de asdraad zichtbaar te maken. Volgens *Giemsa* gekleurde praeparaten worden door haar gedifferentieerd, hetzij met water, hetzij met aceton en daarna microscopisch onderzocht. Ook dan wordt de geheele spiraal ontkleurd en komt tenslotte hetzelfde beeld voor den dag, als ze verkreeg uit, met immuunsera behandelde levende culturen.

Ik heb getracht den invloed na te gaan van taurocholas natricus op eenige *Weil*-stammen, alle afkomstig van in Holland waargenomen patiënten, door *Professor Schüffner* welwillend ter mijner beschikking gesteld. De 4 hiervoor gebezigde stammen, A, B, C en G genoemd, waren alle reeds langen tijd in cultuur: de jongste, G, meer dan 6 maanden, de andere langer dan een jaar. Als voedingsbodem werd geregeld gebruikt een gewijzigd milieu van *Vervoort*, waarvan de juiste samenstelling hier moge volgen. In gedestilleerd water wordt 1 ‰ pepton Witte opgelost; het geheel even opgekookt en door papier gefiltreerd. Aan het filtraat wordt toegevoegd 25 ‰ van een gewijzigde *Ringersche* oplossing (Na Cl 3,5, K Cl 0,100, Na HCO₃ 0,050, Ca Cl₂ 0,100, aq. ad. 500) en daarna 10 ‰ van de totale hoeveelheid, van de op Ph 7 ingestelde *Sörensensche* fosphaat buffer. Dit mengsel wordt weer gekookt, door papier gefiltreerd en in buisjes verdeeld, die daarna gedurende 30 minuten bij 100° worden gesteriliseerd. Aan elk buisje wordt tenslotte 10 ‰ normaal, geïnactiveerd konijneserum toegevoegd.

Op dezen voedingsbodem gekweekt, groeiden alle stammen steeds behoorlijk, de eene keer wat weelderiger dan de andere,

doch bijna nooit behoefde vrees te bestaan voor afsterving van de cultuur. De overentingen geschieden eenmaal per week; bebroed werd bij een temperatuur van 30° Celsius.

Een goed gegroeide, 7 dagen oude cultuur wordt met een gelijke hoeveelheid 10% steriele taurocholas natricus-oplossing in gedestilleerd water, gemengd. Eerst mengde ik op het voorwerpglas onder de microscoop, door van beide vloeistoffen 1 öse te nemen. Al spoedig bleek mij dat een dergelijke geringe hoeveelheid te spoedig indroogde, waardoor bestudeering van het verloop werd afgebroken. Bovendien was het op die wijze niet mogelijk later na te gaan, of het misschien nog gelukken zou, deze gemengde cultuur door overenting in het leven te houden. Daarom ging ik later als volgt te werk. 2 kubieke centimeter van de te onderzoeken cultuur wordt in een reageerbuis gemengd met een gelijke hoeveelheid 10% taurocholas natricus oplossing en op verschillende tijdstippen onderzocht. Men dient hierbij in het oog te houden dat de taurocholas natricus concentratie in het mengsel dus 5% bedroeg.

De culturen werden onderzocht in het donkere veld met den gewonen paraboloïd condensor van Zeiss en bij 200-voudige vergrooting (objectief D-Oculair IV). De dichtheid van de culturen werd als volgt aangegeven: + stelt voor enkele, hoogstens 10 spirochaeten per gezichtsveld bij bovengenoemde vergrooting; ++ tusschen 10 en 50; +++ 50—200 en ++++ meer dan 200 per gezichtsveld. Het spreekt vanzelf dat de telling, vooral in de dichtere culturen, slechts schattenderwijs kon geschieden. Wanneer er te veel leptospirae in het gezichtsveld waren, om het in zijn geheel te kunnen tellen, heb ik mij bediend van een rond ondoorzichtig kartonnen schijfje, dat in het oculair werd gelegd en waaruit een sector was gesneden van 45° . Op die manier kreeg ik telkens $\frac{1}{8}$ gedeelte van het gezichtsveld te zien, waardoor de telling aanmerkelijk werd vergemakkelijkt. Voor elke bepaling telde ik nu 8 sectoren, verdeeld over 2 gezichtsvelden.

Bij elke volgende sector werd het oculair en daarmee het telschijfje ongeveer 90° gedraaid. Ik ben mij bewust ook hiermede niet geheel nauwkeurig te hebben kunnen tellen, doch de gemaakte fouten zullen hierdoor wel zijn beperkt.

Hieronder volgen nu de verslagen van enkele dezer proeven:

Cultuur A 91, + + + +, 7 dagen oud. 2 c.c.M. wordt gemengd met 2 c.c.M. 10 $\frac{0}{10}$ taurocholas natricus. Microscopisch onderzoek:

Na 1': de spir. zijn veel minder beweeglijk dan die in de ernaast gelegde contrôle druppel; vorm niet veranderd.

Na 2': bijna alle doodstil, sommige vertoonen nog korte en plotselinge trekkingen; misschien iets minder lichtbrekend.

Na 5': Veel minder lichtbrekend, wazig en moeilijker te vinden, het aantal spirochaeten per gezichtsveld schijnt sterk verminderd. Geen duidelijke draadjes.

Na 10': Nog enkele schimmen die als spirochaeten zijn te herkennen.

Na 15': Het is zeer lastig nog iets te vinden wat op een spirochaet lijkt. Met *zekerheid* te herkennen is er geen enkele.

Na 2, 5, 10 en 15 minuten werden culturen aangelegd. Van de 2, 5, 10 en 15 minuten behandelde cultuur wordt telkens $\frac{1}{2}$ c.c.M. gebracht in 5 c.c.M. gewone voedingsbodem en in de stoof gebracht. Men dient in het oog te houden, dat zich hierin nu een zekere hoeveelheid taurocholas natricus bevindt. De ingebrachte hoeveelheid van het mengsel, $\frac{1}{2}$ c.c.M., bestond uit een 5 $\frac{0}{10}$ taurocholas natricus oplossing. Hierin bevond zich dus $\frac{1}{40}$ c.c.M. taurocholas natricus. Deze hoeveelheid wordt gebracht bij 5 c.c.M. voedingsbodem; in de totale hoeveelheid van $5\frac{1}{2}$ c.c.M. bevindt zich dus $\frac{1}{40}$ c.c.M., dit is iets minder dan $\frac{1}{2} \frac{0}{10}$, nauwkeurig 0.46 $\frac{0}{10}$. We zullen dus moeten nagaan of leptospirae in een dergelijke taurocholas natricus concentratie kunnen groeien. Als contrôleproef plaatste ik dus een $\frac{1}{2} \frac{0}{10}$ tauroch. natricus in 5 c.c. voedingsbodem naast de eigenlijke proef; entte deze buis met een

$\frac{1}{4}$ c.c.M., normale cultuur, omdat ik dan een gelijke hoeveelheid van de oorspronkelijke cultuur inbracht, en dus ongeveer evenveel spirochaeten als de verschillende behandelde, dus met gelijke hoeveelheid taurocholas natricus oplossing bedeelde buizen oorspronkelijk bevatten.

Na 1 week incuberen bij 30° volgde microscopisch onderzoek:

contrôle: +++, normaal beweeglijke leptospirae;

2' : ++, idem; normale beweeglijkheid.

5' : negatief.

10' : „

15' : „

Na nog 1 week bebroeden: 2' ++; 5' negatief; 10' negatief; 15' geïnfecteerd.

Conclusie:

5% taurocholas natricus tast deze leptospirae vrijwel gelijkmatig aan. Van een resistente asdraad is niets te bespeuren. Na 2' inwerking zijn er nog genoeg levens- en deelingsvatbare leptospirae over, om in staat te zijn zich te vermenigvuldigen wanneer ze onder gunstiger levensvoorwaarden worden gebracht.

Gelukte het dus bij deze proef niet, iets wat op een asdraad geleek zichtbaar te maken, in andere gevallen was het beeld anders. Bijvoorbeeld:

Stam G 108, 7 dagen oud, +++, gemengd met een gelijke hoeveelheid 10% taurocholas natricus oplossing. Om den gang van zaken althans gedurende de eerste minuten geregeld te kunnen volgen, wordt onmiddellijk een groote druppel onder het microscoop gebracht en bestudeerd. Ik teekende het volgende op: Reeds na één minuut zijn vele leptospirae onbeweeglijk, na 2 à 3 minuten allemaal. Spoedig daarop krijgen sommige een korreltype, gelijkend op de vormen die Reiter spirochaeta nodosa noemde. Soms liggen de korrels op vrijwel gelijkmatige afstanden van elkaar, soms zijn er

grootere open plekken tusschen; in deze, kortere of langere open gedeelten, zien we soms niets, soms slechts iets niet nader te bepalen wazigs, soms iets wat zeer duidelijk den indruk maakt van een dun, zeer weinig lichtbrekend draadje. Intusschen zijn er op hetzelfde oogenblik leptospirae te zien, die uitsluitend als dun draadje over zijn, doch die niet het korrelstadium zijn gepasseerd, maar waarvan de spiraal geleidelijk en gelijkmatig hoe langer hoe waziger is geworden, om tenslotte geheel onzichtbaar te worden. Dit alles valt geheel binnen de eerste 5 minuten. Daarna begint de druppel indrogingsverschijnselen te vertoonen en zijn de beelden niet meer betrouwbaar. Na 10' en 15' (telkens nieuwe druppels) veranderen de beelden niet veel. Wel worden de draadjes, die soms nog wat pluizig blijven, waziger, zoo, dat ze heel lastig zijn terug te vinden, wanneer men ze even uit het oog verliest, maar veel verandering vindt er niet plaats. Na 25' echter is er niets definieerbaars meer te zien.

Overentingsproeven, geheel op dezelfde wijze als bij de vorige beschreven proef na 5', 10' en 15' negatief; contrôle +++.

Conclusie:

We zien hier een andere reeks beelden als bij de eerste proef. We krijgen wel degelijk den indruk dat het taurocholas natricus op de spiraal veel sneller inwerkt dan op het centrum, zoodat ik geloof aan dit centrum, onder hetwelk ik dan een dun, rechtverlopend gedeelte versta, een andere samenstelling, althans een andere weerstand tegenover het vergif te moeten toekennen als aan de peripherie.

De uitkomsten van deze twee proeven bij verschillende stammen zijn dus niet gelijk. Ik heb daarom de proef met stam A nog 2× herhaald, die met stam G nog 3×, en heb tevens den stam B en C ieder 2× aan dezelfde proef onderworpen. De kweekproeven heb ik, voor wat betreft stam A en G gestaakt, voor B en C ieder 1× gedaan. Ik moge hier dadelijk mededeelen, dat B na 5' niet meer overentbaar bleek,

doch dat C na 10' inwerking nog in staat bleek zich te vermenigvuldigen, na 15' niet meer.

De herhalingen met stam A vielen beide keeren geheel gelijk uit als de eerste proef; die met stam G $2\times$ als de boven beschrevene; de derde maal was dit niet zoo duidelijk en geleken de beelden meer op de bij A beschrevene; dit was de eenige maal dat ik een stam gebruikte die ouder was dan 1 week, nl. $4\frac{1}{2}$ week oud.

De beelden verkregen met de stammen B en C, waren vrijwel gelijk aan die van G. Bij beide stammen bleven op een gegeven oogenblik dezelfde dunne draadjes over, als ik bij G. had waargenomen.

Eindconclusie:

Taurocholos natricus in een 5% oplossing bij een goed groeiende leptospiren cultuur gebracht, tast de micro-organismen in den regel het eerste in de peripherie aan. De spiraal wordt of gelijkmatig of bij gedeelten opgelost en tenslotte blijft een recht verloopend dun draadje over, dat veel langer weerstand biedt, doch tenslotte ook geheel verdwijnt. Dat stam A en de 1 maand oude stam G zich anders schijnen te gedragen is, voor wat betreft A, misschien gevolg van het feit, dat deze stam in een minder gunstig stadium verkeerde en den indruk maakte, aan het degenereren te zijn: ik heb dien stam ongeveer 2 maanden later verloren, nadat ik hem bij elke overenting zag achteruitgaan en hem op geen enkele manier, ook niet door dierpassage, heb kunnen redden. Het afwijkend resultaat van de oude stam G is misschien juist het gevolg van zijn ouderdom. Het zal noodig zijn de proeven hiermede te herhalen en uit te breiden. In elk geval meen ik, dat de uitkomsten van deze proefjes steun geven aan de opvatting van M. Zuelzer, dat inderdaad een asdraad aanwezig is.

Verder heb ik — zooals boven reeds werd aangeduid — getracht gekleurde praeparaten met behulp van water of

aceton te differentiëren. De kleuring geschiedde volgens *Giemsa* met de volgende techniek.

Een eerste vereischte voor het slagen is, absoluut vetvrije voorwerpglazen te gebruiken. Hiertoe kookte ik de glaasjes tweemaal gedurende 10 minuten uit in een mengsel van gelijke hoeveelheden 6% zwavelzuur- en 6% kaliumbichromaat-oplossing. Na afkoelen en afschenken van de vloeistof worden de glazen één voor één met een uitgegloeid pincet uit de kookkolf verwijderd en 3 maal in telkens versch gedestilleerd water gewasschen, daarna bewaard in 96% alcohol. Vlak voor het gebruik worden ze hier met een uitgegloeid pincet weder uitgenomen. Na verdamping van den alcohol wordt er een zoo dun mogelijke uitstrijk van de te onderzoeken cultuur opgebracht, welke, na bij kamertemperatuur te zijn gedroogd, gedurende 1 minuut wordt gefixeerd in de dampen van een 1% osmiumzuuroplossing. De kleuring geschiedde met *Giemsa*-oplossing: 1 druppel op 1 c.c.M. licht alkalisch water. In het begin bepaalde ik de alkaliteit volgens de bekende haematoxyline-methode. Omdat dit vrij veel tijd kostte, voegde ik al spoedig op ongeveer 7,1 ingestelde *Sørensen's* phosphaatbuffer toe, waarmede de resultaten zeer gunstig waren. De kleuring zelf geschiedde bij kamertemperatuur, gedurende 18 uur. Na afloop werd de kleurstof snel met water afgespoeld en het praeparaat aan de lucht gedroogd.

1. Ontkleuring met water.

Wanneer men de zoo vervaardigde praeparaten nu onder water brengt, ziet men al zeer spoedig, na 2 à 3 minuten, dat de leptospirae lichter van kleur worden en ook, althans oogenschijnlijk dunner. Bij voortzetting van de bewerking blijven tenslotte slechts zeer flauw gekleurde, uiterst dunne draadjes over, waaraan of waarom geen spoor van een spiraal meer is te herkennen. Deze behandeling met water neemt evenwel zooveel kleurstof weg, en maakt de spirochaeten zoo weinig lichtbrekend, dat het mij niet is mogen gelukken microfoto's ervan te maken, ook niet bij verlichting in

het donkerveld: de contrasten waren hiervoor te gering.

