



Onderzoek naar nieuwe, differentiële kenmerken tussen diphtherie- en pseudodiphtheriebacillen: vergif-productie, groei op uitgeputte kweekbodems, specifieke sera

<https://hdl.handle.net/1874/217034>

No
4192

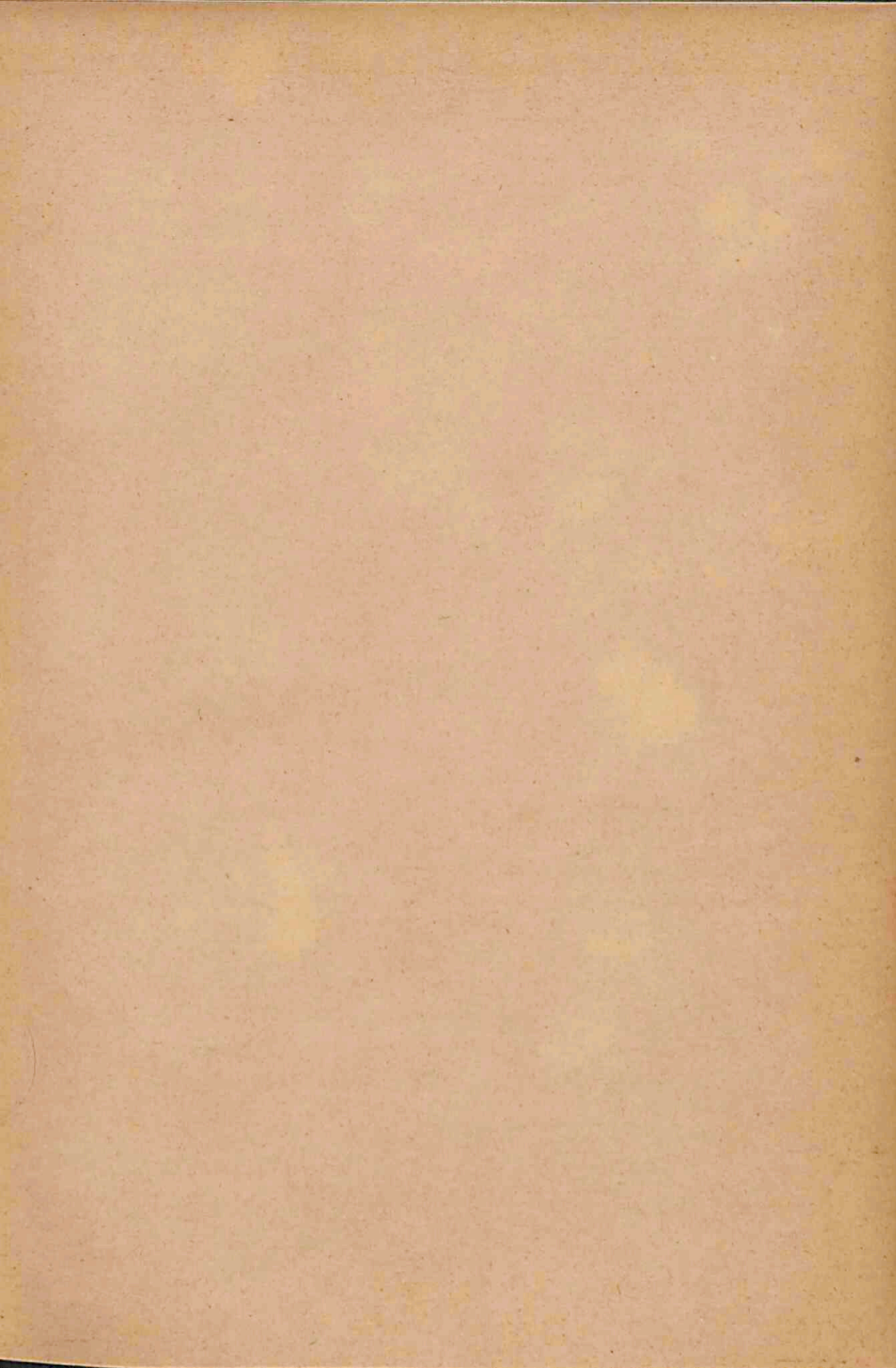
14 Maart
1899

Onderzoek naar nieuwe, DIFFERENTIËLE

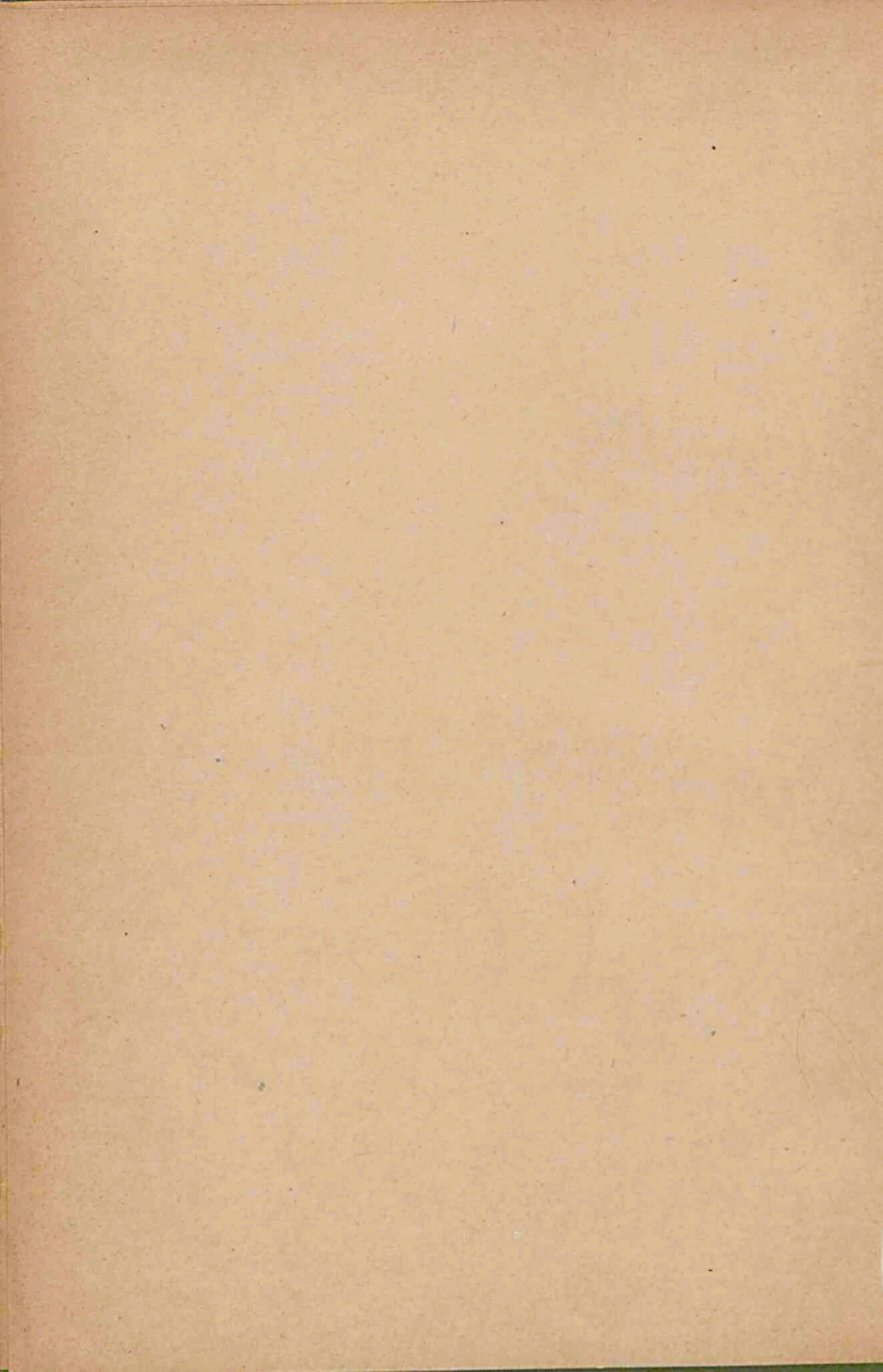
TEKENMERKEN tusschen DIPHTHERIE - en

PSEUDODIPHTHERIEBACILLEN.

C. H. MOL.



A. qu.
192

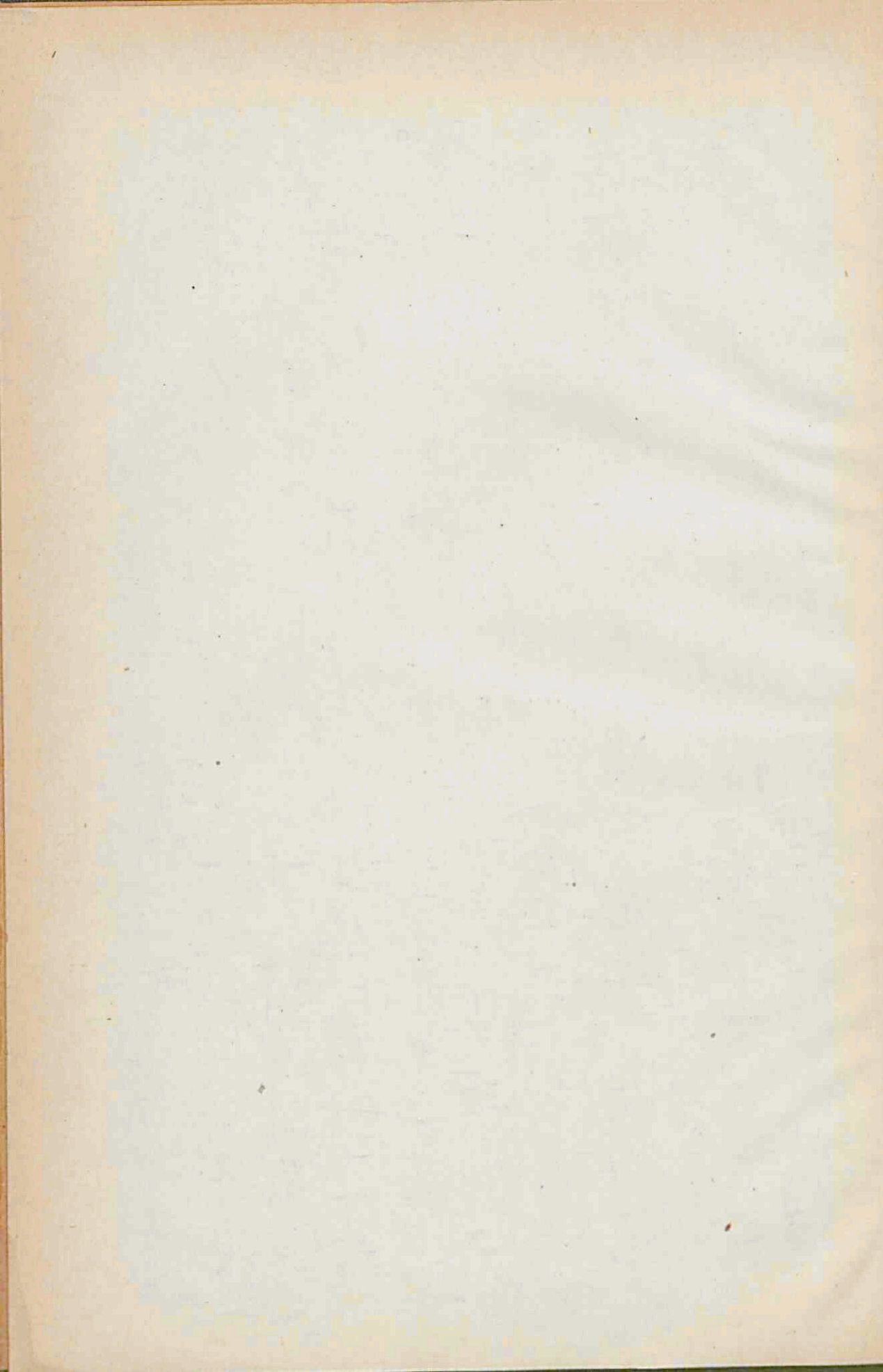


ONDERZOEK NAAR NIEUWE, DIFFERENTIËLE KENMERKEN

TUSSEN

DIPHTHERIE- EN PSEUDODIPHTHERIEBACILLEN.

(Vergif-productie; groei op uitgeputte kweekbodems; specifieke sera).



Onderzoek naar nieuwe, differentiële
kenmerken tusschen diphtherie- en pseudo-
diphtheriebacillen.

(Vergif-productie; groei op uitgeputte kweekbodems; specifieke sera).

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN

DOCTOR IN DE GENEESKUNDE

AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT,

NA MACHTIGING VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS

M^R. J. DE LOUWER,

Hoogleraar in de Faculteit der Rechtsgeleerdheid.

VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT

TEGEN DE BEDENKINGEN VAN

DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE

TE VERDEDIGEN

op Dinsdag 14 Maart 1899, des namiddags ten 3 ure,

DOOR

CORNELIUS MATTHIAS MOL,

ARTS,

Geboren te HILVERSUM.

— COO —



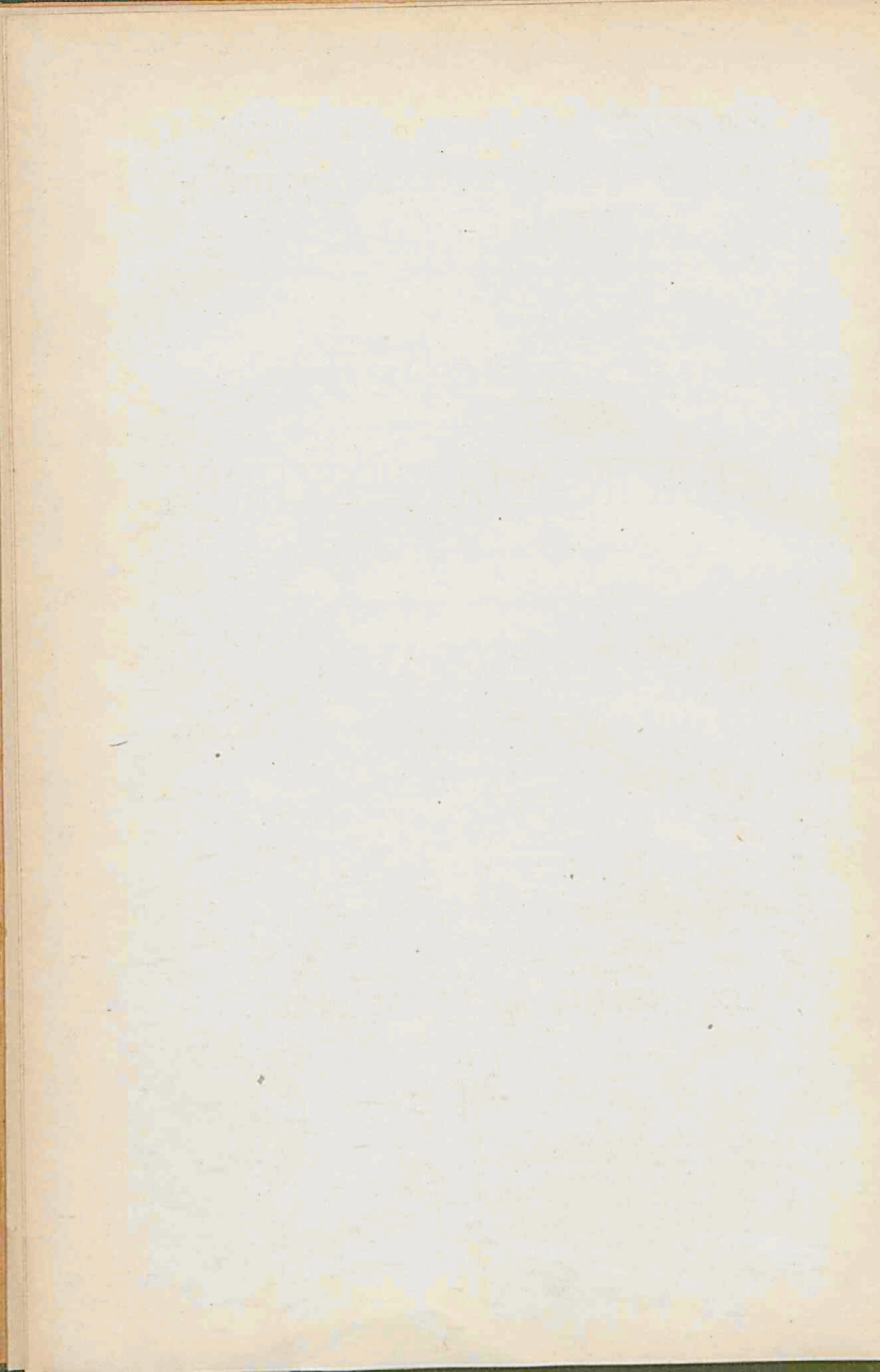
Typ. J. VAN BOEKHOVEN. — Utrecht.

RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT



2448 711 2

AAN MIJNE MOEDER.



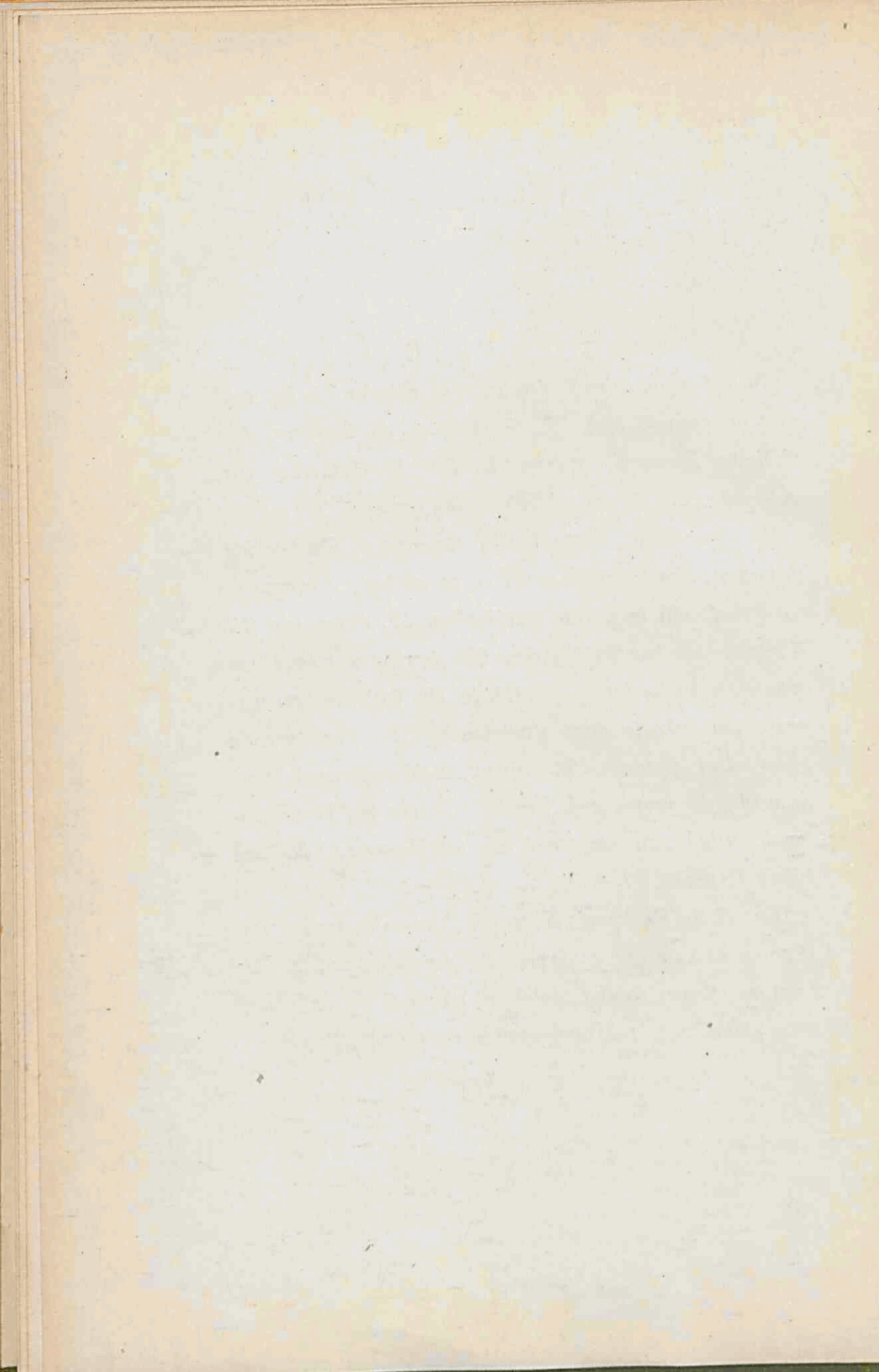
Bij het einde mijner Academische Studiën, is het mij eene aangename taak U, Professoren en Lectoren der Medische Faculteit, mijnen dank te brengen voor het onderwijs, dat ik van U heb mogen genieten.

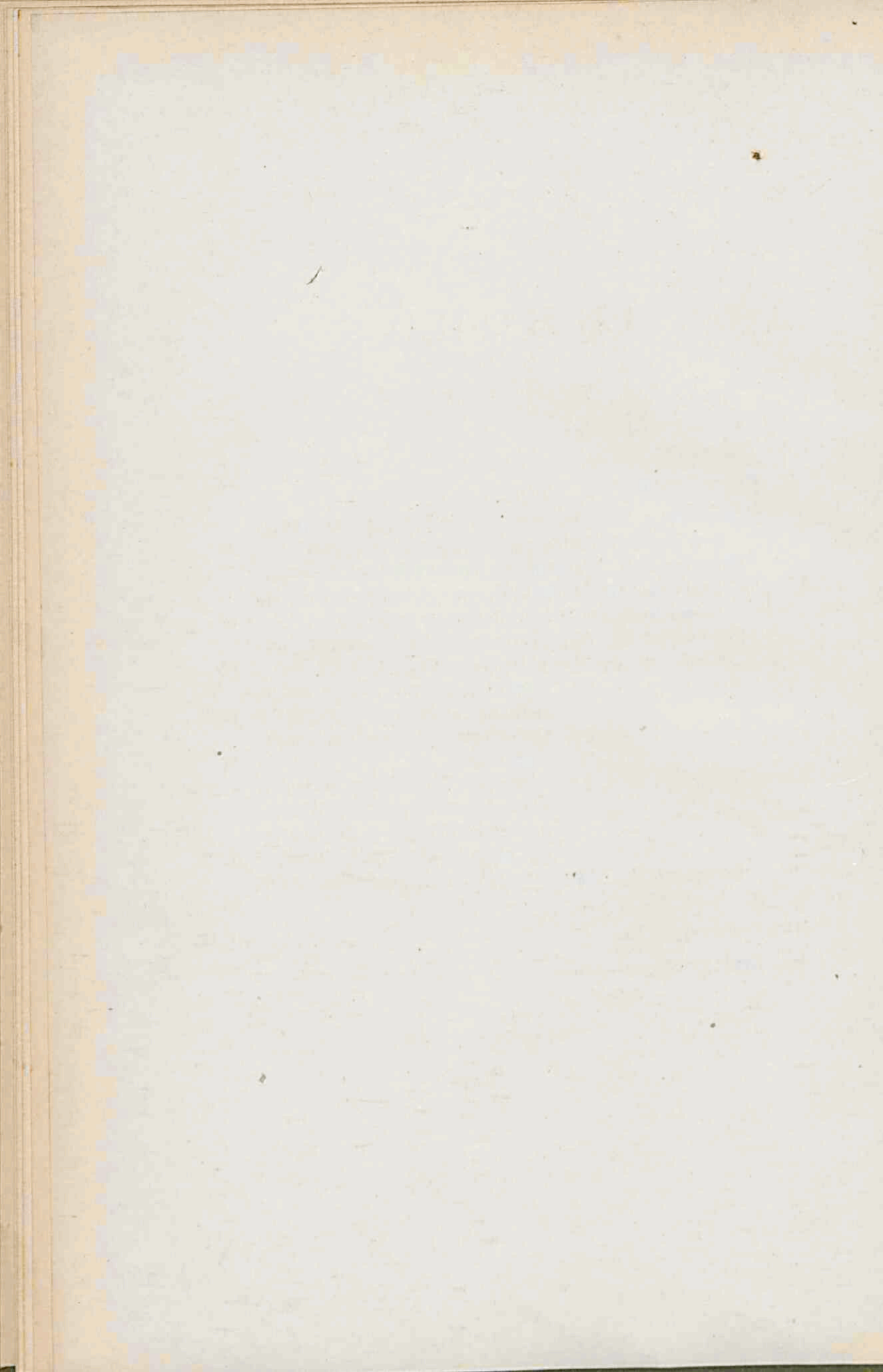
Het voorrecht, Hooggeleerde SPRONCK, Hooggeachte Promotor, eenigen tijd onder Uwe leiding werkzaam te zijn, heeft mij de groote bereidwilligheid, waarmede Gij U steeds ter beschikking van Uwe leerlingen stelt en de onbepaalde gastvrijheid, die Gij in Uw laboratorium verleent, ten hoogste doen waardeeren. De voortdurende steun, dien ik van U bij mijnen arbeid ondervond, werd door mij op hoogen prijs gesteld. Gaarne geef ik daarom thans uiting aan het gevoel van dankbaarheid, dat mij jegens U bezielt.

Den H.H. Doctoren WIJNHOF, VAN HOUTUM, VAN IJZEREN, LAAN en DE HAAN, die zoo welwillend waren, hun ten dienste staand materiaal aan mij ten onderzoek af te staan, betuig ik daarvoor mijne erkentelijkheid.

I N H O U D.

	Bladz.
I. INLEIDING	1
II. EIGEN ONDERZOEK.	
HOOFDSTUK I. Herkomst en beschrijving van eenige door mij geïsoleerde „pseudodiphtheriebacillen” . .	19
HOOFDSTUK II. Vergelijkend onderzoek naar de toxine- productie van diphtherie- en „pseudodiphtherieba- cillen” in MARTIN's vloeistoffen en in gistdecoct. . .	33
HOOFDSTUK III. Een nieuw onderscheid tusschen diph- therie- en „pseudodiphtheriebacillen”	45
HOOFDSTUK IV. § 1. Agglutinatie van den diphthe- riebacil. Litteratuur-overzicht	52
§ 2. Onderzoek over de diphtherie- agglutinine	60
§ 3. Vergelijkend onderzoek naar den invloed van voor den diphtherie- bacil specifieke sera op diphtherie- en „pseudodiphtheriebacillen.”	81
HOOFDSTUK V. Agglutinatie der „pseudodiphtherie- bacillen”.	93
III. CONCLUSIES.	101
STELLINGEN.	103





I.

Inleiding.

Door de onderzoeken van SPRONCK, MUYSKEN, DE HAAN, en STEENMEIJER scheen op de vraag, aangaande de verhouding van den diphtheriebacil tot de andere corynebacteriën, voorloopig een bevredigend antwoord te zijn gegeven.

Het was duidelijk geworden, dat de zeer zwak- of in 't geheel niet virulente bacillen, die bij normale personen op de slijmvliezen van oogholte en luchtwegen aangetroffen worden, en met den diphtheriebacil meerdere of mindere gelijkenis vertoonen, van den virulenten bacil van LÖFFLER moesten, en ook gemakkelijk konden, onderscheiden worden.

In het begin van het vorige jaar zagen echter van *Fransche* zijde een paar publicaties het licht, waaruit bleek, dat gezaghebbende auteurs eene andere meening waren blijven omhelzen. Daarom scheen het niet ondienstig, dat nieuwe onderzoeken werden gedaan, om te trachten in deze zaak meer licht te verspreiden.

Van hetgeen door mij in deze richting is beproefd, zal in de volgende bladzijden verslag worden gegeven.

De omvangrijke litteratuur, die over dit onderwerp reeds bestaat, vindt in de geschriften van PROCHASKA ¹⁾, STEENMEIJER ²⁾ en C. FRÄNKEL ³⁾ volledige vermelding. Slechts enkele punten van het door hen besprokene en de nieuwe artikelen, die na hunne publicaties zijn verschenen, mogen hier eene korte vermelding vinden.

Reeds spoedig, nadat de eerste waarnemingen over het bestaan van avirulente corynebacteriën waren gedaan, bleek, dat de deskundigen zich in twee kampen verdeelden.

Sommigen meenden, dat deze vormen als diphtheriebacillen, die hunne virulentie verloren hadden, moesten beschouwd worden, anderen, dat zij tot eene geheel afzonderlijke soort moesten gebracht worden, die met den diphtheriebacil niets te maken had. Zij qualificeerden die vormen als *Pseudodiphtheriebacillen*.

De „Unitariërs”, waartoe gezaghebbende bacteriologen, als BRIEGER en FRÄNKEL, en de geheele *Fransche* school met ROUX en YERSIN aan 't hoofd, behoorden, verdedigden hunne opinie met te wijzen op de bevindingen van ROUX en YERSIN ⁴⁾, die in een geval van zware diphtherie de virulentie der bacillen tijdens het verloop van de ziekte langzamerhand zagen afnemen, na het herstel van den patiënt zeer zwak, en ten slotte in het geheel niet virulente bacillen vonden.

Zij vestigden er ook de aandacht op, dat de pseudo-

¹⁾ Zeitschr. f. Hygiene Bd. XXIV 1897. p. 373.

²⁾ * Proefschrift, Utrecht. 1897.

³⁾ Berliner klin. Wochenschrift 1897. n^o. 50.

⁴⁾ Annales de l'Institut Pasteur 1890 (3e mémoire).

diphtheriebacil niet geheel van virulentie is ontbloot. Verder gelukte het hun uit eenen echten diphtheriebacil, eenen bacil te kweken, die bij kamertemperatuur groeide, de alcaliciteit van bouillon van den beginne af deed toenemen; in één woord, van pseudobacillen niet te onderscheiden was.

Door E. MÜLLER ¹⁾ werd de aangetoonde morphologische variabiliteit der diphtheriebacillen als argument aangevoerd voor de meening, dat de avirulente vormen, mochten zij ook nog wat verder afwijken van het type, toch zeer goed echte diphtheriebacillen konden zijn.

Verschillende onderzoekers meenden ook in de wisselende virulentie van miltvuurbacillen, pneumococcen enz. reden te hebben om per analogiam te besluiten, dat ook bij de corynebacteriën aan de virulentie als soortkenmerk geen groote waarde mag worden toegekend.

Door inspuiting tegelijk met streptococcen, gelukte het Roux en YERSIN een zwak virulenten bacil sterk virulent te maken.

Zooals SPRONCK ²⁾ opmerkt, was echter deze bacil nog betrekkelijk sterk pathogeen, daar hij reeds in eene dosis van 0,5 cM³ eene kleine huidnecrose teweegbracht.

TRUMPP ³⁾ verklaart eenen bacil, die geheel avirulent was, door hem tegelijk met eene niet doodelijke dosis diphtherietoxine in te spuiten, virulent gemaakt te hebben. Dit was een bacil, die niet uit de keel, doch uit empyeem-etter geïsoleerd was.

De opvattingen der „Unitariërs” werden scherp geformu-

¹⁾ Jahrb. f. Kinderheilk. XLIII 1896.

²⁾ Semaine médicale 1897, p. 354.