2. Ontkleuring met aceton.

Hier was de gang van zaken eenigszins anders. Want hier maakte het den indruk, dat de kleurstof van de spiraal veel eerder en sneller werd uitgeloozd, dan die van het centrum. Maar behalve dit, bleek bovendien dat de spiraal ook niet overal even snel werd aangetast, zoodat we op sommige plaatsen nog goed gekleurde gedeelten, naast geheel ontkleurde partijen zien. Dit bracht mede dat de contrasten vrij sterk

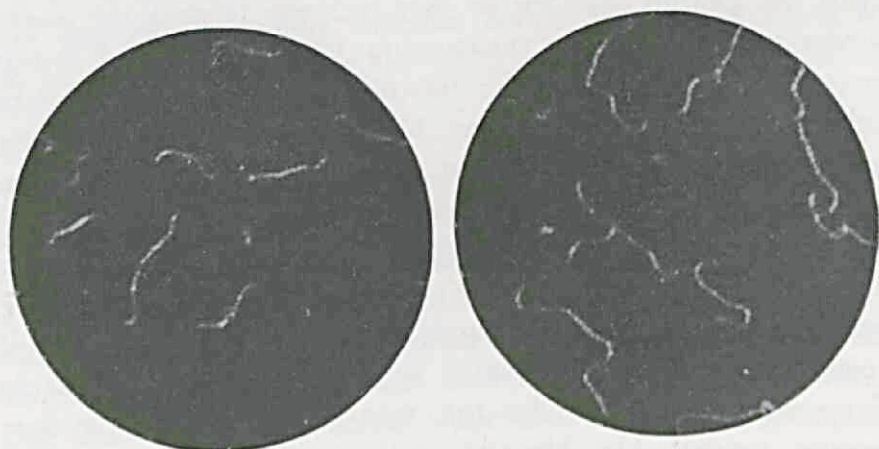


Foto 1.

Foto 2.

bleven, wat vooral tot uiting kwam bij onderzoek in het donkerveld. Ik heb nu bij donkerveld-belichting enkele foto's gemaakt die hier zijn gereproduceerd. Ze zijn gemaakt met Zeiss' phoku op chromo-isolar platen, olie immersie $\frac{1}{12}$, negatieflens *H*; booglampbelichting, belichtingsduur 3 à 4 minuten. De eindvergrooting bedraagt ongeveer $1600\times$.

1 en 2 zijn fotografieën van het gekleurde, niet met aceton behandelde praeparaat van *G. 7* dagen oude cultuur. De primaire windingen zijn, zooals wij dat bij donkerveld belichting gewend zijn, duidelijk als sterk lichtbrekende knopjes te zien.

3 is gemaakt naar hetzelfde praeparaat als 1, nadat dit 5 minuten met aceton was behandeld.

Uitsluitend om aan te geven, waarop dient te worden gelet en geenszins met de bedoeling natuurgetrouw te zijn heb ik, van deze en de volgende foto's een schetsteekening er naast geplaatst.

Vrijwel in het midden van 2 der 3 leptopirae is een kort gedeelte, dat veel minder lichtbrekend en veel dunner is dan de uiteinden, terwijl deze verdunning vrijwel plotseling plaats vindt en niet langzamerhand, zooals wij dat bij dwarsdeeling zien.



Foto 3.



Foto 3a.

De hier verkregen beelden doen denken aan de afbeeldingen, die *Schüffner* geeft van de door hem waargenomen leptospirae bij een geval van zwartwaterkoorts in 1918. (Zie *Arch. für Schiffs- und Tropenhygiene* 1927, No. 4 bldz. 154, fig. 10 en 11.) *Schüffner* acht het mogelijk, dat wij hier met een beginnende, atypisch verloopende, dwarsdeeling te maken hebben, maar wil de mogelijkheid dat door de krachtige *Giemsa*-kleuring, zonder voorafgaande osmiumfixeering, de structuur van de leptospira op deze wijze voor den dag komt, niet uitsluiten. Ik ben van meening, dat de vormen op mijn foto niet aan een beginnende deeling zijn toe te schrijven, doch veeleer het gevolg zijn van de gevolgde ontkleurings-techniek. Waarschijnlijker wordt dit, wanneer we foto 4 bekijken.

Deze is afkomstig van praeparaat 2, nadat het 15 minuten met aceton is behandeld. In het midden zien we een leptospira, waarvan een kleiner bovengedeelte en een grooter onderdeel nog behoorlijk van dwarsafmeting en goed lichtbrekend zijn,

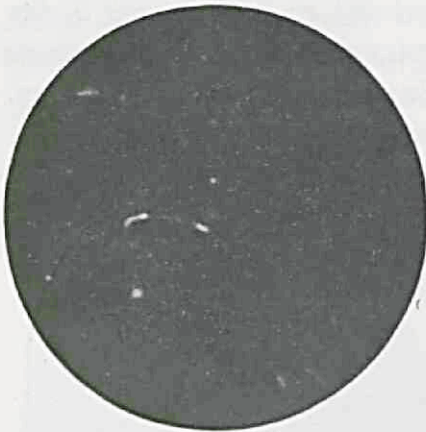


Foto 4.



Foto 4a.

daartusschen in bevindt zich een veel minder lichtbrekend en veel dunner rechtverlopend gedeelte. In hetzelfde praeparaat vindt men tenslotte een vrij groot aantal kortere en langere uiterst dunne draadjes, waarvan in de oorspronkelijke, niet met aceton behandelde praeparaten niets is te zien.



Foto 5.



Foto 5a.

Foto no. 5, van hetzelfde praeparaat als foto 4, vertoont o.a. een lang halfcirkelvormig verloopend dun draadje, waar, aan het rechterondereind nog een goed lichtbrekend schijfje is overgebleven, bovendien verscheidene dunnere en kortere gebogen draadjes, die op de niet behandelde praeparaten ontbreken.

De resultaten verkregen door middel van *taurocholas natricus*-inwerking op levende culturen en die met ontkleuring van *Giemsa*-praeparaten hetzij met water, hetzij met aceton, komen dus vrijwel overeen, afgezien van de inwerking van *taurocholas natricus* op stam A, waar een afwijkend beeld ontstond, dat misschien te verklaren is, uit achteruitgang van den betreffenden stam. Overigens zien we steeds als eindresultaat de beschreven dunne niet gewonden draadvormen, soms nog voorzien van een dikker lichtbrekend gedeelte of puntje, soms ook geheel naakt. Dat deze draad centraal verloopt is a priori en uit microscopisch onderzoek waarschijnlijk. Ik geloof dus, dat we het recht hebben, hier van een asdraad te spreken.

Tot slot van dit hoofdstuk nog enkele woorden over de beweging. *Martin* en *Pettit* wijden hieraan in hun monographie (105) slechts enkele woorden: „Quand il se meut, il ne le fait qu'assez lentement, en présentant des mouvements vermiculaires ou une sorte de rotation sur place.” *Haendel*, *Ungermann* en *Jaenisch* (83) zijn uitvoeriger. Zij hebben wel een voor- en achteruitbeweging opgemerkt, doch gelooven dat de karakteristieke bewegingsbewijze bestaat in een bliksemsnel draaien om de lengte-as waarbij de beide uiteinden als haken zijn omgebogen. Deze laatste wijze van beweging, die dus niet met een verplaatsing van het geheele micro-organisme gepaard gaat, schijnen zij als de natuurlijke, de verplaatsing als van minder belang te beschouwen.

Daarentegen beschouwt *Zuelzer* in *van Prowazeks'* handboek juist het rechtlijnig snel voorwaarts zwemmen bij krachtige culturen als het meest voorkomend. Deze verplaatsing komt

volgens haar tot stand door het snel draaien der omgebogen lichaamsuiteinden van de spirochaet. Daarnaast beschrijft ze de beweging, zonder verplaatsing, waarbij de omgebogen uiteinden zich iets strekken.

Bij rustige bestudeering van een groot aantal culturen in het donkerveld trekken enkele eigenaardigheden toch wel de aandacht.

Stammen, welke korten tijd geleden uit menselijke patiënten zijn geïsoleerd of waarvan de cultuur in vitro is onderbroken door een cultuur in vivo, dus caviapassage, vertoonen percentsgewijze veel meer werkelijke verplaatsing, dan stammen, die langdurig in een ononderbroken reeks van buis op buis zijn overgeënt. Daarnaast echter valt het ook op, dat sommige stammen hun verplaatsingsneiging langer behouden dan andere. Mijn stam G bijvoorbeeld, hoewel reeds lang zonder dierpassage vertoont dit verschijnsel duidelijk, evenals een stam Stokes, die ik uit Engeland ontving en die aldaar langen tijd in cultuur is gehouden. Het spreekt vanzelf dat alle stammen steeds in hetzelfde milieu en bij dezelfde temperatuur werden gekweekt. De genoemde verschillen zijn ook niet afhankelijk van den groei: de exemplaren in uitstekend en minder goed groeiende culturen behouden toch percentsgewijze ongeveer dezelfde verplaatsing.

Alle in mijn bezit zijnde stammen verplaatsen zich minder, wanneer ze ouder worden, onafhankelijk van het feit of ze bij kamertemperatuur, dan wel bij broedstooftemperatuur (30°C.) worden bewaard. 6 weken oude culturen vertoonen relatief veel meer beweeglijkheid ter plaatse, ten opzichte van verplaatsing, dan jongere culturen.

Wat nu het mechanisme van de verschillende bewegingen aangaat, ben ik van meening, dat de beweging zonder verplaatsing eenigszins anders in zijn werk gaat, dan de verplaatsing. Bij deze laatste toch zien we nooit, of althans zeer weinig, de uitgesproken hoek van ongeveer 90° tusschen eindstukken en middengedeelte, welke juist zoo duidelijk is

bij de beweging. Ook blijft het middengedeelte bij de verplaatsing in den regel vrijwel rechtgestrekt, terwijl het zich in het laatste geval in bochten wringt. Ik kan dus met *Zuelzer's* opvatting niet meegaan.

Soms valt het bij de verplaatsing op, dat het achterste vrije uiteinde stil of langzaam slingerend achteraan sleept, zonder aan de voortbeweging mede te doen, terwijl het voorste gedeelte dan eenigszins den indruk maakt als trekschroef dienst te doen, ofschoon dit niet met zekerheid is te zien. Wanneer dan de spirochaet zijn voorwaartsche beweging in een achterwaartsche omzet, dus zonder om te keeren, hetgeen vrij veelvuldig voorkomt, schijnen de rollen te wisselen en neemt het achterste einde, tot voorstuk geworden, de rol van het vroegere vooreinde over. Ook het omgekeerde is soms het geval, dus een opduwen in plaats van een optrekken. Doch onder al deze omstandigheden ziet men het middenstuk steeds vrijwel gestrekt blijven. Het snelle „blitzartige” bewegen van de beide uiteinden tegelijk, gepaard met groote buigingen en knikkingen van het middenstuk, wat bij de beweging ter plaatse regel is, nam ik bij de werkelijke verplaatsing nooit waar.

Al deze verschijnselen zijn, in verband met de geringe afmetingen der objecten en de snelheid der bewegingen uiterst lastig met zekerheid vast te stellen. Wel kan men de snelheid wat verminderen door toevoeging van één of ander vergif of immuunserum, doch men heeft dan niet meer het recht de ontstane bewegingen als normaal te beschouwen. Het beste ware, naar het mij voorkomt, één en ander in een film, bij voorkeur in een vertraagde film, vast te leggen.

HOOFDSTUK IV

OVER DEN INVLOED VAN ZUURSTOF- ONTTREKKING OP HET LEVEN VAN DE LEPTOSPIRA ICTEROHAEMORRHAGIAE

Voordat we nagaan welken invloed geheele of gedeeltelijke onttrekking van zuurstof op het leven der leptospira uitoefent en trachten uit te maken of deze micro-organismen de zuurstof zoeken of schuwen, en in welke mate, is het noodzakelijk ons eerst af te vragen wat we onder aerobie, wat onder anaerobie hebben te verstaan.

Bij het naslaan van de literatuur dan trekt het onmiddellijk de aandacht, dat de opvattingen omtrent het wezen der aerobie en anaerobie zich in den loop der jaren hebben gewijzigd.

Pasteur, die zijn boterzuurbacillen zag groeien, als hij door den voedingsbodem koolzuurdampen leidde, ze daarentegen zag sterven, wanneer hij het koolzuur door een zuurstofstroom verving, merke naar aanleiding hiervan op: „Cet infusoire vit sans gaz oxygène libre” (108).

Hij noemde nu micro-organismen aeroob, wanneer ze voor het leven zuurstof nodig hadden, anaeroob als ze de zuurstof konden missen (109). Hiermede was de tegenstelling aeroob—anaeroob geschapen.

Liborius (110) onderscheidt, ongeveer 20 jaar later, reeds drie groepen, en wel de obligaat-anaeroben, de facultatief anaeroben en de aeroben. In de eerste groep vat hij dan die micro-organismen samen, welke voor al hun levensfuncties

een totale afwezigheid van zuurstof zouden vereischen. Facultatief anaeroob zijn degene, die het beste groeien, wanneer ze ruim met zuurstof in aanraking kunnen komen, maar die onder anaerobe of nagenoeg anaerobe omstandigheden toch een vrij behoorlijke ontwikkeling vertoonen.

Beyerinck (111) voert nieuwe begrippen in. Obligaat anaeroben vereischen volgens hem algeheele afwezigheid van zuurstof, terwijl de voedingsbodem reduceerende eigenschappen moet bezitten. Onder temporair anaerobe micro-organismen vatte hij die samen, welke zich, door gebruik te maken van een in de cellen aanwezige hoeveelheid gebonden zuurstof-reserve, konden vermenigvuldigen. Wanneer deze zuurstof echter verbruikt is, sterven ze af, als geen nieuwe zuurstof wordt toegevoegd. Voor zoover ik zien kan, zijn zulke micro-organismen slechts *schijnbaar* anaeroob, omdat ze zonder zuurstof afsterven, al is deze dan misschien niet onmiddellijk uit de lucht afkomstig. Facultatief anaeroob wil hij die micro-organismen noemen, die bij voortduring, zoowel met, als zonder zuurstof kunnen leven. Micro-aerophiel, tenslotte, zijn de bacteriën die een lage zuurstofspanning eischen.

Chudiakow (112) ziet in — en dit is een stap verder — dat aeroben, zoowel als anaeroben slechts groeien kunnen binnen bepaalde grenzen van zuurstofspanning. Hij onderscheidt dus een minimum en een maximum.

Rothert teekent hierbij aan dat de obligaat anaeroben geen minimum hebben, in tegenstelling met de aeroben.

Wund (113) heeft een uiterst nauwkeurig onderzoek ingesteld naar minimum, maximum en optimum zuurstofspanning bij een groot aantal micro-organismen.

Arthur Meyer (114) stelt, met het oog op de behoeften van de praktijk, twee nieuwe termen voor, namelijk aerophiel en aerophoob. De eerste groeien in lucht, de tweede doen dit onder geen omstandigheden.

Van de opvatting der latere onderzoekers wil ik er ook nog enkele vermelden.

Reichebach (115) is van meening, dat bepaling der drie

kardinale punten: minimum, optimum en maximum het voornaamste is.

Flu (116) zegt: „Kunnen de bacteriën zich alleen dan vermenigvuldigen, als de zuurstof vrij tot hunne culturen kan toetreden en houdt hun groei op, of gaan ze dood, als men ze in een omgeving brengt, waaruit alle zuurstof verwijderd is, dan noemt men ze obligaat aerobe micro-organismen. Kunnen bacteriën zich, hoewel slecht, in een zuurstofvrije of zuurstofarme omgeving vermenigvuldigen, maar doen ze dit beter als ze zuurstof tot hun beschikking hebben, dan geeft men hun den naam van facultatief aerobe micro-organismen.” Overeenkomstig hiermede, definieert hij facultatief anaerobe als die, „welke het weelderigste groeien in een zuurstofvrije omgeving, maar zich toch ook vermenigvuldigen, indien zuurstof tot hunne culturen toetreden kan. De obligaat anaeroben zijn alleen dan te kweken, als men er voor zorgt de zuurstof uit de media, waarin men ze kweken wil, te verwijderen, of de spanning daarvan tot een minimum te reduceeren.”

Park en Williams (116) zeggen, dat de meerderheid der micro-organismen verschillende hoeveelheden zuurstof noodig heeft, maar dat een gedeelte niet groeit zonder zuurstof. Organismen, die ook groeien als de voorwaarden niet de gunstigste zijn, noemen ze facultatief.

Courmont (117) schrijft: „à côté des microbes aérobies, c'est à dire exigeant pour vivre une grande quantité d'oxygène libre, il y avait des microbes anaérobies, pour lesquels l'oxygène est une véritable poison, microbes ne poussant que dans un milieu complètement dépourvu de ce gaz.”

Gotschlich (118) geeft een overzicht van de verschillende opvattingen, en komt tot de slotsom, dat anaerobe bacteriën zijn ingesteld op een minimale zuurstofspanning of op geheel ontbreken van zuurstof. Obligaat aeroben kunnen slechts groeien bij aanwezigheid van zuurstof en hebben een minimum, een optimum en wellicht een maximum van zuurstofspanning. Facultatief anaerobe bacteriën kunnen zoowel bij aanwezigheid als bij afwezigheid van zuurstof groeien. Ik heb mij bij

mijn eigen proeven aan deze definities gehouden, met dien verstande, dat ik facultatief anaerobe bacteriën zou willen definiëren als bacteriën die bij voorkeur aeroob groeien, maar zich onder afsluiting van zuurstof toch ook vermenigvuldigen al is het dan niet zoo goed als bij zuurstof toevoer. Omgekeerd vat ik onder facultatief aerobe bacteriën die samen, welke bij voorkeur anaeroob, desnoods ook aeroob groeien.

Door verschillende onderzoeken, onder andere die van *Ferran* (119) is de scherpe grenslijn anaeroob—aeroob eenigszins verdoezeld. Hij slaagde erin zoogenaamde obligaat anaeroben langzamerhand aan zuurstof te wennen. Verder rijst de vraag of de anaeroben nu werkelijk groeien bij totale afwezigheid van zuurstof, of dat er nog minimale hoeveelheden zuurstof aanwezig moeten blijven. De ons ten dienste staande indicatoren zijn echter zoo gevoelig, dat inderdaad slechts sporen zuurstof aan onze waarneming kunnen ontsnappen.

Een ander punt, dat we onder de oogen moeten zien, is dit: is er een verschil in de hoeveelheid zuurstof noodig om te blijven leven, en die om zich te vermenigvuldigen, met andere woorden, is er voor vermenigvuldiging een ander minimum, optimum en eventueel maximum, als voor blijven leven? In de literatuur kan men hierover weinig vinden: de begrippen worden gewoonlijk in één adem genoemd, of door elkander gehaald.

Wat is nu bekend van de zuurstofbehoefte der *leptospira icterohaemorrhagiae*?

Dietrich geeft zijn meening in de volgende woorden weer: Die Spirochäten wuchsen sowohl unter aeroben Verhältnissen, wie unter Paraffin-Abschluss, als auch unter streng anaeroben Bedingungen (Pyrogallusäure in Buchner-Röhrchen) Dabei fiel, wie schon *Reiter* beobachtet hat, auf, dass bei Sauerstoffzutritt das Wachstum bedeutend langsamer vor sich ging. Bei völligem Sauerstoffabschluss erfolgte das Wachstum sehr

schnell, erreichte nach 2—3 Tagen bereits seinen Höhepunkt und liesz dann rasch nach, um den auftreten eigenartigen Körnchen (Granula) zu weichen.

Ungermann (120) zegt onder meer het volgende: „sind demnach für die Kultivierung der Weilschen Spirochäte streng anaerobe Bedingungen nicht erforderlich so ist es zur Erzielung einer üppigen Vermehrung doch nötig, den weiteren Luftzutritt zu den Kulturflüssigkeiten zu verhindern.“ Hij bereikt deze zuurstofbeperking door op zijn cultuurbuizen, wanneer ze nog warm zijn, een dikke laag steriele paraffine-olie te gieten. Ook *Kaneko* (121) vindt dat paraffine olie den groei gunstig beïnvloedt. Waarvan dit een gevolg is, is niet geheel duidelijk. Streng anaeroob worden de verhoudingen hierdoor zeker niet. Lucht kan bovendien door de paraffine heen diffundeeren, zooals door *Gates* en *Olitzki* (122) is aangetoond.

Noguchi (79) meent dat de leptospirae obligaat aeroob zijn, ook *Griffith* (123) is deze meening toegedaan, evenzoo *Zuelzer* (124). *Manteufel* was eerst (125) van meening dat ze zoowel aeroob als anaeroob kunnen groeien, later (126) bleek hem, dat bij de door hem gebruikte anaerobe kweekmethode (pyrogallol of platinazwam) toch altijd nog geringe hoeveelheden zuurstof aanwezig bleven. Daarom gebruikt hij bij zijn tweede onderzoek een gewijzigde methode *Trenkmann*. Bij het voedingsmilieu, dat vloeibaar moet zijn voegt hij een klein beetje slappe natriumsulfide oplossing als reductiemiddel. Na de enting wordt de buis onmiddellijk met vloeibare vaseline overgoten. Een 1 % waterige methyleenblauw oplossing op dezelfde wijze behandeld en als contrôle gebruikt, bleek na weinige minuten ontkleurd te zijn. Een voordeel is volgens *Manteufel* de snelle zuurstofverwijdering. Tevens ging hij na of het kleine beetje toegevoegde sulfide kwaad zou kunnen doen aan den groei; dit bleek niet het geval te zijn. Hij zag nooit groei in de anaerobe buizen, terwijl de contrôles goed aangeslagen waren. Terloops zij medegedeeld dat een hebdomadisstam en waarschijnlijk ook een icteroidesstam hetzelfde verschijnsel vertoonden.

De vraag doet zich voor of de uit het sulfide ontstane sulfieten en sulfaten (er ontwijkt vrij H_2S) de spirochaeten niet aantasten. Want wel hebben *Uhlenhuth* en *Zuelzer* (78) gevonden, dat 2 uur doorleiden van H_2S de vitaliteit van de spirochaeten *niet* beïnvloedt, doch dit is iets anders als 4 etmalen kweeken (*Manteufels'* bebroedingsperiode) voortdurend in een sulfiet-sulfaat omgeving.

Zooals men uit deze korte samenvatting ziet, zijn de meeningen nog verdeeld, al helt men er langzamerhand meer en meer toe over, zuurstof als onontbeerlijk voor het leven der leptospirae te beschouwen. De gunstige invloed der paraffine-laag zou misschien een aanwijzing kunnen zijn, dat de optimale zuurstof-spanning niet ligt op het niveau van den atmospherischen druk, maar lager. Ook andere spirochaeten groeien onder paraffine vaak beter dan bij vrije toetreding van lucht, onder andere spirochaeta pallida en spirochaeta recurrentis (124).

Ik heb den invloed van zuurstofonttrekking nagegaan op het leven van 4 stammen van Hollandsche leptospirae, B, C, D en G. De eerste drie stammen zijn serologisch identiek, de laatste vertoont, wat betreft lysis en agglutinatie verschillen met de 3 andere.

Inrichting der proeven. Een zuurstofvrije omgeving wordt bereikt met behulp van de flesch van *Mc. Intosh* en *Fildes* (127). Deze glazen cylinder is van boven luchtdicht gesloten met een metalen deksel, waarin toe- en afvoerbuizen met kranen en een palladium-asbest electrode, die, door middel van twee contacten aan de buitenkant van de deksel, in verbinding kan worden gebracht met een stroom van ongeveer 30 volt, die het palladium tot gloeiing brengt.

Nadat de culturen in de pot zijn gebracht, wordt de deksel gesloten en gedurende enkele minuten een krachtige waterstofstroom door de flesch gejaagd. Hierdoor wordt de groote meerderheid van de lucht door waterstof vervangen.

Om de laatste zuurstofresten te vervangen, wordt de palladium-electrode aan het gloeien gebracht: er ontstaat een katalysatorische werking, waardoor de nog aanwezige zuurstof zich met de waterstof tot water verbindt, hetwelk op de wand van de flesch neerslaat.

De stroom wordt ongeveer een uur doorgeleid, dan is de in de flesch aanwezige zuurstof indicator (waarover straks) geregeld ontkleurd. Voor de flesch nu werd weggezet, leidde ik nog even wat waterstof in (*Pondman*). Immers door de watervorming is de druk iets lager geworden, dan die van de buitenlucht. Het zoo ontstane drukverschil tusschen binnen en buiten werkt een aanzuiging van lucht in de hand, waardoor de resultaten onbetrouwbaar zouden worden. Juist in het feit, dat gasdruk binnen en buiten de flesch gelijk is, schuilt de oorzaak dat het met deze methode gemakkelijk gelukt een zuurstofvrije atmosfeer te verkrijgen en te behouden. Als indicator gebruikte ik een alcalisch glucose-methyleenblauwmengsel, dat door reductie kleurloos wordt en dit dus in de flesch moet blijven. De drie hiervoor benodigde reagentia zijn: een 6 0/0 waterige $\frac{N}{10}$ Na OH-oplossing, een 6 0/0 waterige glucose-oplossing en een $\frac{1}{2}$ 0/0 waterige methyleenblauw-oplossing. Hiervan worden gelijke hoeveelheden bij elkaar gedaan, het mengsel gekookt tot het kleurloos is, en daarna snel in de flesch gebracht. Het gelukt geregeld de oplossing gedurende langen tijd kleurloos te houden.

Wanneer men nu bedenkt, dat deze indicator uiterst gevoelig is, en bij aanwezigheid van sporen zuurstof onmiddellijk blauw wordt, mag men den inhoud van de flesch practisch zuurstofvrij noemen.

De bedoeling van de eerste proeven was nu ter oriëntatie na te gaan, welken invloed de waterstof atmosfeer op een goed gegroeide leptospiren cultuur van de verschillende stammen uitoefende. Daartoe werd van elken stam een 7 dagen oude cultuur in tweeën gedeeld. De eene helft werd onder

anaerobe omstandigheden gebracht, de tweede onder aerobe; beide werden verder bebroed bij 30°. Na opening van de flesch werden alle buizen microscopisch onderzocht, overgezet op verschen voedingsbodem en aeroob gekweekt. Dit laatste met het oog op de mogelijkheid, dat overlevende leptospirae aan het microscopisch onderzoek zouden ontsnappen.

De eerste proef duurde 7 dagen (tabel I).

TABEL I.

		Anaeroob			Aeroob (Contrôles)		
7 dagen oude cultuur van stam	Aantal lept. per gezichts-veld	Aantal lept. per gez. veld na 7 dagen	Overgeënt en verder aeroob na		Aantal lept. per gez. veld na 7 dagen	Overgeënt en aeroob gekweekt na	
			1 week	3 weken		1 week	3 weken
B	++++	—	—	—	++++	+++	geïnfect.
C	++++	—?	—	—	+++	++++	+++
D	+++	—	—	—	+++	+++	+++
G	++++	—	—	—	++++	++++	++++

Resultaat:

In geen der anaeroob geplaatste buizen zijn levende of doode leptospirae te zien. — Alleen in buis C is nog een zeer enkele onbeweeglijke, nauwelijks zichtbare schim over. Alle overentingen zijn na 1 en 3 weken negatief.

Contrôles: alle goed; alle overentingen slagen.

Conclusie:

7 dagen oude culturen van leptospira icterohaemorrhagiae stammen zijn, na een 7-daagsch verblijf in een waterstof-atmosfeer afgestorven.

De proef wordt geheel op dezelfde wijze herhaald; doch de zuurstofonttrekking wordt nu slechts 3×24 uur volgehouden (tabel II).

TABEL II.

7 dagen oude cul- tuur van stam	Aantal lept. per gezichts- veld	Anaeroob			Aeroob (Contrôles)		
		Aantal lept. per gez. veld na 3 dagen	Overgeënt en verder aeroob na		Aantal lept. per gez. veld na 3 dagen	Overgeënt en aeroob gekweekt na	
			1 week	3 weken		1 week	3 weken
B	+++	—	—	—	++++	++++	++++
C	+++	—	—	—	+++	+++	++
D	++++	—	—	—	++++	+++	+++
G	+++	—	—	—	+++	+++	+++

Resultaat:

Alle leptospirae zijn na 3×24 uur zuurstofonttrekking verdwenen. Overentings-proeven negatief. Contrôles goed.

Conclusie:

3×24 uur zuurstofonttrekking doodt de leptospirae.

Herhaling van de proef, met dien verstande dat de zuurstof 1×24 uur wordt onttrokken (tabel III).

TABEL III.

7 dagen oude cul- tuur van stam	Aantal lept. per gezichts- veld	Anaeroob			Aeroob (Contrôles)		
		Aantal lept. per gez. veld na 1 dag	Overgeënt en verder aeroob na		Aantal lept. per gez. veld na 1 dag	Overgeënt en aeroob gekweekt na	
			1 week	3 weken		1 week	3 weken
B	+++	—	—	—	+++	++	+++
C	+++	—	+	++	+++	geïnfect.	
D	++++	+	++	+++	++++	geïnfect.	
G	++++	+	++	++	++++	+++	+++

Resultaat:

De uitslag is hier anders. De stammen D en G vertoonden

bij microscopisch onderzoek duidelijk nog enkele leptospirae. De beweeglijkheid was echter wel achteruitgegaan: vooral langzamer. Dat ze nog wel degelijk levensvatbaar waren blijkt uit de overenting, die bij beide stammen aansloeg. Doch ook de stam C, waar microscopisch geen enkele leptospirae te zien was, bleek nog overentbaar te zijn, al was dit pas na 3 weken duidelijk. Hieruit blijkt wel, wat trouwens te verwachten was, dat het niet geoorloofd is op het microscopisch onderzoek een oordeel uit te spreken, over al dan niet afgestorven zijn van een cultuur. Contrôles zijn, afgezien van 2 geïnfecteerde culturen, goed.

Conclusie:

24 uur zuurstofonttrekking is niet in staat de leptospirae regelmatig te doden.

Herhaling van de proef, doch zuurstofonttrekking wordt 2×24 uur volgehouden (tabel IV).

TABEL IV.

		Anaeroob			Aeroob (Contrôles)		
7 dagen oude cul- tuur van stam	Aantal lept. per gezichts- veld	Aantal lept. per gez. veld na 2×24 u.	Overgeënt en verder aeroob na		Aantal lept. per gez. veld na 2×24 u.	Overgeënt en aeroob gekweekt na	
			1 week	3 weken		1 week	3 weken
B	++++	—	—	—	++++	++++	++++
C	+++	—	—	—	+++	++++	+++
D	+++	—	—	—	+++	+++	+++
G	++++	—	—	—	++++	++++	++++

Resultaat:

Microscopisch onderzoek: alle negatief. Geen der over-entingen gelukte.

Contrôles: alle goed.

Conclusie:

2×24 uur zuurstofonttrekking heeft alle leptospirae gedood.

Aangezien hiermede was gebleken, dat 2×24 uur zuurstofonttrekking de kortste termijn was (in etmalen nauwkeurig) in staat de leptospirae te doden, heb ik deze laatste proef nog 4 malen herhaald, waarvan de laatste 2 maal bovendien nog met 2 nieuwe stammen, nl. de Engelsche stam *Stokes* en de Hollandsche stam *M* (*Schüffner*). Steeds waren de uitkomsten dezelfde, n.l. negatief, met één enkele uitzondering, waarover later. Wel waren nu en dan bij het directe microscopische onderzoek enkele onbeweeglijke, passief in de vloeistof drijvende leptospirae te zien, doch nooit slaagden de overentingen.