³⁾ Centralblatt f. Bakteriologie XX. p. 721.

leerd door MARTIN ¹⁾. Op grond van zijne onderzoekingen onderscheidt hij drie vormen van diphtheriebacillen:

- 1°. Lange, sterk virulente;
- 2°. Middelmattig lange; — en
- 3°. Korte. De laatste zijn weinig virulent; de middelmattig lange staan ook te dien opzichte in het midden.

De korte bacillen zouden in cultuur ook met den bacil van VON HOFMAN-WELLENHOF overeenkomen.

Tegenover deze opvattingen, was de positie der „*Separatisten*” in den beginne vrij zwak.

Behalve op het verschil in virulentie, een argument, dat voor bestrijding vatbaar was, steunden zij hunne meening hoofdzakelijk op de verschillen in vorm en grootte der bacillen, het aspect der kolonies en de veranderingen, die zij in de voedingsbodems teweegbrachten.

Zoo werd door VON HOFMAN-WELLENHOF en LÖFFLER en later door vele anderen opgegeven, dat de pseudo-diphtheriebacil korter, dikker, meer puntig toeloozend, dus eenigszins spoelvormig is, de echte diphtheriebacil daarentegen lang, slank, met gezwollen einden. Vertakkingen, door FRÄNKEL en BERNHEIM bij den echten diphtheriebacil geconstateerd, bleken geen differentieel-diagnosticum te zijn. De rangschikking der bacillen in bouillon- en serumcultuur, de meer of minder weelderige groei op serum, glycerineagar en gewonen agar waren ook bedrieglijke kenteekenen.

Groei op gelatine, bij kamertemperatuur, bleek bij echte diphtheriebacillen evenals bij de pseudo's mogelijk.

¹⁾ Annales de l'Institut Pasteur 1892.

ESCHERICH vond dat de pseudodiphtheriebacillen in oude agar-steekculturen een bruin pigment vormen.

DE MARTINI ¹⁾ meende in den groei in antidiphtherisch serum een differentieel-diagnosticum te vinden. C. FRÄNKEL, ²⁾ SPRONCK ³⁾ en STEENMEIJER ⁴⁾ konden echter zijne opgaven in geenen deele bevestigen.

Veel gewicht is gehecht aan de reactie der bouillon-culturen. Diphtheriebacillen zouden glyucose-bouillon constant zuur, pseudo's hem steeds alcalisch maken. Daar echter een aantal pseudodiphtheriebacillen ook zuur produceeren, trachtte men door quantitatieve bepalingen eene grens te vinden. NEISSER meent, dat hij op deze wijze den Diphtheriebacil met zekerheid van zijne dubbelgangers kan onderscheiden.

PETERS ⁵⁾ is over deze methode minder tevreden. SCHANZ ⁶⁾ keurt haar geheel en al af, daar het onmogelijk is, de hoeveelheid cultuur, waarmede de bouillonbuisjes bezaaid worden, steeds gelijk te doen zijn, — en derhalve de vegetatie en daarmede de zuurproductie van eene inconstante grootheid afhankelijk is.

Resumeerende, kunnen we zeggen, dat al deze criteriën wel is waar in vele gevallen de differentieeldiagnose kunnen helpen stellen, doch dat ze in een aantal andere in den steek laten. Voor de theoretische vraag, identiteit of soortverschil, hebben zij al zeer weinig waarde.

¹⁾ Centralblatt f. Bakteriologie Bd. XXI 1897, p. 87.

²⁾ Hygiënische Rundschau 1896, n^o. 20.

³⁾ Semaine médicale. 1897, p. 353.

⁴⁾ l. c.

⁵⁾ Deutsche med. Wochenschr. 1897, p. 133.

⁶⁾ Wiener med. Presse. 1898 n^o. 28 en 29.

De meerderheid van de quaestieuse bacillen is, bij subcutane injectie van 2 cM³. eener twee dagen oude bouilloncultuur, niet geheel onschadelijk voor cavia's. Veelal ontstaat dan een oedeem, dat korter of langer tijd blijft bestaan, de uitdrukking van eene zekere mate van virulentie van den bacil. Daarenboven ziet men de dieren menigmaal met meer of minder uitgesproken algemeene verschijnselen op de injectie reageeren.

SPRONCK ¹⁾ stelde nu de volgende proef voor:

Een cavia wordt geïmmuniseerd met antidiphtherisch serum;—deze en tegelijk een andere niet geïmmuniseerde cavia, wordt eenige uren later met 2 cM³. eener 48 uur oude cultuur ingespoten. Wanneer nu bovengenoemde ziekteverschijnselen bij het tweede dier optreden, doch bij het geïmmuniseerde uitblijven, dan bewijst dit, dat we met eenen zwak virulenten diphtheriebacil te doen hebben; maar indien blijkt, dat het serum tegen deze verschijnselen niet immuniseert, dan is de bacil géén diphtheriebacil.

Op deze wijze werden door SPRONCK, MUYSKEN ²⁾, DE HAAN ³⁾ en STEENMEIJER een groot aantal corynebacteriën onderzocht. Het bleek daarbij, dat zeer vele verdachte bacillen voldoende virulentie bezaten, om de proef mogelijk te maken, doch dat geen dezer tot de echte diphtheriebacillen mocht gerekend worden. Daarom

¹⁾ Semaine med. '96, n°. 40 en Deutsche med. Wochenschr. '96 n°. 36.

²⁾ Proefschrift. Utrecht. 1896.

³⁾ Proefschrift. Utrecht. 1896.

kwamen zij tot het besluit, dat zeer zwak of niet virulente diphtheriebacillen in den pharynx van den mensch niet voorkomen.

Praktisch scheen het dus niet meer noodig, de contrôleproef met antidiphtherisch serum te nemen; want het feit, dat de injectie van de bouilloncultuur weinig of geen verschijnselen teweegbrengt, is voldoende om eenen bacil als pseudodiphtheriebacil te diagnostiseeren.

Ditzelfde standpunt neemt ook KURTH ¹⁾ in eene recente mededeeling in.

FRÄNKEL ²⁾ zag zich door deze proeven, die hij herhaalde, genoodzaakt, zijn vroeger standpunt te verlaten en tot het kamp der „*Separatisten*” over te gaan.

Hij oppert echter het bezwaar, dat bacillen, die te zwak virulent zijn, om bij een cavia oedeem te geven, op deze wijze niet kunnen gedetermineerd worden.

PROCHASKA ³⁾ ABEL ⁴⁾ en SCHANZ ⁵⁾ spreken ook van dit bezwaar.

SCHANZ verwerpt zelfs in zijne laatste publicatie ⁶⁾ de methode van SPRONCK geheel. Hij spreekt echter van injectie van 10 cM³. cultuur, terwijl SPRONCK 2 cM³. aangeeft. Bij zoo groote doses is de proef niet zuiver meer.

KURTH ⁷⁾ heeft onlangs ook de waarde van SPRONCK's

¹⁾ Zeitschrift für Hygiene. Bd. XXVIII. 1898, p. 409.

²⁾ Hygien. Rundschau. 1896.

³⁾ Zeitschr. f. Hygiene Bd. XXIV. Heft. 3.

⁴⁾ Deutsche med. Wochenschrift, 1894. n^o. 35.

⁵⁾ Berliner klinische Wochenschrift. 1897, n^o. 3. p. 48.

⁶⁾ Wiener med. Presse. 1898, n^o. 28 en 29.

⁷⁾ l. c.

criterium bestreden, op analoge gronden als PROCHASKA en ABEL.

Andere argumenten werden te berde gebracht door *Fransche* onderzoekers.

MARTIN en SEVESTRE ¹⁾ experimenteerden met eenen bacil, die van sterk virulent, zeer zwak virulent was geworden en daarbij den korten vorm had aangenomen. Dezen bacil, die cavia's niet meer doodde, spoten zij in bij musschen en zagen deze dieren sterven. Geïmmuniseerde musschen daarentegen bleven leven. Op grond van deze proef meenen zij, dat, moge SPRONCK bewezen hebben, dat een aantal „bacilles courts” géén diphtheriebacillen zijn, het toch zeker is, dat sommige „bacilles courts” wèl d. b. moeten genoemd worden. Hun bacil is echter een kunstmatig verkregene ²⁾.

SPRONCK, DE HAAN en STEENMEIJER hebben met dien zelfden bacil van MARTIN en met andere avirulente corynebacteriën geëxperimenteerd op musschen, doch konden de mededeelingen van MARTIN en SEVESTRE niet bevestigen.

SIMONIN en BENOIT ³⁾ hebben op voetspoor van MARTIN eveneens kleine vogeltjes als proefdieren gebruikt. Zij namen hunne proeven op de volgende wijze:

Eén Bloedvink ⁴⁾ werd met $\frac{1}{10}$ van zijn gewicht antidiphtherisch serum geïmmuniseerd. Den volgenden dag ontving deze, evenals een niet geïmmuniseerde

¹⁾ Extrait du Traité des Maladies de l'Enfance, Tome 1er.

²⁾ Zie ook STEENMEIJER blz. 41.

³⁾ Revue de Médecine, 1898 n°. 1, p. 48.

⁴⁾ Fransch: Calfat = bouvreuil d'Amérique. Deze diertjes zijn vlg. S. en B. nog vatbaarder voor d. bacillen, dan musschen.

vink, *eenige druppels* van eene 24 uur oude bouilloncultuur van den verdachten bacil in den musculus pectoralis. Wanneer de met serum geïmmuniseerde vink bleef leven — *althans verscheidene dagen langer leefde*, — dan de niet geïmmuniseerde, dan werd de bacil voor eenen diphtheriebacil gehouden.

Om te bewijzen, dat de serumwerking hierbij eene specifieke, en niet slechts eene algemeen toniseerende was, werden op analoge wijze behandelde vogeltjes met pyocyaneuscultuur geïnfecteerd. Daarbij bleek, dat de met serum behandelde niet beter voeren, dan de niet geïmmuniseerde dieren.

Op deze wijze stempelden zij tot diphtheriebacillen een twaalfstal stammen, die in den loop van eene Diphtherieëpidemie bij patienten met geene of geringe afwijkingen in den pharynx waren gevonden. Van deze waren er 5, die bij cavia's oedeem hadden veroorzaakt. De zeven andere waren voor cavia's absoluut onschadelijk.

Het springt in 't oog, dat deze experimenten, die de gelijksoortigheid van diphtherie- en pseudo-bacillen moeten bewijzen, niet boven critiek verheven zijn.

In de eerste plaats is het niet goed te begrijpen, waarom SIMONIN en BENOIT zulk eene enorme dosis serum inspoten, om eenige druppels van eenen uiterst zwak virulenten diphtheriebacil voor hun proefdiertjes onschadelijk te maken. Het is dan ook volstrekt niet uitgesloten, dat de seruminjectie in geenen deele specifiek gewerkt heeft, doch uitsluitend door de algemeene antiïnfectieuse eigenschappen, die ook aan normale sera eigen zijn. Dat het serum tegen eenen b. pyocyaneus niet beschutte, sluit niet uit, dat het tegen eenen

zwakker virulenten bacil wel zou kunnen immuniseeren. Bovendien blijkt uit hunne mededeelingen ¹⁾, dat in eenige gevallen de vogels, niettegenstaande die groote serumdosis toch, zij 't eenige dagen later, stierven; in die gevallen zijn stellig géén Diphtheriebacillen in 't spel geweest.

Mocht ooit gevonden worden, dat er bacillen bestaan, die volgens SPRONCK's criterium als pseudodiphtheriebacillen te beschouwen, vogeltjes dooden, terwijl eene evenredige dosis (*eenige milligrammen!*) serum hen immuniseert, dan zou men moeten aannemen, dat het experiment op cavia's niet gevoelig genoeg is, en zou men die bacillen voor diphtheriebacillen van zwakke virulentie moeten houden.

Men zou dan eene hoeveelheid serum moeten aanwenden, niet grooter, dan de dosis, die voldoende is om eene doodelijke dosis van eenen sterk virulenten diphtheriebacil voor de vogeltjes onschadelijk te maken. Daarbij zou dan eene contrôleproef met dezelfde bacillen, doch met gelijke hoeveelheid normaal paardeserum moeten genomen worden, om uit te maken, of het de specifieke diphtherie-immuniteit is, die daarbij in 't spel komt.

Op andere wijze heeft MARTIN ²⁾ de opvatting van SPRONCK bestreden. Een nieuwe, door hem samenge-

¹⁾ Volgens hunne Tabellen p. 68—71 stierven de met serum behandelde Calfats in één geval gelijk met de niet geïmmuniseerde; in één geval 29 uur, in twee gevallen 6 dagen, in één 8, in een ander 13 en in nog één geval 45 dagen na de niet geïmmuniseerde. In zeven gevallen bleven de geïmmuniseerde dieren leven, terwijl de niet geïmmuniseerde aan de injectie met voor cavia's niet schadelijke bacillen te gronde gingen.

²⁾ Annales de l'Institut Pasteur 1898. n^o. 1. 25 Jan. p. 26.

stelde voedingsbodem werd gebruikt om daarop bacillen te kweken, die volgens SPRONCK geen diphtheriebacillen zijn. Deze bacillen produceerden in dien voedingsbodem een vergif, waarvan kleine doses in staat waren een cavia te dooden, terwijl antidiphtherisch serum daartegen volkomen immuniseerde.

Daar een deel van mijne onderzoeken juist heeft bestaan in het herhalen van deze proeven, waarbij ik tot geheel andere resultaten ben gekomen, zal ik bij dit punt hier niet langer stilstaan, doch liever verwijzen naar het volgende hoofdstuk, waar men deze proeven met hunne resultaten en de daaruit te trekken conclusies zal behandeld vinden.

Volgens een referaat in het Centralblatt f. Bakteriologie deel XXIII. 1898. n^o. 18. schijnen HEWLETT and KNIGHT ¹⁾ vrijwel hetzelfde standpunt in te nemen als MARTIN en SEVESTRE. Zij onderscheiden eenen avirulenten d. b., morphologisch aan den virulenten gelijk, — en eenen pseudo-bacil, dien van LÖFFLER en VON HOFMAN — welke korter, plomper en meer gelijkmatig gekleurd is.

CZAPLEWSKI ²⁾ onderscheidt eenen avirulenten diphtheriebacil en eenen zeer daarop gelijkenden ps. d. b., die zich evenals de echte d. b. volgens GRAM kleurt, dezelfde morphologische eigenschappen heeft, doch op glycerineagar veel beter groeit, dezen roodbruin kleurt en avirulent is. Hij noemt echter dezen laatsten bacil wat grooter, dan de andere.

¹⁾ Transactions of the British Institute of Preventive Medicine 1898. n^o. 1.

²⁾ Deutsche med. Wochenschr. 1898 n^o. 6.

BRUNO SELNER ¹⁾ beschrijft ook „avirulente echte diphtheriebacillen”. Deze gaven infiltraten, één bij injectie van 2 cM³. cultuur zelfs een steriel absces. Hij heeft echter geen contrôleproeven met antidiphtherisch serum verricht.

KURTH ²⁾ spreekt ook van avirulente d. bacillen in tegenstelling met ps. d. Hij heeft er drie gevonden. Ze vormden minder zuur, weken ook in cultuur op serum en in bouillon wat af, doch gaven de kleurreactie van NEISSER. Dit is het eenige, zooals we spoedig zullen zien, zwakke argument, dat hij aanhaalt voor hunnen diphtherischen aard. Hij laat zich trouwens hierdoor niet weerhouden, te verklaren, dat de virulentie voor cavia's in de praktijk een voldoende criterium is om uit te maken of men met diphtherie te doen heeft.