Het zou mogelijk zijn, althans denkbaar, dat afwezigheid van zuurstof bij broedstooftemperatuur (30°) een anderen invloed uitoefende, als bij kamertemperatuur ($\pm 15^{\circ}$). Daarom heb ik éénmaal de pot van *Mc. Intosh* gedurende 48 uur bij kamertemperatuur laten staan.

Resultaat:

De 4 gebruikte stammen waren afgestorven.

Voorts is het mogelijk, dat de waterstof een invloed ten kwade op den voedingsbodem had, bijvoorbeeld door verandering van de Ph. Daarom werden 4 buizen van $Ph = 7,2$, ongeënt gedurende 6 dagen in de *Mc. Intosh* geplaatst. Na opening bleek de Ph niet veranderd te zijn. Ook van een anderen onbekenden invloed op den voedingsbodem viel niets te bespeuren. Een, op dezelfde wijze behandeld, stel cultuurbuizen werd onmiddellijk beënt: alle stammen groeiden hierop even snel als op de, ter contrôle beënte, buizen, welke niet in de *Mc. Intosh* waren geweest.

Bovendien zullen wij ons moeten afvragen of niet de afwezigheid van zuurstof, maar de aanwezigheid van waterstof de leptospirae doodde. Daartoe zou het noodig zijn de lucht

in de flesch door een ander gas, bijvoorbeeld stikstof te vervangen, en de proeven daarmee te herhalen. Ik had geen stikstof ter mijner beschikking en heb mij daarom op de volgende manier moeten behelpen.

De flesch van *Mc. Intosh* werd op de gewone wijze met waterstof volgeblazen, alleen werd de waterstofstroom wat langer doorgevoerd. Er werd nu *geen* electriche stroom doorgeleid: er bleef dus eenige lucht in de flesch, hetgeen ook bleek uit de indicator, die blauw werd. In deze waterstofrijke en zuurstofarme atmosfeer gelukte het nu regelmatig de leptospirae in leven te houden, zelfs wanneer de culturen er 3 of 4 dagen in werden bewaard. Wanneer de waterstof werkelijk een vergif was, zouden de culturen toch zeker wel eenigen invloed ervan ondervinden, ook al is de concentratie niet zoo sterk als bij absolute luchtverdrijving. Maar, zooals gezegd, hiervan was niets te bemerken: de leptospirae bleven rustig in leven.

Eindelijk heb ik nagegaan of wellicht de leeftijd der cultuur invloed had op het gedrag ten opzichte der zuurstofonttrekking. Allereerst gebruikte ik 3 weken oude culturen van de stammen B, C, D en G, en plaatste die 24 uur in de flesch, daarna een nieuw stel 48 uur. (Zie tabellen V en VI.)

TABEL V.

3 weken oude cul- tuur van stam	Aantal lept. per gezichts- veld	Anaeroob			Aeroob (Contrôles)		
		Aantal lept. per gez. veld na 24 uur	Overgeënt en verder aëroob na		Aantal lept. per gez. veld na 24 uur	Overgeënt en aëroob gekweekt na	
			1 week	3 weken		1 week	3 weken
B	+++	?	—	—	+++	++++	geïnfect.
C	+++	—	—	—	+++	+++	+++
D	++	—	—	—	++	geïnfect.	
G	+++	—	+	+++	+++	++++	+++

TABEL VI.

3 weken oude cul- tuur van stam	Aantal lept. per gezichts- veld	Anaeroob			Aeroob (Contrôles)		
		Aantal lept. per gez. veld na 48 uur	Overgeënt en verder aeroob na		Aantal lept. per gez. veld na 48 uur	Overgeënt en aeroob gekweekt na	
			1 week	3 weken		1 week	3 weken
B	+++	—	—	geïnf.	+++	+++	++++
C	+++	—	—	—	+++	+++	+++
D	+++	—	—	—	+++	++++	++++
G	++++	—	—	—	++++	+++	geïnfect.

Resultaat:

De stam G is na 24 uur anaeroob te zijn bebroed niet dood, de andere wel. Na 48 uur bebroeden zijn ze alle dood.

Daarna heb ik 3 dagen oude culturen van dezelfde stammen aan dezelfde proeven onderworpen; n.l. 24 en 48 uur. Ik zal hiervan niet de tabellen geven, doch uitsluitend de resultaten mededeelen. Na 48 uur waren ze alle afgestorven. Na 24 uur meende ik in één van de buizen (stam B) nog enkele levende spirochaeten te zien, doch de overenting mislukte, evenals van de 3 andere stammen. Deze jonge culturen bleken dus na 24 uur zoodanig beschadigd te zijn, dat ze niet meer overentbaar waren.

Het aantal leptospirae van het uitgangsmateriaal, met andere woorden, de dichtheid van de gebruikte cultuur speelt hierbij een rol. Een groot aantal leptospirae is na 24 uur al vernietigd, slechts een gedeelte overleeft. Hoe meer leptospirae beschikbaar zijn, des te meer kans, dat een voldoende aantal in leven blijft.

Ik moet hier tenslotte nog mededeeling doen van één proef, die met de andere niet in overeenstemming is. Het is mij namelijk éénmaal overkomen, dat de stam G na 48 uur anaeroob te zijn gekweekt nog behoorlijk beweeglijke en overentbare vormen bevatte. Ik heb daarom van dezen stam G

nog éénmaal 4, zeven dagen oude en dichte, culturen (alle 4 afgeënt van verschillende G-buizen) nu gedurende 3×24 uur in de Mc. Intosh geplaatst.

Resultaat: alles afgestorven.

Summa summarum, meen ik uit bovenstaande proeven te mogen concludeeren, dat de door mij gebruikte *Weil*-stammen *obligaat aerobe micro-organismen* zijn; dat anaerobe kweeking gedurende 24 uur een vrij groot gedeelte der culturen doodt; dat na 48 uur anaerobe cultuur zoo goed als altijd alle leptospirae afgestorven zijn, maar dat na 72 uur ook de laatste zijn gedood.

Hebben wij, blijkens het voorgaande, nu gezien dat de leptospirae een geheele onttrekking van zuurstof niet overleven, thans rijst de vraag, hoe zij zich gedragen in een omgeving, waaraan de zuurstof gedeeltelijk is onttrokken.

De techniek van dergelijke proeven is lastig. Want we moeten hier werken met toestellen, waarbinnen de druk geringer is, dan die van de buitenlucht en het is moeilijk het drukverschil constant te houden, tenzij wij dit drukverschil neutraliseeren door aanvulling met een ander gas. Wel zijn hiervoor verschillende toestellen aangegeven, onder anderen de klok van Klein (die trouwens berekend is op een luchtledig), doch gewoonlijk vindt men den volgenden dag de manometer weer opgelopen. Althans zoo ging het mij. Tenslotte heb ik nog het meeste baat gevonden bij een eenvoudige glazen flesch, met vlakke bovenrand, waarop een glazen deksel paste, met kraan. Hiermede is het enkele malen gelukt den inwendigen druk eenige dagen vrijwel constant te houden. De afsluiting geschiedde met behulp van wasvaseline volgens van Riemsdijk: 70 gram was opsmelten, hierbij 30 gram vaseline mengen en laten stollen. Als contrôle werd een zelfgemaakte kwikmanometer in de flesch geplaatst; de bedoeling hiervan was niet zoozeer den juisten druk af te lezen (hiermede zouden, in verband met de gebrekkige constructie, toch fouten worden gemaakt), doch te contrôleeren of de druk in de flesch constant bleef.

Eerste proef: In de flesch worden geplaatst drie goed gegroeide stammen van 1 week oud, en 3 juist van dezelfde buizen afgeënte culturen. Als contrôles werden 2 van dezelfde stellen buizen buiten het toestel, dus bij gewone atmosferische druk geplaatst. De flesch werd leeggezogen tot het niveauverschil in de beide beenen der manometer 1 c.M. bedraagt. Na 24 uur is deze afstand gelijk, na 48 uur is het verschil iets grooter geworden, n.l. 1.2 c.M. Na 72 uur bedraagt het 2 c.M. Er was dus een lek. Ik heb op dit oogenblik de proef dan ook afgebroken.

TABEL VII.

Gebruikt materiaal	Aantal leptospirae per gezichtsveld	Na 72 uur bij ± 1 à 2 c.M. Hg.	Verder gewoon gekweekt na		Contrôles (Normale om- standigheden) na	
			1 week	3 weken	72 uur	1 week
B 7 dagen	++++	enkele onbeweeg- lijke schimmen	—	—	++++	++++
D 7 „	++++	enkele schimmen, onbeweeglijk	—	—	++++	++++
G 7 „	++++	enkele zeer dunne beweeglijke lept.	++	+++	++++	++++
B' juist geënt	± 1 per gez.v.	—	—	—	+	+++
D' „ „	1 op 3 „	5 goed beweeg- lijke per gez.veld	—	—	++++	++++
G' „ „	1 op 2 „	± 25 goed be- weeglijke p.gez.v.	+	+++	++	++++

Resultaat (tabel VII):

Microscopisch zijn uit alle 7 dagen oude culturen de leptospirae voor een groot deel verdwenen: wel zien we hier en daar enkele schimmen, doch deze zijn niet beweeglijk, behalve bij stam G, waar ze zeer dun schijnen, doch zich nog vrij normaal bewegen. In de juist geënte culturen daarentegen heeft, tenminste bij D' en G', nog eenige vermeerdering plaats gegrepen. Bij verder voortgezette kweeking onder normale omstandigheden, blijkt alleen stam G nog levensvatbaar te zijn, alle andere zijn afgestorven.

Conclusie:

Bij dezen geringeren zuurstofdruk kunnen 2 stammen niet blijven leven, alleen stam G, die ook bij algeheele zuurstof-onttrekking het meest resistent is gebleken te zijn, heeft het hier evenzoo uitgehouden.

Herhaling van de proef, met dien verstande, dat de druk wordt verminderd tot ongeveer $\frac{1}{3}$ atmosfeer. Het niveauverschil in de beenen van de manometer bedraagt 25 c.M. Het lukte deze keer de druk gedurende 6×24 uur constant te houden. Er werden alleen juist geënte culturen gebruikt.

Resultaat (tabel VIII):

Alle stammen bleken na 6 dagen nog in leven te zijn en zich te hebben vermeerderd, doch minder dan de contrôles.

TABEL VIII.

Gebruikt materiaal	Aantal leptospirae per gezichtsveld	Na 6 dagen bij $\pm \frac{1}{3}$ atmosph.	Verder gewoon gekweekt 1 w. later	Contrôles (voort- durend gewoon gekweekt) na 6 dagen
B	± 1 op 2 gez.velden	+	+++	+++
C	idem	+	++++	++++
D	idem	++	+++	++++
G	1 per gezichtsveld	++	geïnfect.	++++
M	1 op 2 gezichtsveld.	+	++	++ (veel agglutinatie)
St	2 per gezichtsveld	+++	++++	++++

Dat zij alle nog goed levensvatbaar zijn bewijst kolom 4, die het resultaat weergeeft na 1 week normale bebroeding. Wel viel het op, dat bij sommige stammen (D, C en B) de bewegingen veel langzamer waren dan we gewend zijn te zien.

Conclusie:

In een spanning van ongeveer $\frac{1}{3}$ atmosfeer sterven de leptospirae niet af, maar zijn nog in staat zich te vermeer-

deren, al is het langzamer dan onder normale omstandigheden. De normale luchtdruk lijkt dus gunstiger voor de leptospirae dan deze verminderde.

Dit zijn de eenige proeven, die ik hieromtrent heb genomen. Zooals van zelf spreekt zijn ze onnauwkeurig en uiterst onvolledig. Onnauwkeurig, omdat ik niet in staat was den druk in de flesch met voldoende zekerheid te bepalen, waarvoor ik een gecontrôleerde manometer en barometer ter mijner beschikking had moeten hebben, de juiste inhoud van de flesch, de temperaturen en de uitzettingscoëfficiënt van lucht in rekening had moeten brengen. Onvolledig, omdat het noodzakelijk was geweest ook bij andere verdunningen en bij herhaling het gedrag der leptospirae na te gaan. Bovendien rijst de vraag, in hoeverre nu werkelijk het gebrek aan zuurstof, dan wel de vermindering van den druk een rol spelen. In het laatste geval zou het dus een mechanisch moment zijn, dat de leptospirae beïnvloedde. Om dit uit te sluiten zou ik het ontstane drukverschil hebben moeten neutraliseeren, door aanvulling met een indifferent gas, of direct van een synthetisch gasmengsel uitgaan en daarmede de luchtledige flesch vullen. Ik heb hiertoe tot mijn spijt geen gelegenheid gehad. Toch heb ik gemeend deze beide proeven hier te moeten vermelden, omdat ze althans eenige — zij het een geringe — aanwijzing geven, dat de optimumzuurstofspanning niet zoo bijzonder laag moet worden gezocht.

HOOFDSTUK V

OVER DEN INVLOED VAN ZUURSTOF IN OVERMAAT OP HET LEVEN VAN DE LEPTOSPIRA ICTEROHAEMORRHAGIAE

In het vorige hoofdstuk zagen wij dat de leptospira icterohaemorrhagiae niet leven kan zonder zuurstof. De vraag dringt zich aan ons op, welken invloed een overmaat van zuurstof op de leptospirae heeft. Voor zoover ik heb kunnen nagaan zijn hierover nog geen onderzoekingen gedaan. De enkele proeven welke ik heb genomen, waren op de volgende wijze ingericht.

Een metalen bus, van ongeveer 5 liter inhoud, met een 2 centimeter breede, liggende en geheel vlakke koperen rand, wordt gesloten met een zware ijzeren deksel, eveneens met koperen rand, die precies past op de rand van de pot.

In deze deksel bevinden zich twee buizen met kranen, waarvan één dient als toevoer-, één als afvoerbuis voor de zuurstof. In de bus worden de te onderzoeken leptospirae geplaatst. De deksel wordt gesloten en met plasticine zoo grondig mogelijk afgesloten. Aangezien ik niet beschikte over een cylinder met zuurstof, moest ik dit gas zelf maken, door middel van droge verhitte van een mengsel van kalium-chloraat en bruinsteen in een retort. Hierdoor ontstaat een overvloedige en zeer regelmatige zuurstofgasontwikkeling. Ik gebruikte een hoeveelheid chloras kalicus, voldoende om ongeveer 30 liter zuurstof te maken. Het ontwikkende gas

wordt door een waschflesch geleid. Als de lucht uit retort, waschflesch en verbindingsbuizen verdwenen was en uit de waschflesch zuurstof te voorschijn kwam, die werd aangetoond met behulp van een smeulende houtspaander, welke onmiddellijk helder moest opvlammen, werd de toevoerbuis van de pot met de waschflesch verbonden, waardoor de zuurstof dus in de bus werd geleid. Spoedig kon het ontwijkende gas bij de uitmonding der afvoerbuis worden aangetoond. De doorstrooming werd volgehouden tot het chloras kalicus geheel verbruikt was en de zuurstofstroom duidelijk minder sterk werd. De beide buizen werden dan dadelijk gesloten en het toestel in de stoof geplaatst. Iederen dag werd de zuurstofdoorstrooming herhaald, met dien verstande dat nu telkens ongeveer 15 liter werd doorgeleid. Dit geschiedde, om eventueel ontstane gaswisseling met de buitenlucht, waardoor de zuurstofspanning dus zou verminderen, te neutraliseeren. Ik geloof niet, dat deze gaswisseling belangrijk zal zijn geweest, omdat de pot goed sloot en omdat de druk binnen en buiten gelijk was, namelijk atmospherisch.

Deze dagelijksche behandeling maakte het noodzakelijk het instrument gedurende ongeveer een half uur uit de stoof te nemen, waardoor de culturen aan temperatuursverlaging werden blootgesteld. Ofschoon dit aan den groei der leptospiren zeer waarschijnlijk geen afbreuk zal hebben gedaan, heb ik toch altijd alle contrôles gedurende denzelfden tijd ook uit de stoof genomen, waardoor de temperatuursomstandigheden voor beide groepen culturen dus geheel gelijk bleven. Ik ben overtuigd op deze wijze geen zuivere zuurstofatmosfeer te hebben verkregen, toch geloof ik niet, dat het er heel veel van zal hebben verschild.

Allereerst werden nu 7 dagen oude, goed gegroeide culturen van de stammen B, C, D en G in het toestel gebracht en daar 7 dagen in gelaten (tabel IX). Bij onderzoek na opening blijkt het dat van alle stammen het aantal leptospirae per gezichtsveld is achteruitgelopen (kolom 3). Ook met stam

G is dit het geval, ofschoon het aantal boven 200 per gezichtsveld bleef en dus niet in het aantal kruisjes tot uitdrukking kwam. Deze stammen worden nu overgezet en het restant, benevens de overenting, op de gewone wijze verder gekweekt (kolommen 4 en 5). Ze blijken alle nog overentbaar te zijn. Als contrôles werd de helft van de oorspronkelijke culturen onder atmosferische omstandigheden gedurende 1 week bebroed, daarna overgeënt. Alle contrôles blijken goed te groeien.

TABEL IX.

7 dagen oude cul- turen van	Aantal lept. per gez. veld	Na 1 week in zuurstof per gez. veld	Gewoon ver- der gekweekt na 1 week	Overgeënt en gewoon ver- der gekweekt na 1 week	Contrôleaan- tal lept. p. gez. v. na 1 w. gew. bebroeden	Contrôle over- enten en be- broeden: na 1 week
B	++++	+++	leeggelopen	++++	++++	++++
C	++++	+++	+++	++++	++++	++++
D	++++	+++	+++	+++	+++	++++
G	++++	++++	+++	++++	++++	geïnfect.

Conclusie:

7 dagen oude culturen worden na 7 dagen te zijn gekweekt in een zuurstofrijke omgeving, niet gedood; ze blijven goed overentbaar. Wel vermindert het aantal leptospirae per gezichtsveld, zoodat we den indruk krijgen, dat deze zuurstof-atmosfeer toch minder gunstig voor hen is dan de lucht.

De proef wordt herhaald met 3 culturen van 12 dagen oud (B, C en D); 2 van 16 dagen oud (B en G) en 3 van 22 dagen oud (C, D en G). Het resultaat is hetzelfde: de culturen sterven niet af, gaan in den regel wel wat achteruit in aantal per gezichtsveld, doch blijven overentbaar.

Het uiterlijk van de leptospirae, en de beweeglijkheid, vertoonen na opening van het toestel, evenmin als in de vorige proef, eenige verschillen met de contrôles.

Conclusie:

Deze goed gegroeide culturen, tot 22 dagen oud, worden niet gedood na 7 dagen bebroeding in een zuurstofrijke omgeving.

Herhaling van de eerste proef, namelijk 7 dagen oude culturen van B, C, D en G, met dien verstande, dat het toestel gedurende 7 dagen bij kamertemperatuur wordt geplaatst.

Resultaat:

Alle culturen zijn in leven en goed overentbaar.

Hierna heb ik nagegaan, hoe pas geënte culturen zich gedragen. Het resultaat van deze proef vindt men in tabel X.

TABEL X.

Direct na enting per gezichtsveld	Na 7 dagen in zuurstof-atmosfeer per gez. veld	1 week gewoon verder kweeken	Overenten en 1 week gewoon verder kweeken	Contrôle: gewone bebroeding na 1 week
B $\pm$ 2 lept.	$\pm$ 1 lept.	+++	+++	++++
G $\pm$ 1 "	$\pm$ 2 "	+++	++++	++++
C $\pm$ 1 "	$\pm$ 2 "	++++	++++	++++
D $\pm$ 2 "	$\pm$ 2 "	++	+++	++++
M $\pm$ 2 "	$\pm$ 1 op 2 gez.v.	+	+	+++

De overentingen geschieden eenigszins ruim om te trachten direct na de enting minstens gemiddeld 1 leptospira per gezichtsveld te hebben. Ik telde 5 gezichtsvelden en nam daarvan het gemiddelde. De tweede kolom geeft het aantal leptospirae per gezichtsveld aan, na 7 dagen plaatsing in het toestel. Ook hier berekende ik het gemiddelde uit 5 gezichtsvelden. We zien er in de eerste plaats uit, dat er van een duidelijke vermeerdering geen sprake is. Men krijgt den indruk, dat de toestand blijft, zooals hij is. Verder valt bij het microscopisch onderzoek op, dat bijna alle leptospirae dun en klein zijn. De beweeglijkheid is normaal, behalve bij stam M, waar

bovendien de minste leptospirae waren. Wanneer wij nu deze stammen overenten en, evenals het restant, verder kweken, dan zien we dat alle culturen goed aanslaan, dus dat ze geen van alle hun overentbaarheid hebben verloren. Wel groeit ook hier de stam M langzamer dan de andere; maar het uiterlijk van de leptospirae is geheel normaal en er is een duidelijke vermeerdering.

Conclusie:

Pas overgeënte culturen, gedurende 7 dagen in een zuurstof-atmosfeer gekweekt, worden *niet* gedood, maar schijnen onder deze omstandigheden niet in staat zich te vermeerderen.

Deze proef wordt, geheel op dezelfde wijze, nog eenmaal herhaald, doch nu uitsluitend met de stammen B, C, D en G. De resultaten zijn hetzelfde: van een vermeerdering is niets te zien, doch evenmin zijn de stammen gedood.

In een volgende proef wordt nu getracht na te gaan of gedeeltelijke afsluiting van de zuurstofrijke omgeving eenigen invloed heeft op het gedrag van de pasgeënte culturen in het toestel. Dit wordt getracht te bereiken door de cultuur onmiddellijk na de enting te overgieten met een ongeveer 5 c.M. dikke laag vloeibare paraffine. Want al diffundeert de zuurstof — zooals reeds werd opgemerkt — hier doorheen, toch zal dit niet in zoo sterke mate het geval zijn, dat er geen verschil zou bestaan in zuurstofaanraking tusschen de buizen met en zonder paraffine.

De proef wordt nu als volgt ingericht. Van elke stam worden 4 buizen tegelijkertijd geënt met gelijke hoeveelheden cultuur. Één hiervan wordt voorzien van de paraffine. Deze gaat met één van de andere in het zuurstoftoestel, de derde wordt in de lucht verder gekweekt, de vierde wordt ook van paraffine voorzien en evenzeer in de lucht verder gekweekt. Het resultaat volgt uit tabel XI. In de eerste plaats zien we dat de niet van paraffine voorziene buizen, welke in de zuurstof-

TABEL XI.

Direct na de enting per gezichtsveld	Na 7 dagen in zuurstof- atmosfeer zonder paraff.	Na 7 dagen in zuurstof- atmosfeer met paraffine	Na 7 dagen bebroeding onder normale omstandigh. zonder paraff.	Na 7 dagen bebroeding onder normale omstandigh. met paraffine
B 2 lept.	2 lept. per gez.veld	± 15 lept. p. gez.v.	+++	++++
C 2 "	3 " " "	± 5 " " "	+++	+++
D 3 "	1 " " "	± 10 " " "	+++	+++
G 1 "	2 " " "	± 25 " " "	++++	++++

atmosfeer hebben vertoefd, geen vermeerdering in aantal te zien geven. Alle stammen zijn behoorlijk beweeglijk. Ook nu valt echter weer op, dat de leptospirae dun en kort zijn. De culturen echter, welke onder de paraffinelaag in de zuurstofatmosfeer zijn gekweekt, hebben zich wel vermeerderd. Ook deze herbergen goed beweeglijke leptospirae, welke echter niet zoo dun schijnen als de leptospirae, die zonder paraffine zijn gekweekt. Ofschoon hier dus wel degelijk een vermeerdering heeft plaats gevonden, is deze toch duidelijk minder dan de groei, die in de buiten het toestel geplaatste buizen is opgetreden (4e kolom). In de laatste kolom is de groei weergegeven in de buizen die in de lucht, doch onder paraffine, zijn gekweekt. Er is geen verschil in dichtheid te bemerken met de, zonder paraffine gegroeide, culturen.

De beide series buizen uit het zuurstoftoestel worden op de gewone wijze verder gekweekt en daarna overgeënt. Alle culturen zijn na 1 week goed gegroeid (tabel XII); ook de overentingingen slaan goed aan. Er is nergens een verschil te zien in groei en evenmin in beweeglijkheid, tusschen de al of niet met paraffine voorziene buizen.

Deze proef wordt nog eens herhaald met de stammen B, C, D en M. De resultaten zijn hetzelfde, met dien verstande dat alle D-buizen geïnfecteerd zijn, en daarom bij de beoor-

TABEL XII.

Buizen uit zuurstof-atmosfeer		Na 1 week normale kweek	Daarna over-enten en normaal verder, na 1 week
Zonder paraffine	B	+++	+++
	C	++++	+++
	D	+++	+++
	G	++++	++++
Met paraffine	B	++++	+++
	C	+++	++
	D	++++	+++
	G	++++	geïnfecteerd

deeling uitgeschakeld moeten worden. Afgezien hiervan zien we echter ook nu geen groei, maar wel blijven leven, in de buizen zonder paraffine in de zuurstof; duidelijke, zij het geen overvloedige groei, in de buizen met paraffine, en verder geen verschil in groei tusschen de onder normale omstandigheden gekweekte buizen, al of niet met paraffine afgesloten.

Deze beide proeven leeren ons dus, dat de rijke zuurstof-atmosfeer pas geënte culturen van *leptospira icterohaemorrhagiae* in een week niet doodt, doch wel de deeling belet. Onder normale omstandigheden gebracht, blijken ze niets van hun vitaliteit te hebben ingeboet: deeling geschiedt op normale wijze en overentingen gelukken steeds.

Tevens zien we, dat aanbrengen van vloeibare paraffine op de cultuur vóór het plaatsen in de zuurstofrijke omgeving tengevolge heeft, dat er wel groei plaats heeft.

Uit één en ander kan worden afgeleid dat er voor de *leptospira icterohaemorrhagiae*, althans voor haar deeling, een maximum van zuurstofspanning bestaat, boven welk maximum geen vermenigvuldiging kan plaats vinden, en dat in ieder geval lager is gelegen dan 76 c.M. zuurstofspanning.

Ook een paraffine laag op de geënte buizen aangebracht is niet in staat, de zuurstof in voldoende mate tegen te houden om het optimum te bereiken, ofschoon de deelingsvoorwaarden blijkbaar niet zoo ongunstig zijn.

Tenslotte zouden we uit de dubbele rij contrôles kunnen besluiten, dat er geen verschillen zijn aan te toonen bij kweeking in de lucht met of zonder paraffine. Het laatste is in tegenspraak met de opvattingen van *Ungermann* en van *Kaneko*, in overeenstemming met de meening van *Griffith* en van *Manteufel*.

HOOFDSTUK VI

OVER DE FILTRABILITEIT VAN LEPTO- SPIRA ICTEROHAEMORRHAGIAE DOOR ENTKEIMUNGS-FILTERS VAN SEITZ

De aanleiding tot filtratie proeven heeft voor mij hierin bestaan, dat ik pogingen in het werk wilde stellen tot het aantoonen van een toxine in rijk gegroeide leptospiren culturen. De Seitz-filters zijn hiervoor geschikt, omdat het mogelijk is snel een vrij groote hoeveelheid te filtreren. Ofschoon, zooals bekend is, een groot aantal onderzoekingen zijn verricht over de filtrabiliteit van de leptospirae door Berkefeld- en Chamberland-filters, welke onderzoekingen tot zeer tegenstrijdige resultaten hebben geleid, geloof ik, dat de Seitz-filters nog niet zijn beproefd.

Ik had tot mijn beschikking 3 modellen, namelijk 3, 6 en 14. Deze getallen geven alleen aan de diameter van de filterschijven. Die van 3 en 14 c.M. worden op dezelfde wijze bevestigd met vleugelmoeren. Die van 6 c.M. worden door aanschroeven van het opzetstuk in zijn geheel, vastgeklemd. Deze laatste methode geeft minder goede resultaten dan de eerste. Ik besloot nu het kleinste filter te gebruiken, dus nummer 3, omdat 14 zeer groote hoeveelheden van de te filtreren vloeistof gebruikt, waarvan dan nog bovendien vrij veel door adsorptie in de filterschijf verloren gaat.

Teneinde eenig inzicht te verkrijgen in de betrouwbaarheid van deze filters ten opzichte van bacteries, heb ik als voor-

proeven eenige malen verschillend dikke emulsies van pyocyaneus bacillen en van vogelcholera bacillen gefiltreerd. 24 uur oude pyocyaneus- en vogelcholera culturen op scheve agar, worden met physiologische keukenzoutoplossing afgeschud en daarna in de schudmachine zoo goed mogelijk geemulgeerd. Van deze emulsies wordt, door vergelijking met een standaard emulsie van bekende sterkte, grofweg het aantal kiemen per c.c.M. berekend, daarna worden met physiologische zoutsolutie verschillende verdunningen gemaakt, waarvan dan telkens 5 c.c.M. wordt gefiltreerd.

Het filtraat wordt dan ruim geënt op scheve ascites agar, in runderbouillon en in steek in hooge agar, daarna 2×24 uur bebroed bij 37° . Het resultaat van de filtratieproeven met bacillus pyocyaneus ziet men in tabel XIII. Hieruit kunnen we dus besluiten, dat volgens deze proeven, pyocyaneus-bacillen emulsies minstens tot een sterkte van 5000 miljoen kiemen per c.c.M., door dit filter worden tegengehouden.

TABEL XIII.

Pyocyaneus-filtratie			
Aantal kiemen per c.c.M.	Negatieve druk	Duur der filtratie	Filtraat na 48 uur bedroeding
5000 miljoen	60 cM. Hg.	$1\frac{1}{2}'$	Kiemvrij
2500 "	65 " "	$2'$	"
1000 "	60 " "	$2'$	"
500 "	60 " "	$75''$	"

Vogelcholerabacillen gaan er gemakkelijker doorheen, zooals we kunnen zien uit tabel XIV. In alle sterktes waren de bacillen het filter gepasseerd. We zien dus hieruit, dat de vogelcholera-bacillen door dit E. K.-filter, bij den toegepaste negatieven druk niet worden tegengehouden.

Ik heb de filtratieproeven met pyocyaneus bacillen nog

TABEL XIV.

Vogelcholera-bacillen			
Aantal kiemen per c.c.M.	Negatieve druk	Duur der filtratie	Filtraat na 48 uur bebroeding
5000 miljoen	} 60 c.M. Hg.	2'	groei van vogelcholera
2500 "		2'	idem
1000 "		1½'	idem
500 "		2'	idem

eenige malen herhaald, in dier voege, dat ik slechts met één concentratie werkte, namelijk 5000 miljoen per c.c.M. Van de 3 herhalingen bleken de filtraten 2 maal steriel te zijn. De 3e maal bleek het te zijn geïnfecteerd met een staphylococcus, pyocyaneus-bacillen werden er echter niet in aangetoond.