Geven deze schrijvers dus geene of slechts zwakke argumenten voor het bestaan van avirulente of zeer zwak-virulente echte diphtheriebacillen in den pharynx, waaraan wij sedert STEENMEIJER's proeven meenden te mogen twijfelen, — ééne enkele waarneming van SIMONIN en BENOIT ³⁾ schijnt er sterk voor te pleiten. Op blz. 69, onder n^o. 13, beschrijven zij eenen bacil, die „Confère un léger oedème au cobaye, tue deux calfats témoins en 12 et 15 heures; le calfat sérum survit définitivement. Le même bacille, repris sur culture 2 mois après, tua un cobaye en 24 heures.”

¹⁾ Wiener Klin. Wochenschr. 1897.

²⁾ l. c.

³⁾ l. c.

Het boven aangestipte criterium van NEISSER verdient eene wat uitvoeriger bespreking. Hij publiceerde in 1897 een artikel ¹⁾, waarin hij behalve een constant verschil in de „Klatschpräparate” twee andere differentieel-diagnostica opnoemt tusschen den d. en den ps. d. bacil.

Het eene is de quantitatieve bepaling van het zuur-gehalte van 20 en 40 uur oude bouillonculturen. Pseudo-bacillen produceeren steeds veel minder zuur dan de echte d. b., zoodat men daarop de differentieeldiagnose kan stellen. Zooals reeds boven vermeld is, wijst SCHANZ ²⁾ er echter terecht op, dat de hoeveelheid zuur, die in eene cultuur in bepaalden tijd wordt gevormd, afhankelijk is van de hoeveelheid bacillen, waarmede de bouillon bezaaid wordt. Het is dus, zoolang we geen methode bezitten om die hoeveelheid constant te doen zijn, niet mogelijk langs dezen weg betrouwbare resultaten te verkrijgen.

De andere methode, die NEISSER aangeeft, is eene kleurmethode. Door gebruik te maken van de eigenschap, die den diphtheriebacil eigen is, om in zijne poolkorreltjes veel sterker kleurstof op te nemen dan in de rest van zijn lichaam, wist hij eene dubbelkleuring te verkrijgen, waarbij de korrels door methyleenblauw, het bacillichaam door vesuvine gekleurd werd. Zijne voorschriften luiden als volgt:

- I. 1 gr. methyleenblauw (GRÜBLER, Leipzig) opgelost in 20 cM³ alcohol van 96 %.

Daarbij komt 950 cM³. aq. destil. en 50 cM³. acetum glaciale.

¹⁾ Zeitschrift f. Hygiene 1897 Bd. XXIV heft 3.

²⁾ Wiener Med. Presse 1898.

II. 2 gr. vesuvine opgelost in 1 L. kookend gedestilleerd water.

Filtreeren, vooral van de laatste oplossing, is noodig.

Het op de gewone wijze gemaakte dekglaspraeparaat wordt 1—3 sec. in de methyleenblauwoplossing gekleurd, afgespoeld in water, dan 3—5 sec. in de vesuvine-solutie gedompeld, — weer afgespoeld, enz.

De culturen, die onderzocht worden, moeten op LÖFFLER's bij 100° gestold runderserum gegroeid, minstens 8, en hoogstens 20--24 uur oud zijn. De temperatuur van de broedstoof zij niet hooger dan 36°, liefst 34° à 35°. Op deze wijze behandeld, vertoonen de diphtheriebacillen blauwe korrels in den bruinen bacil, — terwijl de pseudodiphtheriebacillen homogeen bruin gekleurd worden.

Verschillende onderzoekers hebben deze kleurmethode beproefd en in hoofdzaak de bevinding van NEISSER bevestigd.

C. FRÄNKEL ¹⁾ bericht, dat alle diphtheriebacillen de kleuring van NEISSER aannemen. Hij heeft echter onder de avirulente corynebacteriën er eenige gevonden, bij welke ook de dubbelkleuring optrad.

Hetzelfde heeft HEINERSDORFF ²⁾ geconstateerd. Hij heeft bij xerosebacteriën de dubbelkleuring meestal zien ontbreken, behoudens in één geval.

AUKENTHALER ³⁾ en BERGEY ⁴⁾ berichten ook van ééne uitzondering.

¹⁾ Berliner Klinische Wochenschrift 1897, n°. 50.

²⁾ Centralblatt f. Bakteriologie 10 Maart 1898. p. 397

³⁾ Centralblatt f. Bakteriologie 16 April 1898 p. 625.

⁴⁾ Publications of the University of Pennsylvania. New Series n°. 4. Contributions from the Laboratory of Hygiene N°. 2. 1898.

KURTH ¹⁾ daarentegen vond bij al zijne pseudo-d. bacillen NEISSER's kleurreactie negatief uitvallen, doch vond bij drie stammen van virulente Diphtheriebacillen een zelfde *negatief* resultaat.

Ik zelf heb, zooals later blijken zal, de reactie van NEISSER ook zien falen.

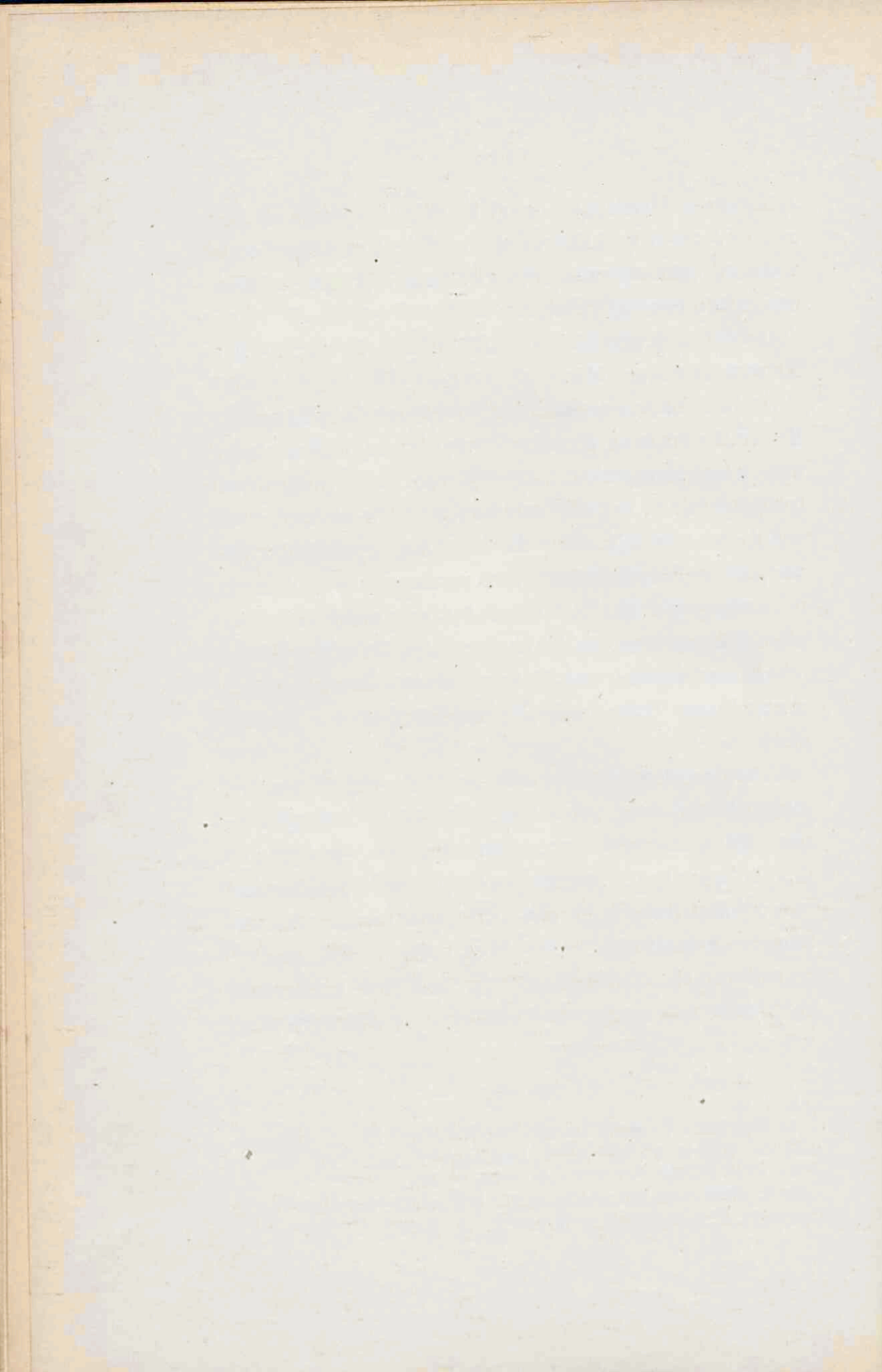
Op het *Congres te Madrid* ²⁾ werd ook door LÖFFLER, KRAUS, SPRONCK en DAULER de waarde van deze methode niet hoog aangeslagen. Daar kwam men integendeel tot het besluit, dat alle morphologische kenmerken van weinig waarde zijn, doch dat het eenige goede criterium van den diphtheriebacil is, het vermogen om een toxine te produceeren, dat de bekende typische ziekteverschijnselen teweegbrengt en dat verder in specifieke betrekking tot het antitoxine van BEHRING staat. Dit standpunt wordt thans door de groote meerderheid der deskundigen gedeeld.

Volledigheidshalve slechts vermeld ik een differentieel diagnosticum, dat door KRESLING ³⁾ is aangegeven; namelijk dat eene versche serumkolonie van pseudo-diphtheriebacillen, wanneer men ze op 't dekglas met water uitstrijkt of in een horlogeglas daarmede vermengt, gemakkelijk eene homogene emulsie vormt, terwijl versche diphtherieculturen moeilijk te emulgeeren zijn, doch zich slechts in kleine witte partikeltjes laten verdeelen.

¹⁾ l. c.

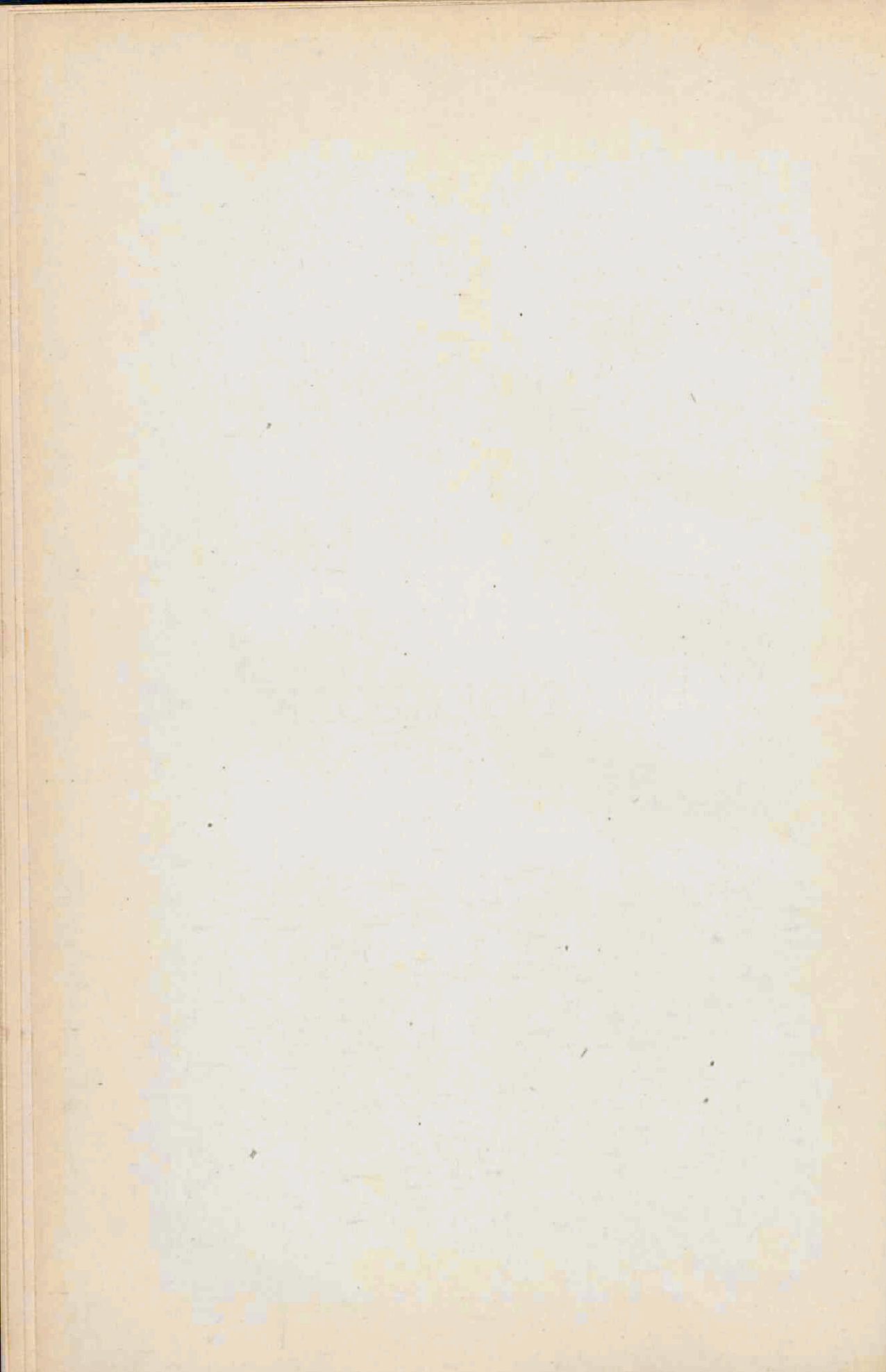
²⁾ Neuvième Congrès international d'Hygiène et de Démographie. Madrid 10—16 Avril 1898. Zie Semaine médicale 16 Avril 1898. p. 164.

³⁾ Pharmazeutische Zeitschr. f. Russland. 1896. Referaat in Centralbl. f. Bakt. 1898. 31 Maart n°. 13. p. 557.



II.

EIGEN ONDERZOEK.



HOOFDSTUK I.

HERKOMST EN BESCHRIJVING VAN EENIGE DOOR MIJ GEÏSOLEERDE „PSEUDODIPHThERIEBACILLEN”.

Zooals hooger reeds gezegd is, heeft MARTIN, weinig voldaan over de tot nog toe gebruikte voedingsbodems, eene nieuwe bereiding van gepeptoniseerden bouillon aangegeven, die veel sneller en veel sterker toxine leveren zou, dan de vroeger aangewende in staat waren te verschaffen.

Roux en YERSIN hadden gezien, dat de diphtherie-bacil kalfsbouillon eerst zuur, later alkalisch maakte en dat de productie van toxine slechts begon, wanneer het tijdperk der alcaliciteit intrad.

SPRONCK toonde aan, dat de aciditeit een gevolg was van de omzetting van glycose, in den bouillon aanwezig. Ook de peptonen van den handel bevatten soms stoffen, die zuurproductie kunnen teweegbrengen.

MARTIN bereidde daarom zelf zijn pepton:

Eenige van vet en serosa gezuiverde varkensmagen worden in verhouding van:

Varkensmagengehakt . . .	200 gr.
Acid. hydrochlor. pur. . . .	10 gr.
Water van 50° C.	1000 gr.
bij 50° C. gedigereerd. Na 12 à 24 uur wordt de	

pepsine door verhitting tot 100° C. vernietigd. Dan wordt het vocht door een zeef of wattenlaag gefiltreerd, verwarmd en bij 80° gealcaliniseerd, zóódat de alcaliteit bedraagt 7 cM³ normaalsodaoplossing per Liter. Daarna wordt weder gefiltreerd. Vervolgens kan men dezen peptonbouillon verhitten tot 120° , door papier filtreren en steriliseeren bij 115° . Deze vloeistof wordt door MARTIN genoemd: *Bouillon de panse*. Zij levert volgens zijne opgave sterke toxines.