Uit deze proeven blijkt, dat de filtratie ten opzichte van vogelcholerabacillen niet zoo gunstig is als door de groote E. K.-filters, no. 14, zooals die in het Rijks-Serologisch Instituut zijn genomen. Intusschen mag niet uit het oog worden verloren, dat bij deze laatste proeven de bacillen gesuspenderd waren in serum, hetgeen van invloed op de doorlaatbaarheid kan zijn geweest.

Op deze wijze hebben we dus eenigszins een indruk gekregen van de waarde dezer filters. Men dient evenwel in het oog te houden, dat er tusschen de E. K.-filters en de Chamberland- en Berkefeld-filters dit verschil bestaat, dat de laatste meerdere malen kunnen worden gebruikt, terwijl in de eerste, na éénmalig gebruik, de filterschijf moet worden vervangen door een nieuwe. Kan men dus Chamberland- en Berkefeld-filters vooruit op doorlaatbaarheid onderzoeken en daarna hetzelfde filter voor de proeven gebruiken, bij de E. K.-filters krijgt men een indruk van de doorlaatbaarheid van de te gebruiken filterschijven in het algemeen, en moet men er dus op vertrouwen, dat deze alle even veel of even weinig doorlaatbaar zijn. Ik heb wel eens den indruk ge-

kregen, dat dit niet altijd het geval was. Ik heb daarom bij mijn filtratie-proeven met leptospira icterohaemorrhagiae steeds tegelijk een emulsie van pyocyaneus meegefiltreerd. Deze emulsie was ongeveer 5000 miljoen kiemen per c.c.M. sterk en er werd steeds een mengsel gefiltreerd van gelijke hoeveelheden leptospirencultuur en bacillen-emulsie, zoodat we in dit mengsel een pyocyaneus-concentratie van ongeveer 2500 miljoen per c.c.M. als contrôle meenamen.

Ik heb nu van de stammen B, C, D en G culturen van verschillenden leeftijd gefiltreerd, en wel 3 dagen oude, 1 week oude en 3 weken oude kweeken. De filtraten werden onmiddellijk na afloop van de proef in het donkere veld op leptospirae onderzocht en evenzoo op steriliteit, volgens de reeds aangegeven methode, ten opzichte van pyocyaneus. Wanneer het microscopisch leptospirae-onderzoek negatief was, werd 1 c.c.M. van het filtraat op verschen voedingsbodem overgeënt en na 1 week en zoo noodig ook na 3 weken opnieuw microscopisch onderzocht.

Was intusschen gebleken, dat op de agar- en bouillon-buizen pyocyaneus groeide, dan werd de proef als mislukt beschouwd en overgedaan. Ik moge hier dadelijk bijvoegen dat ik hierdoor 3 proeven heb moeten overdoen, waaruit dus bleek, dat de filters voor pyocyaneus toch niet zoo weinig doorlaatbaar waren, als uit de beschreven voorproeven wel zou kunnen blijken.

De uitslag van de leptospirae-filtratie is als volgt:

Filtratie van 3 dagen oude culturen.

Stam B: Na lang zoeken werden tenslotte in één gezichtsveld 2 zeer goed beweeglijke leptospirae gevonden. Pyocyaneus-contrôle goed.

Stam C en D: Bij beide in het allereerste gezichtsveld al dadelijk 2 resp. 3 normaal uitzierende leptospirae. Van verder zoeken werd afgezien. Pyocyaneus-contrôle goed.

Stam G: In het eerste gezichtsveld 9 leptospirae. Pyocya-

neus-contrôle: gegroeid. De proef werd overgedaan. Nu waren er enkele leptospirae-minder; toch nog ongeveer gemiddeld 5 per gezichtsveld (gemiddelde van 10 gezichtsvelden). Pyocyaneus-contrôle: steriel.

Conclusie:

3 dagen oude culturen worden niet tegen gehouden. Dat stam G nog wat minder scheen te worden tegengehouden dan de andere stammen, kan misschien een gevolg zijn van het feit, dat de cultuur dikker gegroeid was dan die van de overige stammen.

Filtratie van 1 week oude culturen.

Stam B: In het eerste onderzochte gezichtsveld werden direct leptospirae gevonden. Contrôle: goed.

Stam C: Microscopisch onderzoek negatief; contrôle: steriel. Overgeënt: na 1 week en na 3 weken geen leptospirae.

Stam D: Als stam B, doch aangezien de contrôle ook hier was gegroeid, werd de proef overgedaan. Er worden nu bij het microscopisch onderzoek 1 à 2 leptospirae per gezichtsveld gevonden, terwijl de contrôle steriel was.

Stam G: Microscopisch onderzoek negatief. Pyocyaneus-contrôle: steriel. Het filtraat wordt op voedingsbodem geënt en na 1 week onderzocht. De cultuur blijkt uitstekend gegroeid, ongeveer 100 leptospirae per gezichtsveld bij 200-voudige vergroting.

Conclusie:

1 week oude culturen worden niet tegengehouden bij 3 van de 4 stammen. Stam C scheen in dit geval te zijn tegengehouden. We mogen echter niet vergeten dat het negatief blijven van de kweek nog geen absoluut bewijs is, dat er geen leptospirae aanwezig zijn. Want het is meermalen gebleken, dat culturen niet aanslaan, als er slechts enkele leptospirae aanwezig zijn. Een uitweg zou in dit geval cavia

enting hebben kunnen zijn. Dit heb ik niet kunnen doen, omdat de stammen op dat moment voor caviae zoo goed als avirulent waren en ik daarom geen positieve uitkomsten kon verwachten.

Filtratie van 3 weken oude culturen.

Stam B en C: Microscopisch geen leptospirae te vinden; overentingen na 1 en 3 weken negatief; contrôles blijven steriel.

Stam D: Microscopisch 2 à 3 leptospirae per gezichtsveld. Contrôle geïnfecteerd. Herhaling van de proef: 2 leptospirae per gezichtsveld. Contrôle steriel.

Stam G: Microscopisch onderzoek 3 leptospirae per gezichtsveld. Contrôle: Steriel.

Conclusie:

Van de 4 stammen konden er 2 in het filtraat niet meer worden aangetoond, 2 wel. Ofschoon ik uit deze negatieve resultaten niet kan concludeeren, dat er werkelijk geen enkele leptospira meer in aanwezig was, volgt toch in ieder geval uit de proeven met de 2 andere stammen, dat ook oudere culturen van leptospirae door dit filter niet met regelmaat kunnen worden tegengehouden.

Eindconclusie:

Het 3 c.M. groote E. K.-filter is ongeschikt om leptospira icterohaemorrhagiae van de cultuurvloei stof te scheiden.

Zooals ik in het begin van dit hoofdstuk reeds heb opgemerkt, berichten sommige onderzoekers over positieve filtratieresultaten, andere over negatieve, zoowel door Berkefeld- als door Chamberland-filters. Zij, wien filtratie gelukt is (onder andere *Dietrich, Martin en Pettit, Inada, Hübner en Reiter, Van Thiel*) zijn al even positief in hun uitspraken als degenen aan wie het niet is gelukt (o.a. *Uhlenhuth en Fromme*). *Margaretha Zuelzer* is overtuigd dat de leptospira

icterohaemorrhagiae niet filtreerbaar is en dat overal waar het virus filtreerbaar scheen, gewerkt was met onbetrouwbare filters. Zoo eenvoudig is de zaak, naar het mij voorkomt, zeer zeker niet. Want de meeste onderzoekers geven aan, dat ze hun filters voortdurend contrôleerden. Ik heb trouwens zelf ook verscheidene malen, zoowel na filtratie met Berkefeld- als met Chamberland-filters L 2 en L 3, de leptospirae in het filtraat kunnen aantoonen, terwijl de filters tegelijkertijd werden gecontrôleerd. Daar staat evenwel tegenover, dat het mij ook wel is overkomen, dat de leptospirae werden tegengehouden, terwijl ik, voor zoover ik heb kunnen nagaan, onder geheel gelijke omstandigheden en met gelijke culturen heb geëxperimenteerd. Ook de uitkomsten der filtratie-proeven door E.K.-filters waren bij mij soms in tegenstelling met wat ik verwachtte.

Ik waag het niet voor deze tegenstrijdigheden een verklaring te geven. Men moet echter niet uit het oog verliezen dat filtratie door dergelijke filters slechts voor een gedeelte, misschien zelfs voor een klein gedeelte, beheerscht wordt door de verhouding in afmetingen tusschen de te filtreren partikels, in dit geval de leptospirae, en de diameter van de kanaaltjes in de gebruikte filters.

Zonder twijfel speelt adsorptie ook een rol. En deze hangt met de electriche ladingen van filtersysteem en te filtreren cultuur ten nauwste samen. Eenigszins is dit te vergelijken met een bekend verschijnsel uit de kolloïdchemie, hetwelk hierin bestaat dat een positief geladen sol, niet door een bepaald negatief geladen filter heengaat, een negatief geladen sol van dezelfde deeltjes grootte, daarentegen gemakkelijk. Ik hoop in de gelegenheid te zijn hiernaar nog onderzoekingen in te stellen.

GERAADPLEEGDE LITERATUUR

1. Medizinische Klinik, 1915, bldz. 1202.
2. Deutsche Med. W. Schr., 1915, bldz. 1275.
3. Jl. of Exp. Medicine, 1916, dl. 23, bldz. 377.
4. Korrespondenzbl. f. Schw. Aerzte, 1916, bldz. 993.
5. Arch. f. Sch. u. Tropen Hyg., 1927, bldz. 149.
6. Medizinische Klinik, 1915, bldz. 1264.
7. " " 1915, " 1375.
8. Deutsche Med. W. Schr., 1916, bldz. 131.
9. Veroff. a. d. Gebiete d. Milit. San. Wesen, 1911, dl. 46.
10. Deutsche Med. W. Schr., 1911, bldz. 820.
11. Ztschr. f. Hygiene u. Inf. Krh., 1916, dl. 81, bldz. 171.
12. Deutsche Med. W. Schr., 1916, bldz. 1282.
13. " " " 1916, " 465.
14. Ztschr. f. Immf. u. exp. Ther., 1916, dl. 25, bldz. 317.
15. Jl. of Exp. Medicine, 1916, dl. 23, bldz. 557.
16. " " " 1916, dl. 24, bldz. 471.
17. Deutsche Med. W. Schr. 1920, bldz. 1160.
18. Medizinische Klinik, 1916, bldz. 414.
19. Münchener Med. W. Schr., 1916, bldz. 1509.
20. Medizinische Klinik, 1916, bldz. 1477.
21. Comptes rendus d. l. Soc. de Biol. 1917, bldz. 277.
22. Jl. Royal Army Med. Corps, 1916, bldz. 286.
23. Lancet, 1917, bldz. 142.
24. Comptes rendus d. l. Soc. de Biol., 1916, bldz. 947.
25. Arch. Méd. belges, 1917, bldz. 115.
26. " " " 1917, " 207.
27. Bull. Soc. Méd. hôp. de Paris, 1916, bldz. 2073.
28. Comptes rendus d. l. Soc. de Biol., 1916, bldz. 1038.
29. " " " " 1917, " 196.
30. " " " " 1916, " 1142.
31. " " " " 1917, " 474.
32. " " " " 1917, " 806.
33. Berl. Klin. W. Schrift, 1916, bldz. 494.

34. Berl. Klin. W. Schrift, 1916, bldz. 188.
35. Münch. Med. W. Schrift 1917, „ 1572.
36. „ „ 1917, „ 1598.
37. Comptes rendus d. l. Soc. de Biol. 1917, bldz. 101.
38. „ „ „ „ 1917, „ 449.
39. „ „ „ „ 1917, „ 959.
40. Deutsche Med. W. Schr., 1917, bldz. 288.
41. „ „ „ 1917, „ 511.
42. Münch. „ „ 1917, „ 1575.
43. Bull. Soc. Méd. hôp. de Paris, 1918, bldz. 1156.
44. Korrespondenzblatt f. Schw. Aerzte, 1918, bldz. 65.
45. Jl. of Exp. Medicine, 1917, dl. 24, bldz. 341.
46. Comptes rendus d. l. Soc. de Biol., 1918, bldz. 349.
47. Ned. Tijdschr. voor Geneesk. 1923, 2e helft, bldz. 2018.
48. Jl. of Exp. Medicine 1918, dl. 28, bldz. 435.
49. „ „ „ 1919, „ 29, „ 547.
50. „ „ „ 1919, „ 29, „ 565.
51. „ „ „ 1919, „ 29, „ 585.
52. „ „ „ 1919, „ 30, „ 1.
53. „ „ „ 1919, „ 30, „ 9.
54. „ „ „ 1919, „ 30, „ 13.
55. „ „ „ 1919, „ 30, „ 87.
56. „ „ „ 1919, „ 30, „ 95.
57. „ „ „ 1919, „ 30, „ 401.
58. „ „ „ 1920, „ 31, „ 135.
59. „ „ „ 1922, „ 36, „ 357.
60. „ „ „ 1920, „ 31, „ 159.
61. „ „ „ 1920, „ 32, „ 381.
62. Klinische Wochenschrift 1922, blz. 2124.
63. Geneesk. Tijdschr. voor Ned.-Indië 1918.
64. Bull. Soc. Path. Exot. 1922, bldz. 699.
65. „ „ „ „ 1924, „ 291.
66. „ „ „ „ 1921, „ 674.
67. Geneesk. Tijdschr. voor Ned.-Indië 1922, bldz. 697.
68. „ „ „ „ 1923, „ 153.
69. „ „ „ „ 1923, „ 169.
70. „ „ „ „ 1923, „ 885.
71. „ „ „ „ 1923, „ 225.
72. Klinische Wochenschrift 1926, bldz. 2052.
73. Von Prowazek's Handbuch der pathogenen Protozoen, bldz. 1704.
74. Mochtar, A. Proefschrift, Amsterdam 1927.
75. Jl. of Trop. Med. and Hygiene 1925, bldz. 185.
76. Ned. Tijdschr. v. Hyg., Microbiol. en Serologie 1927, dl. 2, bldz. 70.

77. Centralblatt f. Bakt., 1 Abt., dl. 91, bldz. 95.
78. " " " " 85, " 141.
79. Jl. of Exp. Medicine 1918, dl. 27, bldz. 593.
80. Geneesk. Tijdschr. voor Ned.-Indië 1927, bldz. 73.
81. Ztschr. f. Immunitätsf. und exp. Ther., dl. 40, bldz. 148.
82. Centralblatt f. Bakt., 1 Abt., dl. 91, bldz. 90.
83. Arb. a.d. Reichs Ges. Amt., dl. 51, 1919, bldz. 42.
84. Comptes rendus d. l. Soc. de Biol. 1918, bldz. 1079.
85. Comptes rendus d. l. Soc. de Biol. 1920, bldz. 812.
86. Mededeelingen uit het hygiënisch en bacteriologisch laboratorium van de Aichi universiteit. Geciteerd naar M. Zuelzer.
87. Berl. klin. W. Schr. 1921, bldz. 1155.
88. Jl. of Exp. Medicine 1925, dl. 42, bldz. 873.
89. Jl. of Trop. Med. and Hyg. 1925, dl. 28, bldz. 201.
90. Ned. Tijdschr. voor Geneesk. 1926, 2e Helft, bldz. 1252.
91. Geneesk. Tijdschr. voor Ned.-Indië 1927, dl. 67, bldz. 84.
92. Amer. Jl. of Trop. Medicine 1926, bldz. 383.
93. " " " " 1927, " 71.
94. Zeitschr. f. Imm. f. und exp. Ther. 1921, dl. 31, bldz. 201.
95. Jl. of Exp. Medicine 1919, dl. 29, bldz. 199.
96. Comptes rendus de la Soc. de Biol. 1916, bldz. 1038.
97. " " " " " " 1916, " 1041.
98. Lancet 1922, II bldz. 1056.
99. Ztschr. f. Imm. f. und exp. Ther. 1917, dl. 26, bldz. 53.
100. " " " " " 1925, " 42, " 31.
101. " " " " " 1926, " 46, " 207.
102. Klinische W. Schrift, 1927, bldz. 979.
103. British Medical Jl., 1924, II, bldz. 990.
104. Arch. f. Protistenkunde, 1918, dl. 39, bldz. 62.
105. Spirochétose icterohémorragique 1919, Paris.
106. Ztschr. f. Imm. f. und exp. Ther. dl. 26, 1917, bldz. 563.
107. Arb. a. d. Reichsges. Amt dl. 51, 1919, bldz. 159.
108. Comptes rendus d. l. Soc. de Biol. 1861, bldz. 344.
109. " " " " 1863, " 1192.
110. Ztschr. für Hygiene, 1886, bldz. 113.
111. Centr. Blatt f. Bakt., 2e Afd. 1897,
112. Ref. *Rothert* in Centr. Blatt, 2e Afd. 1898, bldz. 389.
113. Centr. Blatt f. Bakt., 1e Afd. 1906, bldzz. 97, 193, 289, 385, 481, 577 en 673.
114. Centr. Blatt f. Bakt., 1e Afd. 1909, bldz. 305.
115. *Friedberger* en *Pfeiffer*. Lehrbuch der Mikrobiologie.
116. Pathogenic Micro-organisms, 1925.
117. Précis de Bactériologie. 1926.

118. Handbuch der pathogenen Mikro-organismen, 3e druk, eerste aflevering, bldz. 119 e.v., 1927.
119. Centr. Blatt. f. Bakt., 1e Afd. dl. 24, bldz. 28.
120. Arb. a. d. Reichs. Ges. Amt. dl. 51, 1918, bldz. 114.
121. Centr. Blatt f. Bakt., 1e afd., dl. 87, 1922, bldz. 198.
122. Jl. of Exp. Medicine, dl. 33, 1921, bldz. 51.
123. Jl. of Hygiene 1919, bldz. 59.
124. Von Prowazek's Handboek, bldz. 1644.
125. Deutsche Med. W. Schrift, 1921, bldz. 46.
126. Centr. Blatt f. Bakt., 1e Afd., dl. 89, 1923, bldz. 266.
127. Lancet, 1916, I bldz. 768.
128. Centr. Blatt f. Bakt., 1e Afd., dl. 104, Beiheft, Bldz. 192.

AANHANGSEL

In *Von Prowazek's* handboek der pathogene protozoën, geeft *M. Zuelzer* een uitgebreide literatuurlijst van vóór 1924 verschenen tijdschriftartikelen en monographieën betreffende leptospirae. In aansluiting hiermede laat ik volgen een zoo volledig mogelijke opgave van tusschen begin 1924 en midden 1927 verschenen literatuur over dit onderwerp. De lijst is in groepen verdeeld. Voor zoover sommige artikelen meer dan één leptospira-soort behandelen, zijn ze zooveel mogelijk in alle bijbehorende groepen vermeld.

Ziekte van Weil, infectieuse icterus, Schlammfieber

- Adamski.* Contribution à l'étude de la biologie de leptospira icterohaemorrhagiae. Comptes rendus d. l. Soc. de Biol., dl. 94, 1926, bldz. 1287.
- Weilsche Krankheit. Klinische Wochenschrift, 1926, II, bldz. 1615.
- Baermann und Zuelzer.* Ueber die Aetiologie der Weilschen Krankheit. Klin. W. Schr. 1927, bldz. 979.
- Bantz.* Demonstratie van een geval der ziekte van Weil. Deutsche Med. W. Schrift, 1924, bldz. 98.
- Barker.* Leptospirosis, with special reference to existence of spirochaetosis icterohaemorrhagica, or Weil's disease in Andaman Islands. Indian Medical Gazette, 1926, bldz. 479.
- Bates.* Leptospirosis icterohaemorrhagica. Canadian Medical Association Journal, bldz. 1926, bldz. 1466.
- Beger.* Ueber aktive Immunisierung mit „gekupferten“ Spirochäten-Kulturen bei der Weilschen Krankheit. Centralbl. für Bakt. I Abt, 1924, dl. 91, bldz. 90.

- De Bettencourt et da Silva.* Ictère épidémique au Portugal. Comptes rendus d. l. Soc. de Biologie, dl. 94, 1926, bldz. 903.
- Bonne.* Conservation du spirochète ictérohémmorragique dans les punaises. Comptes rendus d. l. Soc. de Biol. dl. 91. 1924, bldz. 242.
- Comparaison du spirochète des rats d'Amsterdam avec une souche française ictéro-hémorragique. Annales de l'Institut Pasteur, 1925, bldz. 35.
- Buchanan.* Spirochaetosis icterohaemorrhagica. British Medical Journal. 1924, II. bldz. 990.
- Rapport gevallen van ziekte van Weil in Schotland. British Medical Journal. 1927. I. bldz. 844.
- Spirochaetal jaundice. Monographie. Medical Research Council 1927.
- Burger* Spirochaetosis icterohaemorrhagica. Nederl. Tijdschr. voor Geneeskunde. 1927, I. bldz. 2460.
- Burton, Fanning and Cleveland.* Spirochaetosis icterohaemorrhagica in Norfolk. British Medical Journal. 1926, II. bldz. 108.
- Busch und Gruber.* Unfall und Weilsche Krankheit. Münchener Med. Wochenschrift, 1924, bldz. 451.
- Carbo - Noboa.* Primer caso de leptospirosis icterohemorrhagica en et Ecuador. Ann. Soc. Méd. Quir del Guayas 1924, bldz. 97. Referaat in Bull. Pasteur, 1924, bldz. 898.
- Castello.* Ueber Pathologisch Anatomische Befunde und das Verhalten der Spirochäten beim experimentellen Morbus Weil des Meer-schweinchens, insbesondere über die durch Spirochäten erzeugten Lebernekrosen. Virchow's Archiv f. path. Anat. u. Physiol., 1924, dl. 247.
- Cleyndert* Spirochaetosis icterohaemorrhagica. Ned. Tijdschr. voor Geneesk., 1927, I, bldz. 562.
- Creyx et Bonnel.* Remarques sur l'ictère infectieux. Comptes rendus d. l. Soc. de Biologie. 1926. dl. 94. bldz. 1287.
- Debray et Jonesco.* Spirochétose meningée pure à poussées successives. Presse médicale. 1926. bldz. 568.
- Delamare et Achitouv.* Indices de courbure de Sp. recurrentis et Sp. icterohaemorrhagiae. Comptes rendus d. l. Soc. de Biologie, 1925, dl 92, bldz. 863.
- Graphiques des indices de courbure partiels de spirochaeta icterohaemorrhagiae. Comptes rendus d. l. Soc. de Biologie, 1925, dl. 93, bldz. 567.

- Dittmar and Buchanan.* Histoire sommaire de l'ictère épidémique en Grande Bretagne. Office international d'hygiène publique, 1926, dl. 18, bldz. 792.
- Elders.* Over de Kliniek der ziekte van Weil. Geneeskundige Gids, 1924, bldz. 365.
- Enneking.* Een vierde geval van ziekte van Weil. Ned. Tijdschr. v. Geneesk., 1926, I, bldz. 1063.
- Fischer.* Studies over de leptospira icterohaemorrhagiae. Proefschr., Amsterdam, 1924.
- Fleischmann.* Ueber eine Epidemie von Infektiösem Ikterus, Münch. Med. W. Schrift, 1926, bldz. 2005.
- v. Gelder.* Nog eenige gevallen van de ziekte van Weil. Ned. Tijdschr. voor Geneesk., 1926, II, bldz. 524.
- Goudsmit, Hammer en Wolff.* Onderzoekingen bij een geval der ziekte van Weil. Ned. Tijdschr. voor Geneesk., 1925, I, bldz. 430.
- Gulland and Buchanan.* Spirochaetosis icterohaemorrhagica in East-Lothian. British Med. Journal, 1924, I, bldz. 313.
- Guthrie.* A case of spirochaetosis icterohaemorrhagica. Lancet, 1927, I, bldz. 337.
- Hayman and Lynch.* Spirochetal jaundice in United States. American J. of Med. Science, 1927, bldz. 80.
- Heitzmann.* Vergleichende pathologische Anatomie des experimentellen Gelbfieber —, Weil — und Sumatra-infektion. Arb. a. d. Reichs Ges. Amt, 1926, feestbundel, bldz. 48.
- Hermann.* Serologische Untersuchungen bei Spirochäten vom Typus Weil. Centralblatt. f. Bakt., I Abt., 1927, dl. 104, bldz. 192.
- Hindle and Brown.* Spirochaetal Jaundice in Great Britain. Lancet, 1925, II, bldz. 372.
- Honig.* Een epidemie van goedaardige geelzucht in Zunderdorp. Ned. Tijdschrift voor Geneesk., 1926, I, bldz. 2347.
- Ivens.* Spirochaetosis icterohaemorrhagica. Ned. Tijdschr. voor Geneesk., 1924, II, bldz. 1990.
- Joannides.* Sur un cas de spirochétose ictéro-hémorragique. La Grèce Médicale, 1925, bldz. 38. Referaat in Centr.bl. Refer. dl. 77, bldz 406.
- Körner.* Ueber eine Epidemie von Weilscher Krankheit. Deutsche Med. W. Schrift, 1925, bldz. 772.
- Kramer* Drie gevallen van de ziekte van Weil. Ned. Tijdschr. voor Geneesk., 1926 II, bldz. 1942.
- Het voorkomen van de ziekte van Weil in Nederland. Geneesk. Gids, 1925, bldz. 537.

- Kritschewsky en Tscharikower.* Ein neues Immunitätsphänomen gegen die *Spirochaeta icterogenes*. Ztschr. f. Imm. f. und exp. Therapie, dl. 46, 1926, bldz. 207.
- Lampe.* Een geval van ziekte van Weil zonder icterus. Ned. Tijdschr. voor Geneesk., 1926, I, bldz. 2870.
- Langworthy and Moore.* A study of leptospira icterohaemorrhagiae. Jl. of infectious diseases, 1927, bldz. 70.
- de Lavergne et Perrier.* A propos d'un cas de spirochétose ictérohémorragique. Bull. et Mém. Soc. Méd. Hôp., Paris, 1925, bldz. 513.
- v. Loghem.* De ziekte van Weil als ongeval. Ned. Tijdschr. voor Geneesk., 1926, I, bldz. 1751.
- Lyon and Buchanan.* Spirochaetal Jaundice. Lancet, 1925, I, bldz. 507.
- Mochtar.* Onderzoekingen omtrent eenige leptospiren-stammen. Proefschr., Amsterdam, 1927.
- Prausnitz und Lubinski.* Untersuchungen über das Schlammfieber. Klinische Wochenschrift, 1926, bldz. 2052.
- Puntoni.* Rapports entre leptospira icteroides et leptospira icterohaemorrhagiae. Comptes rendus d. l. Soc. de Biologie, 1927, dl. 96, bldz. 1139.
- Rapport Registrar General of Scotland.* Infective jaundice among miners. British Med. Jl., 1926, I, bldz. 499.
- Redactioneel artikel.* Leptospirosis icterohaemorrhagica. Jl. of Tropical Medicine and Hygiene, 1927, dl. 30, bldz. 147.
- Epidemic Jaundice. Lancet, 1927, I, bldz. 985.
- Reiter.* Experimentelle Studien über die stumme Infektion und ihre Folgen bei Weilscher Krankheit und bei Nagana. Dutsche Med. W. Schr., 1926, bldz. 445.
- Rimpau.* Ueber das Vorkommen von Schlamm- (Ernte-) Fieber in Südbayern im Sommer 1926. Münch. Med. W. Schr., 1927, bldz. 924.
- Schüffner en Mochtar.* Verdere uitkomsten van het leptospiren onderzoek. Ned. Tijdschr. voor Geneesk., 1926, II, bldz. 1252.
- Gelbfieber und Weilsche Krankheit. Arch. f. Schiffs- und Tropenhygiene, 1927, bldz. 149.
- Versuche zur Aufteilung von Leptospiren Stämmen, mit einleitenden Bemerkungen über den Verlauf von Agglutination und lysis. Centralbl. f. Bakt., I Abt., 1927, dl. 101, bldz. 405.
- Schüffner en Ruijs.* Nieuwe gevallen van ziekte van Weil. Ned. Tijdschr. voor Geneesk., 1925, II, bldz. 1020.

- Schüffer en Sieburg.* Over de vroegtijdige microscopische diagnose van leptospirosen (Weilsche ziekte, enz.). Geneesk. Tijdschr. voor Ned.-Indië, 1926, bldz. 801.
- Zur mikroskopischen Frühdiagnose von Leptospirosen. Münch. Med. W. Schr., 1926, bldz. 1977.
- Early microscopical diagnosis of leptospirae. Jl. of trop. Medicine and hygiene, 1927, dl. 30, bldz. 40.
- Scottish Board of health.* Epidemic of infective jaundice. British Med. Jl., 1924, I, bldz. 291.
- Sellards.* The relation between Weil's disease and yellow fever. Annals of Trop. Med. and Parasitology, 1927, bldz. 245.
- Shiga.* Untersuchungen über die Beziehungen der Wasser-Spirochäte zu dem Erreger der Weilschen Krankheit. Ztschr. f. Imm. f. und exp. Ther., 1924, dl. 40, bldz. 148.
- Sieburg.* De Triplecentrifugatie methode in de diagnostiek van Trypanosen en Spirochaeten. Proefschrift, 1926, Amsterdam.
- Soesilo.* Vergelijkende studie van enkele pathogene leptospirenstammen en leptospiren, afkomstig van de rattenbevolking van Amsterdam en omgeving. Proefschrift, 1925. Amsterdam.
- Theiler and Sellards.* The relationship of *I. icterohaemorrhagiae* and *I. icteroides* as determined by the Pfeiffer Phenomenon in guinea pigs. Amer. Jl. of Trop. Medicine, 1926, bldz. 383.
- Timmerman.* Serumbehandeling bij de ziekte van Weil. Ned. Tijdschr. voor Geneesk., 1927, I, bldz. 1572.
- Uhlenhuth.* Zur Aetiologie und Epidemiologie der Weilschen Krankheit. Klinische W. Schrift, 1926, I, bldz. 434.
- Uhlenhuth en Grossmann.* Zur Typenfrage der Spirochaeta icterogenes. Centralbl. f. Bakt., I Abt., 1926, dl. 97, Beiheft, bldz. 73.
- Die Aetiologie und Epidemiologie der ansteckenden Gelbsucht im Lichte experimenteller Untersuchungen über die Typenfrage ihres Erregers. Klinische W. Schrift, 1926, I, bldz. 1113 en 1163.
- Uhlenhuth en Hermann.* Neue Untersuchungen über die Umwandlung der Spirochaeta pseudo-icterogenes in die Spirochaeta icterogenes. Med. Klinik, 1927, No. 16.
- Vanni.* Chemotherapie van de Spirochaetosis icterohaemorrhagica. Riforma Medic. 1924, No. 39, Ref. Münch. Med. W. Schrift, 1925, bldz. 37.
- Leververanderingen bij spirochaetosis icterohaemorrhagica. Riforma Medic., 1925, No. 11. Ref. Münch. Med. W. Schrift, 1925, bldz. 1399.