Beter is nog vermenging met vleeschmaceratie. Deze werd in navolging van SPRONCK, die had aanbevolen het vleesch te laten rotten, om de koolhydraten te doen vergisten, op de volgende wijze bereid:

Men neemt 500 gr. gehakt kalfsvleesch op 1 Liter water en laat dit 20 uur bij 35° in den broedstoof rotten. Daarna wordt uitgeperst en 5 gram keukenzout per Liter toegevoegd. De zoo verkregen vloeistof wordt vermengd met gelijke deelen „*Bouillon de panse*,” gealcaliniseerd en gefiltreerd als boven is aangegeven. Dan wordt tot 70° verhit om het eiwit te stollen, gefiltreerd, gealcaliniseerd en gesteriliseerd.

De sterilisatie geschiede liefst door eenen Chamberland-bougie. Men verkrijgt echter ook nog zeer goede resultaten bij verhitting tot 120° .

Op dezen voedingsbodem vormt de diphtheriebacil fraaie vliezen, hetgeen voor de toxineproductie gunstig is.

In het bezit van eenen voedingsbodem, die veel beter toxine levert, dan de tot nog toe bekende, trachtte MARTIN nu met bacillen, die voor cavia's niet virulent waren, werkzame toxinen te produceeren.

Met 7 uit den pharynx van kinderen afkomstige

bacillen en met éénen spontaan verzwakten bacil, afkomstig van eenen zeer virulenten en sterk toxigenen diphtheriebacil, werd deze proef genomen.

Al deze bacillen leverden een toxine, waarvan 1—2 cM³ een cavia doodden. Op ééne uitzondering na waren het alle volgens het criterium van SPRONCK pseudo-diphtheriebacillen. Toch produceerden zij *echte* diphtherie-toxine, dat namelijk door antidiphtherisch serum werd geneutraliseerd.

Hieruit maakt MARTIN op, dat de scheiding tusschen d. en ps. bacillen eene kunstmatige is.

Allereerst heb ik nu deze gewichtige proeven van MARTIN herhaald. Om de daartoe noodige culturen te erlangen heb ik vooreerst den pharynx van diphtherie-reconvalescenten bacteriologisch onderzocht. Kinderen met echte BRETONNEAU'sche diphtherie in de barakken van het stedelijk ziekenhuis alhier opgenomen, waarbij ik dadelijk na de opname virulente diphtheriebacillen had gevonden, werden tijdens hun verblijf in, en na hun vertrek uit het ziekenhuis eenige malen onderzocht, om te zien of zij na eenigen tijd, zooals ROUX en YERSIN hadden medegedeeld, bacillen zouden leveren die minder virulent, en ten slotte, avirulent waren.

Daar echter diphtherie in de laatste maanden hier in Utrecht zeer zeldzaam was, heb ik op deze wijze slechts twee stammen kunnen verkrijgen.

In de tweede plaats heb ik onderzocht *kinderen* met *acute pharyngitis*. Kinderen, — omdat deze veel meer vatbaar zijn voor diphtherie dan volwassenen en

dus hun pharynx een betere voedingsbodem voor deze bacteriën schijnt te zijn. Gevallen van *acute pharyngitis* waren het meest geschikt, omdat men daarbij kans had de lichte gevallen van diphtherie met zwak virulente bacillen te vinden, waarvan de *Fransche* auteurs spreken, en daarenboven de mogelijkheid bestond, dat eventueel aanwezige avirulente Diphtheriebacillen hier door symbiose met streptococcen, die vrij constant bij deze patiënten werden gevonden, virulenter zouden kunnen gemaakt zijn.

Van het standpunt der *Fransche* onderzoekers redeneerende, had men dus, door op deze wijze te zoeken, de meeste kans de door MARTIN beschreven bacillen te vinden.

Het materiaal werd nu van deze patiënten op de volgende wijze verkregen.

Een bij 120° gesteriliseerd stukje spons van ongeveer 5 mm. in elk van de drie afmetingen, werd met een geflambeerd pincet gevat en vervolgens eenige malen langs den pharynx gestreken; daarna onmiddellijk in een buisje met LÖFFLER's paardenserum gebracht. Gewoonlijk herhaalde ik dit nog met een tweede sponsje en wreef beide over de oppervlakte van het serum met behulp van eene uitgegloeide platinalis.

De sponsjes bleven dan in het condensatiewater van het eerste buisje liggen. De platinalis, die op deze wijze met het aan de sponsjes klevende slijm ruim in aanraking was geweest, werd nog over een tweede en derde buisje zonder nieuwe belading uitgestreken.

Het drietal buisjes werd bij 37° in de stoof geplaatst en na 24 uur onderzocht. Leverde het onderzoek na

24 uur geen bevredigend resultaat op, dan werd het de volgende dagen herhaald.

Van verdachte kolonies werd met LÖFFLER's methyleenblauw een dekglaspraeparaat gekleurd en met een immersiesysteem onderzocht.

Vond ik eene uit corynebacteriën bestaande kolonie, dan verdeelde ik de rest daarvan in eenige cm^3 sterielen bouillon. Hiervan werd eene platinalis over drie buisjes serum uitgestreken. Den volgenden dag waren dan geïsoleerde kolonies opgekomen, waarvan ééne nogmaals in bouillon verdeeld werd. De uitzaaiing van deze suspensie leverde steeds absoluut reine kolonies.

Vervolgens werd van deze reincultuur de virulentie onderzocht:

Hiertoe werd in gewonen alkalischen bouillon uitgezaaid. Van de zoo verkregen matig troebele, 24 uur oude cultuur werd bij eene cavia 2 cm^3 subcutaan aan het abdomen ingespoten. Dit dier werd dan dagelijks nauwkeurig geobserveerd en gewogen.

Bleek de cavia geene afwijkingen te vertoonen, of slechts een gering oedeem, dat enkele dagen bleef bestaan, dan kon ik besluiten met eenen niet of zeer weinig virulenten bacil te doen te hebben.

Volgens de conclusies van STEENMEIJER was het dan een pseudodiphtheriebacil, volgens de *Franschen* allicht een niet, of zeer zwak virulente echte diphtheriebacil.

In *Tabel I* vindt men een overzicht van de door mij verrichte uitzaaiingen en de daarbij gevonden bacillen, met het resultaat der infectieproeven daarmede genomen.

Een voorloopig onderzoek met de kleurmethode van NEISSER werd steeds na het reinkweken verricht. Wijn

Tabel I.

Herkomst en eigenschappen van de

Nummer v. d. cultuur.	Patiënt.	Datum van de uitzaaiing.	Opgekomen culturen.	Vorm en grootte der Bacillen. Kleuring met LÖFFLER'S Methyleenblauw.
I.	C. J. 6 jaar. Diphtherie-Recon- valescent.	10 Juni.	Streptococcen, staphylococ- cen, 3 kolonies bestaande uit coryne-bacteriën.	Middelmatig lange ba- cillen; duidelijke knotsen.
III.	M. d. J. 16 mnd. Angina; stenosis Laryngis.	11 Juni.	Streptococcen, een 6 tal ver- dachte kolonies.	Korte spoelvormige ba- cillen. Plasmolyse aange- duid.
IV.	A. J. F. 3 jaar. Diphtherie; Laryn- gitis. Intubage verricht.	20 Juni.	Bijna reincultuur van diph- theriebacillen.	Lange bacillen, duide- lijke knotsen.
VII.	Zie n°. I.	29 Juni.	Verschillende coccen. Enkele kolonies bestaande uit coryne- bacteriën.	Korte spoelvormige ba- cillen. Aanduiding van plasmolyse.
VIII.	Zie n°. IV.	8 Juli.	Enkele kolonies gevonden.	Korte spoelvormige ba- cillen. Aanduiding van plasmolyse.
IX.	A. v. d. K. 11 jaar. Pharyngitis acuta; Bronchitis.	11 Juli.	Een drietal geïsoleerde kolo- nies, bestaande uit coryne-bac- teriën. Deze rein gekweekt en gemarkt B. IXa. Verder massa's kleine samen- hangende kolonies die alle ook coryne-bacteriën bevatten. Rein- gekweekt en gemarkt B. IXb.	IXa. middelmatig lange bacillen, duidelijke knot- vorming. IXb. dito.
XI.	Zie n°. IX.	1 Aug.	Op het eerste buisje een con- tinue laag vervloeiende bacillen, waartusschen in ieder dekglas- praeparaat massa's coryne-bac- teriën. Op het tweede buisje één geele kolonie, eenige witte kolonies met navelvormige inzinking en eenige witte kolon. zonder navel.	XI geele: Lange slanke coryne-bacteriën. Duide- lijke knotsen. XI. w. m. n. Middelma- tig lange coryne-bacteriën met duidelijke knotsen. XI. w. z. n. dito.
XII.	P. C. Tonsillitis.	11 Aug.	Staphylococcen en streptococ- cen. Hier en daar diffuse ve- getaties, die coryne-bacteriën bevatten.	Korte, spoelvormige bacillen, spoor van plas- molyse.
XVI.	L. P. Pharyngitis acuta; Bronchitis.	17 Aug.	Enkele kolonies bestaande uit coryne-bacteriën.	Korte spoelvormige ba- cillen, spoor van plas- molyse.

gde Pseudo-Diphtheriebacillen.

ER's thode.	Reactie van de cultuur in glycosebouillon.	Infectieproeven (subcutane injectie bij cavia's van 300—400 gr.)	
		A. Zonder prophylactische injectie van serum antidiphthericum.	B. Na voorafgegane injectie van anti- diphtherisch serum.
ef.	—	Cavia dood na 40 uur.	
ef.	Alcalisch.	Cavia na 24 uur spoor oedeem op de injectieplaats. Na 24 uur nor- maal; — blijft gezond.	
ef.	Zuur.	Cavia dood na 40 uur.	
ef.	Alcalisch.	Cavia vertoont gering oedeem, dat na enkele dagen verdwenen is; — blijft gezond.	
ef.	Alcalisch.	Cavia heeft na 24 uur gering oedeem na 48 uur normaal. — Blijft gezond.	
itief.	IXa. Zuur.	IXa. Cavia heeft na 24 uur gering oedeem; — daarna blijft 't dier ge- zond.	IXa. Oedeem na 24 uur. Later gezond.
itief.	IXb. Zuur.	IXb. Oedeem na 24 uur; later ge- zond.	IXb. dito.
le: f.	XI. geele Zuur.	XI. geele: Cavia na 24 uur oedeem — later infiltraat. Na 6 dagen absces, dat den geïnjecteerden bacil in rein- cultuur bevat. Absces geneest na doorbraak snel.	XI geele: — Oedeem, later absces, evenals de andere cavia.
. n. f. n. f.	XI. w. m. n. zuur.	XI. w. m. n. oedeem, na 3 dagen verdwenen.	XI. w. m. n. oedeem, na 3 dagen verdwenen.
	XI. w. z. n. Zuur.	XI. w. z. n. oedeem, — na 2 dagen verdwenen.	XI. w. z. n. oedeem na 2 dagen verdwenen.
f.	Alcalisch.	Gering oedeem, waarvan een spoor nog twee dagen blijft bestaan.	
f.	Alcalisch.	Na 24 uur gering oedeem. Na 48 uur is het dier geheel normaal.	

ik echter daarbij met LÖFFLER's *paardenserum* werkte, was het resultaat daarvan niet als definitief te beschouwen. Later heb ik mij LÖFFLER's *runderserum* verschaft en de methode van NEISSER daarmee precies volgens zijne opgaven nog eens toegepast op al mijne bacillen en tegelijk ter contrôle op een aantal echte diphtheriebacillen. Het bleek, dat het resultaat volmaakt met het voorloopig onderzoek overeenkwam.

De uitkomsten van dit onderzoek zijn ook in *Tabel I* vermeld.

Eene korte bespreking van de hierin geregistreeerde gegevens moge hier volgen:

C. J. (*uitzaaiing* I en VII) is een patiëntje, dat met diphtherie in de barak verpleegd werd. De eerste uitzaaiing ($\pm$ 14 dagen na het begin van de ziekte), door mij verricht, toen het kind klinisch reeds vrij wel hersteld was, leverde nog virulente diphtheriebacillen.

De tweede uitzaaiing (19 dagen later) gaf reeds alleen korte corynebacillen.

M. D. J. (*uitzaaiing* III) een kind van 16 maanden met angina en stenose-verschijnselen, onmiddellijk na opname onderzocht, leverde een zelfden avirulenten bacil, géén virulente d. b.

A. J. F. (*uitz.* IV en VIII), weder een patiëntje met manifeste diphtherie. De eerste uitzaaiing, direkt na opname gaf talrijke virulente diphtheriebacillen — de tweede, 17 dagen later, leverde reeds enkel avirulente bacillen op.

A. v. D. K. (*uitz.* IX en XI): Acute pharyngitis en bronchitis; geen spoor van membranen; patiënte is niet in contact geweest met diphtheriepatiënten, die

trouwens op dat tijdstip in de stad haast niet voorkwamen. Ook zijn later geen paralyzen opgetreden. Urine-onderzoek heeft niet plaats gehad.

Dit elfjarige meisje leverde mij resultaten op, die in verschillende opzichten interessant zijn. Ik vond bij haar bij eerste uitzaaiing vrij lange bacillen met duidelijk knotsvormige einden, die morphologisch véél meer dan de gewone pseudodiphtheriebacillen op echte geleken, bij NEISSER's methode manifeste dubbelkleuring vertoonden, doch avirulent waren. De tweede uitzaaiing, toen 't kind genezen was, leverde behalve dergelijke bacillen, bovendien nog andere kolonies, van een type, dat volmaakt met echte diphtheriebacillen overeenkwam, afgezien van de virulentie.

P. C. (*uitz.* XII.) was een geval van tonsillitis, dat het gewone type van avirulente bacillen leverde, evenals L. P. (*uitz.* XVI) een mazelen-reconvalescent, die aan pharyngitis en bronchitis leed.

In de tabel zijn niet opgenomen 6 gevallen van kinderen met acute pharyngitis, waar geen corynebacteriën werden gevonden.

Zooals verder uit *Tabel I* blijkt, zijn in 5 van de positieve gevallen de gewone korte, avirulente bacillen gevonden.

Bij kleuring met LÖFFLER's methyleenblauw waren het korte, dikke, min of meer spoelvormige staafjes, zonder verdikte einden. Vele bacillen in elk praeparaat. vertoonden echter de sterkere tinctie der einden en gaven een begin van „plasmolyse" te zien, dat echter in de jonge culturen steeds gering was.

Gekleurd volgens de methode van NEISSER, werden zij homogeen bruin.

In reine cultuur op LÖFFLER's serum waren de kolonies witter, vochtiger en platter, dan die van echte diphtheriebacillen.

Ze groeiden op agar-agar goed. Vaak merkte ik op, dat de bij kamertemperatuur bewaarde culturen na eenige dagen in omvang waren toegenomen.

Bij het maken van dekglaspraeparaten vloeiden de kolonies gemakkelijk uit tot eene homogene emulsie. In bouillon groeiden zij goed, doch zwakker, dan de echte diphtheriebacillen. Zij maakten den bouillon homogeen troebel.

In glycose-bouillon vormden zij geen zuur.

Vertakkingen vertoonden zij geen van alle.

Eigenbeweging werd nooit waargenomen.

De virulentie voor cavia's was nagenoeg nihil. 2 cM³ van eene goed troebele cultuur bracht of geen, of slechts een zeer gering oedeem teweeg, dat snel verdween en zeer goed door de bacillenlichamen, onafhankelijk van eenige specifieke werking, ten deele ook wel door het peptongehalte van den gebruikten bouillon kan zijn veroorzaakt. Immers een spoor oedeem na 24 uur heb ik ook na injectie van 2 cM³ sterielen bouillon zien ontstaan.

Bij patiëntje A. v. d. K. (uitz. IX en XI.) vond ik andere bacillen.

Na 2 × 24 uur waren op het eerste buisje een drietal geïsoleerde kolonies aanwezig, die uit corynebacteriën bleken te bestaan.

Eene van deze werd verdeeld in bouillon en leverde na reinkweeking *Bacil IXa*. Verder was het geheele buisje bedekt met eene samenhangende cultuurmassa, die, behalve verschillende andere soorten microben,

overal massa's corynebacteriën bleek te bevatten. Daar deze wat schenen af te wijken van de geïsoleerde kolonies, werden ze ook reingekweekt, en deze stam gemerkt *Bacil IXb*. Het bleek echter, dat de geringe verschillen niet constant waren, zoodat de reinculturen van *B. IXa* ten slotte niet meer van die van *B. IXb*. te onderscheiden waren.

Beide waren langer dan de eerstbeschrevene, vertoonden duidelijke plasmolyse, hadden knotsvormige uiteinden, die zich bij de methode van NEISSER blauw kleurden.

Daarentegen groeiden ze op serum in witte, platte, vochtige kolonies, die gemakkelijk in water te emulgeeren waren, vertoonden ze sterker groei op agar en maakten bouillon gelijkmatig troebel.

Bij de tweede uitzaaiing (XI) vond ik op het eerste buisje een continue laag peptoniseerende microben, waartusschen massa's tamelijk lange, duidelijk knotsdragende bacteriën zaten. Op het tweede buisje een aantal witte, ronde kolonies met eene navelvormige inzinking in het midden en eenige groote, witte, platte, onregelmatige kolonies zonder navel. Verder één of twee geele kolonies.

De eerste vormen bleken na reinkweeking tamelijk wel identiek te te zijn. De „navel” vertoonde zich bij beide in sommige kolonies wel, in andere niet. De bacillen beantwoordden in alle opzichten aan de beschrijving van *B. IX a.* en *b.* gegeven. Ze werden genummerd als *B. XI w. m. n.* en *B. XI w. z. n.*

Meer afwijkend was bacil XI, *geele*, waarvan, zooals ik zeide, een paar kolonies aanwezig waren. Deze was

lang, en geleek totaal op eenen echten diphtheriebacil, zoowel in kleur en vorm der kolonies, als in het microscopisch praeparaat.

Opvallend was de geele kleur der kolonies op serum. Terwijl deze bij alle tot nu toe beschreven bacillen witter was dan het serum, waarop ze gegroeid waren, steken de kolonies van *Bacil XI*, *geele*, door een fraai geele tint tegen het veel lichtere serum af. Deze kleur, minder gesatureerd dan, doch herinnerend aan *staphylococcus aureus*, ziet men bij echte diphtherieculturen vaak ook.

In tegenstelling met de andere door mij onderzochte bacillen maakten alle bij dit patiëntje gevonden bacteriën neutralen bouillon met 1% glycose zuur.

Met deze 5 bacillen werden infectieproeven genomen met en zonder prophylactische seruminjectie.

De beide *Bacillen IX* en de *witte XI* veroorzaakten bij injectie van 2 cM³ van eene matig troebele bouilloncultuur een gering oedeem, dat hoogstens 2 × 24 uur bleef bestaan, en door antidiphtherisch serum niet werd geïnfluenceerd.

Bacil XI geele gaf daarentegen een merkwaardig resultaat. Bij de infectieproef volgens de methode van SPRONCK met 2 cM³ van eene 2 × 24 uur oude cultuur kregen zoowel het serum-dier, als het niet geïmmuniseerde, sterke infiltraten, die na eenige dagen in abscessen overgingen.

Daar de mogelijkheid bestond, dat hier, niettegenstaande zorgvuldige reinkweeking toch nog verontreiniging met etterkokken in het spel was, suspendeerde ik nog eens in bouillon en kweekte weder nieuwe geïsoleerde kolonies.

Met de zoo verkregen, ontwijfelbaar reine cultuur werd de proef op dezelfde wijze herhaald. Wederom kwamen abscessen, bij beide dieren even groot. Uit deze abscessen kon ik 8 dagen na de injectie den *Bacil* XI *geele* in reincultuur kweeken.

Een dergelijk resultaat heb ik anders nooit gezien en ook nergens beschreven gevonden. Wel komt soms door virulente diphtherieculturen necrose van de huid tot stand en kan men door inspuiting van zeer groote doses avirulente bacillen, abscessen teweegbrengen, wier ontstaan aan de invoering van de groote menigte der overigens indifferente bacterie-lichamen is toe te schrijven, doch noch het eene, noch het andere geval hebben wij hier.

Tot op 't oogenblik, dat de abscessen, die B. XI *geele* maakt, neiging gaan vertoonen om door te breken, blijft de huid haar normaal aspect houden. Dan ontstaat eene kleine perforatie-opening, die zich na lediging van het absces weer snel sluit. Dat is heel iets anders, dan de huidnecrose, die door het diphtheriegif ontstaat. Deze wordt trouwens door immuniseering geheel voorkomen.

Dat het absces uitsluitend aan de inspuiting van eene groote hoeveelheid bacillen zou zijn toe te schrijven is moeielijk aan te nemen. In deze dosis geven andere corynebacteriën nooit abscessen. We hebben dus hier waarschijnlijk met een bacil te maken, die zich zoowel van den diphtheriebacil, als van de andere bekende corynebacteriën onderscheidt.

Vooruitlopende op hetgeen later zal worden medegedeeld, kan ik in dit verband nog vermelden, dat ik door injecties van groote massa's cultuur van *Bacil*

IXa bij een konijn mij een serum heb verschaft, dat B. IXa tot in verdunningen van 1:500 en meer agglutineerde. Dit serum was echter onwerkzaam tegenover de andere bacillen van pat. A. v. d. K.

De mogelijkheid bestaat dus, dat ook de andere vier bacillen van dit geval nog tot verschillende soorten behooren.

Resumeerende, vinden wij dus de volgende bijzonderheden:

- 1°. Voorkomen van *grootte massa's* „pseudodiphtheriebacillen” in den pharynx van een kind tijdens en na afloop van eene acute Pharyngitis.
- 2°. Minstens twee vormen van „pseudodiphtheriebacillen”, die morphologisch, biologisch en in virulentie duidelijk verschillen, zoowel onderling als tegenover de andere door mij gevonden corynebacteriën.
- 3°. Zeer verschillend verhouden van uit één geval geïsoleerde, morphologisch en biologisch totaal gelijke bacillen, ten opzichte van het serum van een, met één dier bacillen vooraf behandeld, konijn.

HOOFDSTUK II.

VERGELIJKEND ONDERZOEK NAAR DE TOXINE-PRODUCTIE VAN DIPHTHERIE- EN „PSEUDODIPHTHERIEBACILLEN” IN MARTIN'S VLOEISTOFFEN EN IN GISTDECOCT.

Met een achttal der boven beschreven bacillen werden proeven genomen, om na te gaan in hoeverre zij tot productie van toxine in staat zouden zijn, en zoo ja, of de geproduceerde toxine met die van den virulenten diphtheriebacil identisch zou blijken.

Voor de bereiding der gezochte toxine maakte ik gebruik van den door MARTIN aangegeven voedingsbodem, op verschillende wijzen bereid, en van den nieuwen voedingsbodem, door SPRONCK ¹⁾ aangeraden, welke, in vergelijking met de vroeger gebruikte bouillons, eene veel sterkere en snellere toxine-productie toelaat.

Deze voedingsbodem bestaat uit een afkooksel van gist, waarbij keukenzout en pepton-WITTE wordt gevoegd, dat vervolgens wordt geneutraliseerd en gealcaliniseerd met 7 cM³ normaalsoda per liter.

¹⁾ Congrès International d'Hygiène et de Démographie. Madrid 10—16 April, 1898.

Ned. Tijdschrift voor Geneeskunde 1898. I. n^o. 17 p. 652.

Annales de l'Institut Pasteur. 25 Octobre, 1898.

Op dit gistdecoct gelukte het SPRONCK $20 \times$ sterkere toxine te produceeren, dan op de vroeger gebruikte bouillons.

Door eenige voorloopige proeven met virulente diphtheriebacillen heb ik mij overtuigd, dat deze voedingsbodem betere resultaten geeft, dan de bouillon van MARTIN, hoe ook bereid.

Zooals reeds vermeld is ¹⁾, geeft MARTIN feitelijk verschillende cultuurvloeistoffen aan:

- 1°. Varkensmaagpepton-oplossing (*Bouillon de Panse*), die na alcalinisatie verhit is tot 120° , daarna gefiltreerd en bij 115° gesteriliseerd;
- 2°. Dezelfde oplossing vermengd met gelijke deelen *vleeschmaceratie*.

Dit mengsel moet tot 70° verwarmd worden, om de eiwitachtige lichamen te doen stollen, vervolgens gefiltreerd, gealcaliniseerd en gesteriliseerd worden.

De sterkste toxine verkrijgt men door te steriliseeren met een Chamberland-filter. Men kan ook 3 maal tot 100° verhitten, of steriliseeren bij 120° . De laatste methode zou ook nog zeer goede resultaten geven.

De onvermengde pepton-oplossing (*Bouillon de Panse*) is door mij niet gebruikt. Wel bezigde ik de volgende vloeistoffen, die nauwkeurig volgens de opgaven van MARTIN bereid werden:

- I. „*Bouillon de Panse*”, gealcaliniseerd en gefiltreerd volgens zijne opgaven, doch niet tot 120° verhit, gefiltreerd of gesteriliseerd bij 115° , —

¹⁾ Blz. 20.

onmiddellijk versch vermengd met gelijke deelen vleeschmaceratie. Het mengsel tot 70° verhit, gefiltreerd, gealcaliniseerd en gesteriliseerd door een Chamberland-filter.

II. „*Bouillon de Panse*”, vermengd met vleeschmaceratie, geheel behandeld als I, doch gesteriliseerd bij 120° .

III. „*Bouillon de Panse*” tot 120° verhit, gefiltreerd en gesteriliseerd bij 115° en aldus eenigen tijd bewaard — zooals MARTIN aangeeft —, vermengd met versch bereide vleeschmaceratie, verder behandeld als I en gesteriliseerd door een Chamberland-filter.

De vrij gecompliceerde voorschriften, door MARTIN gegeven, werden nauwkeurig opgevolgd; steeds werden meerdere (3—5) magen verwerkt, om zooveel mogelijk een constant praeparaat te verkrijgen.

Deze bouillons heb ik vergeleken met het gistdecoct van SPRONCK. Hiertoe ging ik op de volgende wijze te werk:

Daar het van veel belang is voor eene goede toxine-productie, dat de bacil fraaie vliezen vormt aan de oppervlakte van de cultuurvloeistof, moest er voor gezorgd worden, dat op beide vloeistoffen, die onderling vergeleken worden, eene zooveel mogelijke gelijke vliesvorming plaats had.

Daarom werden, van eene 24 uur oude cultuur op LÖFFLER's serum, twee buisjes — één met MARTIN's vloeistof en één met gistdecoct — terzelfder hoogte gevuld en in den broedstoof naast elkaar schuin geplaatst, met ongeveer gelijke hoeveelheden cultuurmassa bezaaid,

waarbij zorg werd gedragen, deze zooveel mogelijk aan de oppervlakte en op de grens van vloeistofspiegel en glaswand te deponeeren. Na een of twee dagen was dan doorgaans op beide, soms ook slechts op één van beide buisjes een vlies gevormd. Van deze vliezen werd met dezelfde platinalis een even groot stuk op de definitieve cultuurflesschen overgezet. Waren op beide buisjes vliezen, dan werd van beide op de gelijknamige cultuurflesschen overgezet; was er slechts op één van beide een vlies, dan trachtte ik dit eerst op een buisje van den anderen voedingsbodem te doen groeien, om dan later van beide buisjes tegelijk de flesschen te enten.

Enkele malen was bij de pseudodiphtheriebacillen de vliesvorming slechts gebrekkig. Daarbij was een klein verschil in 't nadeel der vloeistof van MARTIN op te merken.

De cultuurflesschen, van 500 of van 250 gram inhoud, waren voor $\frac{3}{5}$ met de steriele cultuurvloeistof gevuld en met eene wattenprop gesloten. Zij werden zooveel mogelijk schuin geplaatst, zoodat de vloeistofspiegel zoo groot, en de hoogte van de vloeistof zoo gering mogelijk was. Beide flesschen, één met MARTIN's vloeistof en één met gistdecoct waren onmiddellijk naast elkaar in éenen standaard geplaatst, zoodat ook eventueele schokken, die de vliezen konden doen zinken, op beide een even sterken invloed moesten hebben. De omstandigheden waren alzoo volkomen gelijk.

Na enting bleven de flesschen bij $35^{\circ} C.$ rustig staan. In 24 uur bedekte zich gewoonlijk de geheele oppervlakte met een fraai vlies, dat soms na eenige dagen zonk en dan door een nieuw werd vervangen. De

cultuur werd meestal na $\pm$ ééne of anderhalve week gestaakt.

Op deze wijze heb ik eenige proeven genomen met virulente diphtheriebacillen. De culturen werden met 0,3 % carbol vermengd en door papier gefiltreerd. De aldus verkregen, heldere, toxische vloeistof, werd bij cavia's van middelmatige grootte (300 à 500 gr.) ingespoten in dosis van 0,2, 0,1, 0,05 en 0,01 gram.

De dieren, die onderling vergeleken moesten worden, waren van gelijk gewicht.

In *Tabel II* vindt men het resultaat van deze proeven.

Het blijkt, dat de resultaten met het gistdecoct met 4 verschillende bacillen verkregen, bij verschillenden ouderdom der culturen (van 5 tot 11 dagen) tamelijk wel met elkaar overeenkomen. Steeds lag althans de minimale doodelijke dosis tusschen 0,05 en 0,01 cM³ cultuurfiltraat.

Uit deze cijfers mogen geen conclusies getrokken worden aangaande de „Leistungsfähigkeit” der gebruikte voedingsbodems. Bij opzettelijk daarop gerichte experimenten is het gemakkelijk, veel sterkere toxinen te verkrijgen, zooals ook door SPRONCK en MARTIN is medegedeeld. Slechts ter vergelijking van gistdecoct en MARTIN's voedingsbodem hebben zij waarde.

Het uit verschen *bouillon de panse* en versche vleesch-maceratie bereide, door Chamberland-filter gefiltreerde mengsel, blijkt tamelijk wel dezelfde capaciteiten te bezitten, als het gistdecoct; — echter sterven de cavia's, die met „gist”-toxine zijn ingespoten, alle nog eerder, dan die, welke even groote hoeveelheden „MARTIN”-toxine kregen.

Het versch gemengde, doch tot 120° verhitte mengsel van MARTIN, bleek een zeer geringe hoeveelheid gif te hebben geproduceerd, terwijl een mengsel van tot 120° verhitten „*Bouillon de Panse*” met verse vleesch-maceratie, dat door een „Chamberland” gefiltreerd was, niet veel beter resultaat gaf.

We zien dus, dat de vloeistof van SPRONCK in vele opzichten boven die van MARTIN te verkiezen is:

Het resultaat met verschillende bacillen en op verschillende tijden bereide cultuurvloeistof is steeds vrij constant; de bereiding is gemakkelijk en weinig kostbaar, de materialen steeds gemakkelijk te verkrijgen.

Daarentegen doet het feit, dat ik met twee van de drie bereidingen van MARTIN's voedingsbodem slechte, hij zelf echter goede resultaten kreeg, duidelijk zien, dat deze vloeistoffen een weinig constant resultaat geven.

De bereiding is omslachtig en tijdroovend.

Voor het materiaal is men van de welwillendheid van den slager afhankelijk en, wat ook een groot bezwaar is, bij de sterilisatie door een „Chamberland” staat men steeds aan het gevaar bloot de verkregen vloeistof geheel of ten deele te zien bederven, 't zij door het gebruik van eene slechte bougie, of door verontreiniging uit de lucht, waarvoor bij het steriel aftappen van groote hoeveelheden vloeistof steeds gevaar bestaat.