- Walch en Walch-Sorgdrager.* Enkele opmerkingen over leptospira ictero-haemorrhagiae. Ned. Tijdschr. voor Geneesk., 1925, II, bldz. 1535.
- Demonstratie van een leptospira, geïsoleerd bij een patiënt, die het klinisch beeld eener Weilsche ziekte had vertoond. Geneesk. Tijdschr. voor Ned.-Indië, 1926, bldz. 115.
- Walch en Soesilo.* Vergelijkend serologisch onderzoek van te Batavia geïsoleerde en eenige andere leptospira stammen. Geneesk. Tijdschr. voor Ned.-Indië, 1927, bldz. 84.
- Whitehead en Crouch.* Infectious jaundice in the Sudan. Jl. of tropical medicine and hygiene, 1926, bldz. 359.
- Wolff.* Onderzoekingen betreffende cultuur en serologie der leptospirae. Proefschrift, 1924, Amsterdam.
- Untersuchungen über Kultur und Serologie der Leptospiren. Archiv f. Schiffs- und Tropenhygiene, 1925, bldz. 111.
- Zielke.* Ueber Spirochäten im Lochialsekret der Wöchnerinnen. Klinische Wochenschrift, 1924, bldz. 1672.
- Zuelzer und Philipp.* Beeinflussung des Kolloidalen Zustandes des Zellinhaltes von Protozoen durch Radiumstrahlen. Strahlentherapie, 1925, bldz. 737.

Gele koorts.

- Aggramonte.* Some observations upon yellow fever prophylaxis. Journal of Trop. Medic. and Hygiene, 1924, dl. 27, bldz. 285.
- Aitken, Connal, Gray and Smith.* Yellow fever in Africa. Transactions Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg., 1926, dl. 20, bldz. 166.
- Battistini.* The immunological relationships of the leptospira group of spirochaetes. Jl. Trop. Med. and Hyg., 1925, dl. 28, bldz. 201.
- le Blanc.* Study of yellow fever in Vera Cruz. Jl. Trop. Med. and Hyg., 1925, dl. 28, bldz. 169.
- Boéz.* Travaux récents sur l'étiologie de la fièvre jaune. Revue d'hygiène, 1926, bldz. 1.
- Cran.* The results of the Noguchi treatment of the prophylactic measures employed in the 1923 yellow fever epidemic in Belise. Jl. Trop. Med. and hygiene, 1925, dl. 28, bldz. 26.
- Dieterich.* The filterability of leptospira icteroides in culture. American Jl. of Trop. Medicine, 1924, bldz. 553.
- Heitzmann.* Vergleichende pathologische Anatomie der experimentellen Gelbfieber-, Weil- und Sumatra-infektion. Arb. a. d. R. Ges. Amt., 1926, Feestbundel, bldz. 48.

- Hoffmann (W. H.)*. Die markige Schwellung der Darmfollikel bei der Leptospiren Infektion. Münch. Med. W. Schrift, 1924, bldz. 428.
- Kalkzylinder in den Nieren beim Gelbfieber. Münch. Med. W. Schrift, 1924, bldz. 898.
- Die Aetiologie des Gelbfiebers. Seuchenbekämpfung, 1925, bldz. 279.
- Die pathologische Anatomie des Gelbfiebers. Klinische W. Schrift, 1925, I, bldz. 632.
- Die Leptospirillosen. Münch. Med. W. Schrift, 1926, bldz. 611.
- Das Krankheitsbild des Gelbfiebers. Deutsche Med. W. Schrift, 1926, bldz. 1729.
- Noguchi*. The Pfeiffer reaction in yellow fever. American Jl. of Trop. Medicine, 1924, bldz. 131.
- Yellow fever Research 1918—1924. A Summary. Jl. of Trop. Med. and hygiene, 1925, dl. 28, bldz. 185.
- , *Muller, Torres, Silva, Martins, Ribeiro, Vianna en Biao*. Experimental studies of yellow fever in Northern Brazil. Monographs Rockefeller Institute, 1924, No. 20.
- Puntoni*. Rapports entre leptospira icteroides et leptospira icterohaemorrhagiae. Comptes rendus d. l. Soc. de Biologie, 1927, dl. 96, bldz. 1139.
- Schüffner*. Zur mikroskopischen Frühdiagnose von Leptospirosen. Münch. Med. W. Schrift, 1927, bldz. 857.
- Schüffner* und *Mochtar*. Gelbfieber und Weilsche Krankheit. Arch. f. Schiffs- und Tropenhygiene, 1927, bldz. 149.
- Sellards*. The relation between Weil's disease and yellow fever. Annals of Tropical Med. and Parasitology, 1927, bldz. 245.
- The Pfeiffer reaction with leptospira in yellow fever. American Jl. of Trop. Medicine, 1927, bldz. 71.
- Sulders*. La fièvre jaune au Soudan. Bulletin de la Soc. de Pathol. Exotique, 1926, bldz. 604.
- Theiler* and *Sellards*. The relationship of l. icterohaemorrhagiae and l. icteroides as determined by the Pfeiffer Phenomenon in guinea pigs. Amer. Jl. of Trop. Medicine, 1926, bldz. 383.
- Walch en Soesilo*. Vergelijkend serologisch onderzoek van te Batavia geïsoleerde en eenige andere leptospira-stammen. Geneesk. Tijdschr. voor Ned.-Indië, 1927, bldz. 84.
- Wanstrom*. Occurrence and staining of leptospira icteroides in guinea pigs inoculated experimentally, with a study of the lesions produced. Jl. of infectious diseases, 1924, bldz. 110.

Kortdurende koortsen in de Tropen, Dengue, febris Hebdomadis.

- Bonne.* Recherches sur les spirochètes de la spirochètose fébrile de Sumatra. Bull. d. l. Soc. de path. exotique, 1924, bldz. 623.
- Gomes de Faria.* Leptospira Couvyi chez un malade suspect de Dengue. Comptes rendus d. l. Soc. de Biologie, 1924, dl. 90, bldz. 55.
- Guillet.* Au sujet de la récente épidémie de Dengue à Dakar; note sur un cas de spirochètose humaine. Bull. de la Soc. de Path. Exotique, 1926, bldz. 860.
- Hall.* The occurrence of spirochete like filaments in the blood of Dengue patients and in normal individuals. American Jl. of Trop. Med., 1925, bldz. 307.
- Heitzmann.* Vergleichende pathologische Anatomie der experimentellen Gelbfieber-, Weil- und Sumatra-infektion. Arb. a. d. Reichges. Amt. 1926, Feestbundel, bldz. 48.
- Koshina, Shiozawz, Kitayama.* Studies of leptospira hebdomadis. Jl. of exp. Medic., 1925, dl. 42, bldz. 873.
- Kouwenaar.* Spirochaetosis febrilis. Een in de Tropen voorkomende kortdurende koorts. Proefschrift, 1924, Amsterdam.
- Smits.* Mededeeling ter vergadering Sumatra's Oostkust. Geneesk. Tijdschr. voor Ned.-Indië, 1926, bldz. L.
- Whittingham.* The Etiology of Phlebotomusfever. Jl. Royal Army Med. Corps, 1925, bldz. 196.

Rat-Leptospirae.

- Bonne.* Sur le spirochaeta icterohaemorrhagiae des rats d'égout à Amsterdam. Comptes rendus d. l. Soc. de Biologie, 1924, dl. 90, bldz. 668.
- Comparaison du spirochète des rats d'Amsterdam avec une souche française ictero-hémorragique. Annales de l'Institut Pasteur, 1925, bldz. 35.
- Redactie Lancet.* The leptospira icterohaemorrhagiae in rats. Lancet, 1924, I, bldz. 454.
- Robinson.* Occurrence of leptospira icterohaemorrhagiae in wild rats of Baltimore. American Jl. of Hygiene, 1924, bldz. 327.
- Sardjito en Postmus.* Onderzoekingen naar het voorkomen van leptospirae onder de rattenbevolking van Weltevreden. Geneesk. Tijdschr. voor Ned.-Indië, 1927, bldz. 73.
- Schüffner.* Beitrag zur Leptospirose der Ratten. Archiv f. Sch. und Tr. Hygiene, 1925, Beiheft 1, bldz. 333.

Takaki. Ueber das Vorkommen der Erreger der Weilschen Krankheit und der Rattenbisz-Krankheit bei Wiener Ratten. Wiener Klinische Wochenschrift, 1925, bldz. 1231.

Walch en Soesilo. Vergelijkend serologisch onderzoek van te Batavia geïsoleerde en eenige andere leptospira-stammen. Geneesk. Tijdschr. voor Ned.-Indië, 1927, bldz. 84.

Saprophytisch levende leptospirae.

v. Angerer. Filtrationsversuche mit Wasserspirochäten. Archiv f. Hygiene, 1924, bldz. 325.

Bauer. A method for the isolation of leptospiras from water. American Jl. of Trop. Medic., 1927, bldz. 177.

Coles. Leptospira, methods of examination: new habitat of free living forms. Jl. of Tropical Med. and hygiene, 1926, bldz. 170.

Dimitroff. Leptospira biflexa. Jl. of infectious diseases, 1927, bldz. 508.

Etchegoin. Sur un spirochétidé de la Vase. Comptes rendus d. l. Soc. de Biologie, 1924, dl. 90, bldz. 55.

— Sur un spirochétidé d'une piscine. Comptes rendus d. l. Soc. de Biologie, 1924, dl. 91, bldz. 1005.

Hindle. Leptospira in London waters. British Medical Jl., 1925, II, bldz. 57.

Lépine. Présence de spirochètes libres dans l'eau de conduite de Beyrouth. Etude et culture. Comptes rendus d. l. Soc. de Biologie, 1927, dl. 96, bldz. 320.

Sanarelli. Les spirochètes caeaux. Ann. de l'Institut Pasteur, 1927, bldz. 1.

Shiga. Untersuchungen über die Beziehungen der Wasserspirochäte zu dem Erreger der Weilschen Krankheit. Ztschr. f. Immf. u. exp. Therapie, 1924, dl. 40, bldz. 148.

v. Thiel. Leptospira pseudo-icterogenes. Ned. Tijdschr. voor Hygiene, Microbiologie en Serologie, 1927, deel 2, bldz. 70.

Vinzent. Isolement et culture de spirilles et de Spirochètes des eaux. Comptes rendus d. l. Soc. de Biologie, 1926, dl. 95, bldz. 1472.

Uhlenhuth und Hermann. Neue Untersuchungen über die Umwandlung der Spirochaeta pseudo-icterogenes in die Spirochaeta icterogenes. Med. Klinik, 1927, No. 16.

Walker. Leptospirae from tap-water. Jl. of infectious diseases, 1927, bldz. 164.

Zuelzer. Ueber die Kultivierung mariner Spirochäten mit einigen Bemerkungen zur Züchtung der Spirochaeta Obermeyerii. Centr. bl. f. Bakt., I Abt., 1925, dl. 96, bldz. 424.

Zuelzer und Oba. Beitrag zur Kenntnis Saprophytischer Spirochäten. Centr. bl. f. Bakt. I Abt., 1924, dl. 91, bldz. 95.

Zwartwaterkoorts.

Blanchard et Lefrou. Considérations cliniques, pathogéniques et thérapeutiques sur la fièvre bilieuse hémoglobininurique à spirochètes.

Bull. de la Société de Pathologie Exotique, 1925, bldz. 345.

Franchini et Maggesi. Spirochätenbefund in einem letalen Fall von Schwarzwasserfieber. Archiv f. Schiffs- und Tropenhygiene, 1925, Beiheft 1, bldz. 110.

van Hoof. Spirochètes dans les accès de fièvre bilieuse hémoglobininurique chez des Européens au Congo Belge. Bull. de la Soc. de Path. Exotique, 1924, bldz. 291.

Lefrou. Considérations sur la pathogénie de la fièvre bilieuse hémoglobininurique, 1924, bldz. 218.

Low. The etiology of blackwater fever. Transactions of the royal Soc. of Trop. Med. and Hyg., 1924, dl. 17, bldz. 201.

Reybaud. La fièvre bilieuse hémoglobininurique est-elle une spirochétose? Revue de médecine et d'hygiène tropicale, 1924, bldz. 195.

Leptospirae en Dierziekten.

Dalling and Okell. Vaccine treatment of canine leptospiral jaundice. Jl. of Pathology and Bacteriology, 1926, bldz. 131.

Hiesinger. Zur Spirochätenfrage bei der Stuttgarter Hundeseuche. Berliner Tierärztl. W. Schr., 1925, bldz. 481.

v. Jelinek und Prochazka. Beitrag zur Erforschung der Stuttgarter Hundeseuche. Prag. Arch. f. Tiermed., 1925, bldz. 1. Ref. Centr. bl., dl. 80, bldz. 265.

Klarenbeek. Urämie, Stuttgarter Hundeseuche und Spirochäten. Tierärztl. Rundschau, 1925, bldz. 72.

Krivacele. Spirochätenbefunde beim Hundetyphus. Ztschr. f. Hyg. und Inf. Krankh., 1924, dl. 103, bldz. 529.

Okell. Leptospiral jaundice in dogs. British med. Jl., 1925, I, bldz. 266.

Okell, Dalling and Pugh. Leptospiral jaundice in dogs. Veter. Journal, Januari 1925.

Redactie Lancet. Leptospiral infections in wild animals. Lancet, 1926, I, bldz. 495.

INHOUD

Hoofdstuk I

Inleiding tot de studie der leptospirosen	11
---	----

Hoofdstuk II

De leptospirae in onderlinge vergelijking	20
---	----

Hoofdstuk III

Een en ander over bouw en beweeglijkheid van de leptospira icterohaemorrhagiae	34
--	----

Hoofdstuk IV

Over den invloed van zuurstofonttrekking op het leven van de leptospira icterohaemorrhagiae	50
---	----

Hoofdstuk V

Over den invloed van zuurstof in overmaat op het leven van de leptospira icterohaemorrhagiae	67
--	----

Hoofdstuk VI

Over de filtrabiliteit van leptospira icterohaemorrhagiae door Entkeimungs-filters van Seitz	75
--	----

Geraadpleegde literatuur	82
------------------------------------	----

Aanhangsel	86
----------------------	----

STELLINGEN

I.

De leptospira icterohaemorrhagiae is een obligaat aeroob micro-organisme.

II.

De leptospira icterohaemorrhagiae is in het bezit van een zoogenaamde asdraad.

III.

De opvatting van *Henschen*, dat de maculavezels „inselformig” op de hersenschors zijn geprojecteerd, is onjuist.

IV.

De, in de vagina van zwangeren veelal aanwezige, trichomonaden hebben geen invloed op de morbiditeit in het puerperium.

V.

Bij epidemieën van koortsachtige acute ziekten in overstromde gebieden, denke men aan de mogelijkheid van besmetting met spirochaeten.

VI.

In de leer- en handboeken der Tropische Hygiëne wordt te weinig aandacht geschonken aan de rol, die periplanetidae in de verspreiding van verschillende ziekten kunnen spelen.

VII.

Het bewijs voor de filtreerbaarheid van den tuberculosekiem is niet geleverd.

VIII.

Bij de praecipitatie-reactie, aangewend ten behoeve van gerechtelijk-geneeskundige doeleinden, kieze men de verhouding van antigeen en antiserum zoodanig, dat het optreden van het „Doppelringphaenomen” zooveel mogelijk worde bevorderd.

IX.

Het „normaalcontact” tusschen veldrat en huisrat speelt geen rol in de verspreiding van de pest op Java.

X.

Bij de wettelijke regeling van het fabrieksartsenwezen blijve de vrije artskenkeuze als regel gehandhaafd.