Op analoge wijze werden nu vergelijkende proeven genomen met „pseudodiphtheriebacillen”.

Van deze werden de bacillen VIII, IXa, XI *geele*, XI *w. m. n.*, en XII op het niet tot 120° verhitte, door Chamberland gefiltreerde mengsel gekweekt. Bacil III

en VII op het bij 120° gesteriliseerde mengsel en B. XVI op het gefiltreerde mengsel van, bij 120° gesteriliseerde, *bouillon de panse*, en verse vleeschmaceratie. Verder alle op gistdecoct van verschillende bereidingen afkomstig.

Daar ik hier grootere hoeveelheden moest inspuiten was het niet gewenscht, de culturen met carbol te steriliseeren. De mogelijkheid moest uitgesloten worden, dat de carbol òf op de proefdieren, òf op de „toxine” eene ongewenschte nevenwerking zou kunnen uitoefenen. Daarom filtreerde ik, zooals trouwens ook MARTIN heeft gedaan, de culturen door bougies.

Contrôleproeven leerden, dat subcutane inspuiting van den voedingsbodem in dosis van 10 en ook van 5 cM³. belangrijke oedemen kon teweegbrengen, welke de beoordeeling der „toxine”werking zouden kunnen bemoeilijken. Daarom spoot ik van de cultuurfiltraten slechts 2 cM³. in, in welke dosis evenwel zelfs de steriele voedingsbodem nog eene geringe zwelling veroorzaakte.

MARTIN heeft, uitgenomen in één geval, waar hij ook 2 cM³. gebruikte, slechts 1 cM³. ingespoten.

Tabel III. geeft een overzicht van den uitslag dezer proeven. Bacil IXa en XI *w.m.n.* vormden minder goede vliezen. Wel is waar bedekte de voedingsbodem zich met eene duidelijke membraan, doch deze bleef dunner en vertoonde enkele hiaten. Op gistdecoct waren de vliezen dikker, dan op MARTIN's mengsel.

De andere bacillen vormden dikke fraaie vliezen, evenals de echte diphtheriebacillen.

De cultuur werd na 6 tot 9 dagen gestaakt.

De door eene bougie gesteriliseerde vloeistoffen werden òf direkt òf na 24 uur in het donker op eene koele

Onderzoek naar de mogelijke productie van diphtheriegif door de in Tabel I. vermelde, voor cavia's avirulente, bacillen.

Bacil.	Cultuurvloeistof.	Cultuur, oud:	Resultaat der subcutane inspuiting van 2 cM ³ . van het steriele cultuurfiltraat (Chamberland's bougie).
III.	Gistdecoct. MARTIN's mengsel N ^o . II.	5 dagen.	Cavia = 415 G. na 24 uur spoor oedeem; na 48 uur niets.
		5 dagen.	C = 470 G. na 24 uur spoor oedeem; na 48 uur niets.
VII.	Gistdecoct. MARTIN's mengsel N ^o . II.	8 dagen.	C = 470 G. na 24 uur gering oedeem; na 3 dagen niets.
		8 dagen.	C = 500 G. na 24 uur gering oedeem; na 48 uur niets.
VIII.	Gistdecoct. MARTIN's mengsel N ^o . I.	7 dagen.	C = 420 G. na 24 uur gering oedeem; na 48 uur niets.
		7 dagen.	C = 390 G. na 24 uur gering oedeem; na 48 uur niets.
IXa.	Gistdecoct. MARTIN's mengsel N ^o . I.	9 dagen.	C = 370 G. na 24 uur gering oedeem; na 48 uur niets.
		9 dagen.	C = 400 G. na 24 uur gering oedeem; na 48 uur niets.
XI, <i>geele</i>	Gistdecoct. MARTIN's mengsel N ^o . I.	8 dagen.	C = 390 G. na 24 uur gering oedeem; na 48 uur niets.
		8 dagen.	C = 360 G. na 24 uur gering oedeem; na 48 uur niets.
XI, <i>witte m.n.</i>	Gistdecoct. MARTIN's mengsel N ^o . I.	9 dagen.	C = 325 G. na 24 uur spoor oedeem; na 48 uur niets.
		9 dagen.	C = 350 G. na 24 uur spoor oedeem; na 48 uur niets.
XII.	Gistdecoct. MARTIN's mengsel N ^o . I.	9 dagen.	C = 425 G. na 24 uur gering oedeem; na 48 uur spoor oedeem, na 3 dagen niets.
		9 dagen.	C = 390 G. niets.
XVI.	Gistdecoct. MARTIN's mengsel N ^o . III.	9 dagen.	C = 430 G. spoor oedeem; blijft 2 dagen bestaan.
		9 dagen.	C = 410 G. niets.

plaats in gesloten fleschjes bewaard te zijn, ingespoten.

Twee even zware cavia's kregen ieder 2 cM³. subcutaan, de eene gist-cultuurfiltraat, de andere MARTIN-filtraat. De dieren werden vervolgens $\pm$ 14 dagen geobserveerd en gewogen. Bleek na dien tijd het dier geheel normaal te zijn en geregeld in gewicht toe te nemen, dan werd de observatie gestaakt. Echter bleven alle dieren dan nog eenige weken bewaard. De observatietijd was daardoor feitelijk veel langer.

Géén van de met cultuurfiltraten van „pseudodiphtheriebacillen” behandelde dieren is gestorven, of heeft ook maar eenige noemenswaardige pathologische afwijking vertoond. Slechts was na 24 uur meestal een gering oedeem aanwezig. Dit was echter bij de contrôleproef met de zuivere voedingsbodems ook wel het geval. Een spoor van dat oedeem bestond soms ook nog na 48 uur, doch na dien tijd was in geen geval meer iets te zien.

De dieren waren alle volmaakt gezond en namen in gewicht toe. Het blijkt dus, dat op deze wijze de diphtherische aard van een aantal pseudodiphtheriebacillen niet is aan te toonen.

Dit resultaat is eenigszins teleurstellend.

De mogelijkheid bestond, dat, daar vele pseudo-bacillen bij injectie van voldoende doses eene zekere mate van virulentie blijken te bezitten, sommige bacillen in zoo weelderig gegroeide culturen althans eenige giftige bestanddeelen zouden produceeren. Ware dat zoo, dan had, door immuniseering met antidiphtherisch serum, de aard van de gevormde toxine kunnen onderzocht worden. Thans was zoo iets niet mogelijk.

Ik wensch er wel de aandacht op te vestigen, dat

deze proeven, met opzettelijk daarvoor uitgezochte culturen, op zijn eigen en op eenen blijkbaar nog beter geschikten voedingsbodem gegroeid, dus onder de meest gunstige omstandigheden genomen, een van de experimenten van MARTIN zoo geheel afwijkend resultaat geven.

Wij hebben dus nog geen reden om met MARTIN's opvatting mede te gaan, en de meening, dat de zoo veelvuldig voorkomende, onschadelijke corynebacteriën met den bacil van LÖFFLER moeten geïdentificeerd worden, te gaan deelen. Eene verklaring te geven van deze zoo uiteenloopende resultaten, is mij tot mijn leedwezen niet mogelijk. Mijne negatieve uitkomsten hebben wel slechts eene beperkte bewijskracht, maar zij toonen toch aan, dat 't zeer moeilijk is, bacillen op te sporen, die zich als die van MARTIN gedragen.

HOOFDSTUK III.

EEN NIEUW ONDERSCHIED TUSSCHEN DIPHTHERIE- EN „PSEUDODIPHTHERIEBACILLEN.”

De tot nu toe beschreven proeven hadden ten doel, het mij ten dienste staande materiaal volgens door andere experimentatoren aangegeven methoden te onderzoeken. Ofschoon de resultaten, die ik hierbij heb verkregen, niet van belang ontbloot schenen te zijn, achtte ik het toch niet ongewenscht, nog naar nieuwe feiten te zoeken, die mogelijk onze kennis van de bacillen der Coryne-groep zouden kunnen vermeerderen.

Door Würtz ¹⁾ is in 1892 eene methode aangegeven om typhus- en colibacillen van elkander te onderscheiden, die berustte op het door CHANTEMESSE en WIDAL ²⁾ geconstateerde feit, dat een typhusbacil zich niet meer ontwikkelt op agar, waarop een andere typhusbacil langeren tijd heeft gevegeteerd. Colibacillen ontwikkelen zich, volgens Würtz, daarop nog wel.

Agarbuisjes, welke gedurende eenigen tijd, met eene

¹⁾ Arch. d. méd. expérimentale et d'anatomie pathologique 1892 p. 85 en Semaine médicale 1891. p. 491.

²⁾ Arch. de physiologie 1887. Avril.

typhuscultuur begroeid, in de broedstoof hadden gestaan, werden met een platinamesje van hunne cultuur ontdaan, en vervolgens met typhus- en met colibacillen bezaaid. De typhusbacillen groeiden op die afgekrabde buisjes niet, de colibacillen wel.

Op analoge wijze heb ik geëxperimenteerd met corynebacteriën.

Buisjes met gestold LÖFFLER's serum werden met eenen diphtheriebacil bezaaid, eenige dagen in den stoof gelaten, — terwijl ik dagelijks het condensatiewater over de cultuur heen liet stroomen, om te zorgen, dat de geheele oppervlakte bezaaid werd en geen plekje van het serum onbegroeid bleef. Wanneer de voedingsbodem op deze wijze uitgeput, althans voor den groei van diphtheriebacillen ongeschikt gemaakt was, werden de buisjes met eene spatel afgekrabd en daarna nog een of twee dagen in den stoof geplaatst, om te zien of zich nog cultuur ontwikkelde. Daarna legde ik op ieder buisje eene streepcultuur aan van eenen diphtheriebacil en van eenen pseudodiphtheriebacil, naast elkaar. Op deze wijze was de vergelijking zoo zuiver mogelijk.

Het bleek nu, dat de pseudo-bacillen na 1 à 2 dagen bij 35° C. eene vrij goede cultuur gevormd hadden, terwijl de echte diphtheriebacillen zich niet ontwikkeld hadden. Slechts in enkele gevallen bleken de buisjes niet voldoende uitgeput te zijn, zoodat ook een diphtheriecultuur zichtbaar werd.

Hierbij viel op te merken, dat de mate van ontwikkeling der bacillen op de afgekrabde buisjes in geen deele, zooals men geneigd zou zijn te verwachten, in omgekeerde verhouding stond tot de reeds bekende

meerdere of mindere overeenkomst in stofwisseling van de pseudo-bacillen met de echte diphtheriebacillen. Met andere woorden, het bleek niet, dat de zuurproduceerende pseudo-bacillen slechter groeiden op de afgekrabde buisjes, dan de alkali-produceerende. — Integendeel; geen bacil groeide daarop weelderiger, dan B. IXa, ofschoon deze morphologisch en wat de zuurproductie in glucosebouillon betreft, veel meer op een echten diphtheriebacil lijkt, dan de bacillen III, VII, enz.

Echter moet hierbij opgemerkt worden, dat Bacil IXa in het algemeen eene groote groeikracht bezat en bijvoorbeeld gewonen bouillon in 24 uur minstens even sterk troebel maakte, als Bacil III in 2×24 uur. Deze sterkere groei in bouillon is ook eene eigenschap, die B. IXa meer tot de echte diphtheriebacillen doet naderen.

Theoretische waarde, als bewijs voor het soortverschil tusschen diphtherie- en pseudodiphtheriebacillen, kunnen deze waarnemingen, waaruit blijkt, dat er belangrijk verschil bestaat tusschen de stofwisseling van den diphtheriebacil en de pseudo's, zelfs van die, welke glycosebouillon zuur maken, misschien hebben, wanneer door uitgebreide proeven met voedingsbodems door verschillende diphtheriebacillen en verschillende pseudo's uitgeput, dit verschijnsel in zijn geheel omvang bestudeerd is.

Daar deze proeven echter, zoodra men met vele bacillen gaat werken, wegens het groote aantal combinaties zéér omvangrijk worden, heb ik de zaak tot nog toe niet verder kunnen vervolgen.

Praktisch, als diagnosticum, zou deze methode moge-

lijk te gebruiken zijn: Men zou een aantal afgekrabde diphtherieculturen in gereedheid kunnen houden, om bij voorkomende gevallen eenen verdachten bacil daarop naast eenen echten diphtheriebacil uit te zaaien. Na een of twee dagen zou men dan bij weelderigen groei diphtherie kunnen uitsluiten, bij uitblijven van groei kunnen aannemen.

Intusschen zou eerst moeten blijken, dat werkelijk alle pseudo's zich op diphtherie-buisjes ontwikkelen en dat géén diphtheriebacil zulks doet.

Het kleine aantal door mij onderzochte bacillen, laat nog niet toe, dit besluit te trekken.

In *Tabel IV.* zijn eenige proeven, volgens deze methode genomen, vermeld.

Deze proeven zijn genomen op een tijdstip, waarop ik slechts vier virulente diphtherieculturen tot mijne beschikking had.

Eenigen tijd later kwam ik in 't bezit van een tiental andere stammen. Met deze besloot ik deze experimenten nog eens te herhalen, daarbij tevens eene kleine verbetering in de methode aanbrengende. Ik had namelijk de buisjes bij de eerste proeven bezaaid met een weinig cultuur, genomen van 24 uur oude, op LÖFFLER's serum gegroeide, vegetaties. Hierbij is het licht mogelijk, dat eene macroscopisch zichtbare hoeveelheid bacillen wordt overgebracht. Het is dan niet goed te beoordeelen of eenige groei heeft plaats gehad, of niet. Bij de volgende proeven werd daarom uitgezaaid met eene platinanaald, besmet met 24 uur oude bouillonculturen. Hierbij werd nooit eene zichtbare hoeveelheid cultuur overgebracht.

Daar de echte diphtheriebacillen veel sterker in bouil-

Diphtherie- en pseudodiphtheriebacillen, uitgezaaid op door diphtheriebacillen uitgeputte serumbuisjes.

10 Oct. 10 buisjes LÖFFLER's serum bezaaid met bacillus diphtheriae *Utr.* 102.

17 Oct. Afgekrabd.

21 Oct. Bezaaid met andere diphtheriebacillen.

23 Oct. Bezaaid met pseudodiphtheriebacillen.

Resultaat op 25 October.

Buisje N ^o .	Diphtheriebacil.	Pseudodiphtheriebacil.
I.	B. γ niet macrosc. zichtbaar.	B. III. goed zichtb. streepcult.
II.	B. γ dito.	B. XI. <i>w.z.n.</i> goed gegroeid.
III.	B. γ spoor van streepcult.	B. IXa. weelderige groei.
IV.	B. IV. niet macrosc. zichtb.	B. XII. goede groei.
V.	B. IV. dito.	B. XI. <i>w.m.n.</i> goede groei.
VI.	B. IV. spoor van streepcult.	B. IXb. goede groei.
VII.	B. Mei. niet macrosc. zichtb.	B. XI. <i>geele.</i> tamelijke groei.
VIII.	B. Mei. dito.	B. XVI. goede groei.
IX.	B. Mei. dito.	B. VIII. dito.
X.		B. VII. dito.

lon groeien, dan de pseudo's, waren de eerste eenigszins in 't voordeel, — niettemin was het resultaat analoog als bij de vorige proef. *Tabel V.* geeft zulks duidelijk aan.

We zien hier, dat op vier buisjes het resultaat niet aan de verwachting beantwoordde: Op buisje V was een echte diphtheriebacil gegroeid en op buisjes III, IX en X waren pseudodiphtheriebacillen niet opgekomen. Merkwaardiger wijze waren de laatste alle drie van het alcali-produceerende type. Ik vermoedde, dat dit verschil

met de vroeger gedane waarnemingen, aan een of andere fout in de techniek zou liggen. De groei van een enkelen diphtheriebacil (B. Rott. V) kon veroorzaakt zijn door eene toevalliger wijze onvolkomen uitputting van den voedingsbodem, terwijl het niet groeien van de pseudobacillen door te sterke uitdrooging, mogelijk door eene niet ontdekte verontreiniging of eenige andere

Tabel V.

Diphtherie- en pseudodiphtheriebacillen, uitgezaaid op serumbuisjes, uitgeput door diphtheriebacillen.

26 Nov. 10 buisjes LÖFFLER'S serum bezaaid met bacil Utr. 102.

30 Nov. Afgekrabd.

2 Dec. Nog eens afgekrabd.

9 Dec. Nog eens afgekrabd.

10 Dec. Bezaaid met streepculturen uit 24 uur oude bouillonculturen.

Resultaat op 12 December.

Buisje N°.	Diphtheriebacil.	Pseudodiphtheriebacil.
I.	B. Parijs. niet macrosc. zichtb.	B. III. goede cultuur.
II.	B. Rott. I. dito.	B. VII. dito.
III.	B. Rott. II. dito.	B. VIII. niet macrosc. zichtb.
IV.	B. Rott. III. dito.	B. IXa. goede cultuur.
V.	B. Rott. IV. dito.	B. IXb. dito.
VI.	B. Rott. V. goede cultuur.	B. XI. <i>geele</i> goede cultuur.
VII.	B. Rott. VI. niet macr. zichtb.	B. XI. <i>w. m. n.</i> dito.
VIII.	B. Rott. VII. dito.	B. XI. <i>w. z. n.</i> dito.
IX.	B. Rott. VIII. dito.	B. XII. niet macrosc. zichtb.
X.	B. Rott. IX. dito.	B. XVI. dito.

onbekende eigenschap van den voedingsbodem kon veroorzaakt zijn.

De volgende proef werd genomen om zulks op te helderen :

Tabel Va.

4 buisjes bezaaid met B. *Utr.* 102.

2 maal schoongekrabd.

24 Dec. Bezaaid met bouillonculturen 2 × 24 uur oud.

Resultaat op 27 December

Buisje Nº.	Diphtheriebacil.	Pseudodiphtheriebacil.
I.	B. <i>γ.</i> niet gegroeid.	B. VIII. duidelijke cultuur.
II.	B. <i>γ.</i> dito.	B. XI, <i>geele</i> dito.
III.	B. <i>γ.</i> dito.	B. XVI. weelderige groei.
IV.	B. Rott. V. dito.	B. XII. dito.

We zien hieruit, dat de bovenbedoelde afwijkingen ongetwijfeld aan een of ander ongelukkig toeval moeten geweten worden.

HOOFDSTUK IV.

§ 1. AGGLUTINATIE VAN DEN DIPHTHERIEBACIL.

LITERATUUR-OVERZICHT.

Een differentieel-diagnosticum van groote waarde voor de onderscheiding van sterk op elkaar gelijkende bacteriën heeft de nieuwere tijd ons leeren kennen in den specifiekten invloed, die bacteriën van ééne bepaalde soort ondervinden door het bloedserum van dieren, die met microben van die soort zijn geïnfecteerd geworden. CHARRIN en ROGER ¹⁾ hadden reeds in 1889 gezien, dat *B. pyocyaneus* in het serum van dieren, tegen die microbe geïmmuniseerd, op eene eigenaardige wijze groeit.

De culturen waren niet gelijkmatig troebel, doch er vormden zich vlokken, bestaande uit bacteriën, die neiging hadden te bezinken, terwijl de vloeistof overigens helder bleef.

METSCHNIKOFF ²⁾, ISSAEFF en IVANOFF zagen hetzelfde bij andere microben.

¹⁾ Comptes rendus et mémoires d.l. Société de Biologie. 23 Nov. '89.

²⁾ Annales de l'Institut Pasteur. Tome V. 1891. p. 473.; Tome VIII 1894. p. 714—716.; Tome IX 1895. p. 433.

In 1894 ontdekte PFEIFFER ¹⁾, dat cholera-vibrionen, in het peritoneum van geïmmuniseerde cavia's hunne beweeglijkheid verliezen, van vorm veranderen en te gronde gaan.

Hetzelfde gebeurde, wanneer de vibrionen met serum van een geïmmuniseerd dier in de buikholte van een normale cavia te zamen werden gebracht. Deze reactie bleek specifiek genoeg te zijn, om als differentieel-diagnosticum te dienen tusschen de echte choleravibrionen en de verdachte komma-bacillen, wier herkenning in verschillende media reeds zoo vaak groote moeilijkheden had gebaard.

Hoofdzakelijk door GRUBER en DURHAM ²⁾ is bekend geworden, dat men dezelfde methode van diagnostiek der bacteriën op veel eenvoudiger wijze kan toepassen door experimenten in vitro. Men ziet, wanneer men een specifiek immuunserum van voldoende sterkte in kleine hoeveelheid bij eene homogene suspensie van de betrokken bacillen voegt, dat de van te voren geïsoleerde microben tot hoopjes samenklonteren en naar den bodem zakken, zoodat de vloeistof helder wordt.

Voor al choleravibrionen en typhusbacillen kunnen op deze wijze van verwante vormen onderscheiden worden met eene zekerheid, zoo groot als geene andere methode toelaat.

¹⁾ PFEIFFER. Zeitschrift f. Hygiene und Infectiouskrankheiten 1894. Bd. XVIII. pag. 1.; 1895. Bd. XIX. p. 194 enz.

PFEIFFER u. KOLLE. Z. f. Hyg. u. Inf. 1896. Bd. XXI. p. 203.

²⁾ Munch. medic. Wochenschr. 1895, Bd. V. n^o. 14.

Wiener klin. Wochenschr. 1896, Febr.; Congres te Wiesbaden '96

GRUBER u. DURHAM. Munch. med. Woch. Maart, 1896.

DURHAM. Journal of Pathol. and Bacteriology. Juli 1896. Vol. IV. p. 13.

Even typisch als de hoopjesvorming, ziet men daarbij de immobilisatie der bacteriën optreden. Hieraan werd dan ook zóó groot gewicht gehecht, dat meermalen twijfel is uitgesproken, of bij niet-beweeglijke vormen deze verschijnselen wel ooit veel beteekenis zouden hebben. Intusschen bleek spoedig van verschillende zijden, dat de agglutinatie, mocht het phenomeen der immobilisatie daarbij ook in den steek laten, ook met onbeweeglijke vormen was teweeg te brengen.

Strepto- en staphylococcen, pneumococcen, de bacil van FRIEDLÄNDER bleken geagglutineerd te kunnen worden; evenzoo de tuberkelbacil.

Van groot belang is dit alles ook voor de kliniek reeds gebleken, daar WIDAL ¹⁾ leerde deze specifieke reactie als diagnosticum van typhus bij den mensch te gebruiken, eene wijze van handelen, die ook bij cholera en andere ziekten belangrijke resultaten belooft te geven.

Daarentegen heeft bij de onbeweeglijke microörganismen de diagnostiek der bacteriën tot nu toe geen voordeel uit deze nieuwe ontdekkingen getrokken.

Voornamelijk zou hier de differentieel-diagnose der corynebacteriën in aanmerking komen. Het heeft dan ook niet aan pogingen ontbroken, om in deze richting iets te bereiken. Zoo deelde NICOLAS ²⁾ mede, dat de diphtheriebacil in het serum van BEHRING eene belemmering in zijnen groei ondergaat en daarin zelfs na twee

¹⁾ Soc. de Biologie 26 Juni 1896. en latere mededeelingen.
Zie Sem. médicale, passim.

²⁾ Comptes Rendus de l. Soc. de Biol. 30 Nov. 1895. p. 763.

of drie generaties geheel afsterft. Tevens zou de virulentie van den bacil daarin aanmerkelijk afnemen. Als differentieel-diagnosticum tegenover de pseudodiphtheriebacillen heeft hij dit echter niet gebruikt, vermoedelijk omdat hij het unitarische standpunt der *Fransche* school inneemt.

DE MARTINI ¹⁾ deed dit wel. Hij vermeldt dat virulente diphtheriebacillen in antidiphtherisch serum niet groeiden, terwijl van twee avirulente vormen de eene, een zuurproduceerende, zulks ook niet, de andere, een alcalivormende, het wel deed.

Hij besluit daaruit, dat de eerste als gedegenerende diphtheriebacil moet beschouwd worden, de laatste tot eene andere soort behoort.

In eene tweede mededeeling gaf NICOLAS ²⁾ aan, dat de diphtheriebacil volgens de methode van GRUBER en DURHAM tot agglutinatie is te brengen door middel van antidiphtherisch serum, in verhouding van 3 druppels op 1 cM³. cultuur.

Hij zag de bacillen in eenige minuten of na 1½ à 2 uur samenklonteren en praecipiteeren.

Bij uitzaaiing in met geringe hoeveelheden serum gemengden bouillon, groeiden ze ook in hoopjes.

Ongelukkigigerwijze kwam reeds spoedig tegenspraak.

C. FRÄNKEL ³⁾ en SPRONCK ⁴⁾ deelden mede, dat de bactericide werking van het serum en de eigenaardige

¹⁾ Centralblatt f. Bakteriologie. 1897, Bd. XXI p. 87.

²⁾ Comptes rendus d.l. Soc. d. Biologie 25 Juli, 1896, pag. 817.

³⁾ Hygiënische Rundschau. 1896.

⁴⁾ Sem. méd. 1897, n^o. 45, p. 353.

belemmering in groei geenszins constant optraden. Ik zelf heb ook met zeer sterk antidiphtherisch serum bij herhaald onderzoek, nooit agglutinatie van diphtheriebacillen verkregen. Hetzelfde meldt STEENMEIJER ¹⁾.

Nu is het serum antidiphthericum niet geheel gelijk te stellen met de sera, door PFEIFFER en GRUBER voor hunne proeven gebruikt. De immuunsera voor cholera en typhus worden verkregen door injectie bij dieren van geheele culturen. GRUBER schreef dan ook het optreden der agglutineerende stoffen toe aan de injectie der bacterielichamen zelve. Eerst lang na de eerste proeven van NICOLAS is door WIDAL en SICARD ²⁾, LEVY en BRUNS ³⁾, en RODET ⁴⁾ bekend geworden, dat ook gefiltreerde culturen het agglutineerend vermogen aan het serum der daarmede behandelde dieren mededeelen.

LANDSTEINER ⁵⁾ paste de gewone methode van zijnen leermeester GRUBER toe. Hij spoot groote hoeveelheden gesteriliseerde diphtherieculturen in. Het gelukte hem echter niet, op deze wijze een serum te verkrijgen, dat op den diphtheriebacil een specifieke invloed uitoefende.

NICOLLE ⁶⁾ beproefde het op dezelfde wijze. Hij werkte vooreerst met volledige culturen, verder met cultuurfiltraten (toxinen) en ten derde met uitgewasschen bacillen, in bouillon gesuspendeerd.

¹⁾ Dissertatie. Utrecht. 1897.

²⁾ Annales de l'Inst. Pasteur, 1897, 25 Mai.

³⁾ Berl. Klin. Wochenschrift. 1897, n^o. 23, pag. 491.

⁴⁾ Société de Biologie, 16 Juli, 1898,

⁵⁾ Wiener Klin. Wochenschr. 1897. pag. 439.

⁶⁾ Annales de l'Inst. Pasteur. 1898. 25 Mars. pag. 161.

Daar de proefdieren (konijnen) deze hoogst giftige stoffen anders niet verdroegen, verhitte hij de toxinen tot 65° , de bacillen tot 60° . Verder heeft hij ratten, die refractair tegen diphtherie zijn, met verhitte en niet verhitte toxine en met verhitte bacillensuspensies behandeld.

Nadat hij dit 3 maanden had voortgezet, had hij nog geen agglutineerend vermogen van de sera verkregen, niettegenstaande de dieren eene hooge mate van resistentie vertoonden.

Eveneens kon hij bevestigen, dat twee antidiphtherische sera van verschillende herkomst niet agglutineerden. Hij meent dan ook te mogen zeggen:

„Le phénomène de l'agglutination n'est donc point „un phénomène constant. Un certain nombre de preuves „en ont été déjà apportées. Nous en donnerons deux „nouveaux exemples.” Deze voorbeelden zijn dan de diphtheriebacil en de bacil van FRIEDLÄNDER. De laatste is echter door LANDSTEINER tot agglutinatatie gebracht. Hoe het met den diphtheriebacil staat, zal uit de volgende bladzijden blijken.

Naar aanleiding van deze publicatie van NICOLLE, berichtte NICOLAS ¹⁾, dat hij, experimenteerende met een twaalfstal diphtheriebacillen, had gezien, dat er daarvan 6 agglutineerden met antidiphtherisch serum in verdunning van 1: 20, en 6 andere niet. NICOLAS heeft ook gemeld, dat hij bij dieren, geïnfecteerd met, en bij patiënten, lijdende aan diphtherie, geen agglutinatatie heeft zien optreden. Hij zegt dan ook, dat

¹⁾ Comptes rendus d. l. Soc. de Biologie, 4 Juni, 1898.

men niet kan spreken van eene serodiagnostiek van de diphtherie.

Wel zag hij ¹⁾ agglutineerend vermogen optreden in het bloed van diphtheriepatiëntjes, die met antidiphtherisch serum behandeld waren.

Een à twee dagen na de injectie kwam het daar voor den dag, zeer duidelijk ten opzichte van culturen, die in ontwikkeling verkeerden, d. w. z. bij enting van een mengsel van serum en bouillon met den bacil, zwak bij directe inwerking op eene ontwikkelde cultuur. Na korten tijd bleek het echter reeds weer verdwenen (15 dagen à 1 maand). Deze waarnemingen liepen echter slechts over een paar gevallen.

Men moet hierbij in aanmerking nemen, dat NICOLAS een immuunserum tot zijn beschikking heeft, dat zelf agglutineerend werkt. De agglutinatie door het bloed der daarmede behandelde patiënten, zou dus veroorzaakt kunnen zijn door dit serum, dat in verdunnen toestand in het organisme der patiënten nog eenigen tijd aanwezig blijft.

Toen mijne eigen, straks te beschrijven onderzoeken over dit onderwerp reeds grootendeels waren afgelopen, maakte ik kennis met eene belangrijke publicatie van Dr. JAMES BRUNO ²⁾.

Deze bevestigt de resultaten van NICOLAS, wat betreft de agglutinatie met antidiphtherisch serum. Van drie stammen werden er twee door opgelost Höchster „Trockenserum” in verdunning van 1 : 10 geagglutineerd, de derde niet.

¹⁾ Comptes rendus, 30 Januari. 1897.

²⁾ Berliner Klinische Wochenschrift, 1898, 19 Dec. p. 1127.

Verder vond hij in tegenstelling met NICOLAS in enkele gevallen agglutinatie in vrij hooge verdunningen (eens $> 1 : 100$) bij patiënten, lijdende aan diphtherie en nog niet met serum behandeld.

Een groot aantal met serum behandelde patiënten leverden sterk werkende sera; enkele gaven een totaal negatief resultaat.

Enkele proeven, die hij deed om den invloed van de seruminjecties in dezen te onderzoeken, gaven bij dieren negatief, bij twee menschen een tamelijk zwak positief resultaat.

§ 2. ONDERZOEK OVER DE DIPHTHERIE-AGGLUTININE.

Toen ik mijne experimenten nam, behoorde het bezit van een sterk specifiek agglutineerend serum voor den diphtheriebacil nog steeds tot de pia desiderata.

Daarom besloot ik in deze richting iets te beproeven, in de hoop een zóó sterk serum te kunnen verkrijgen, dat de differentiëel- diagnose der diphtheriebacillen daarmee mogelijk zou zijn.

Ik meende daarbij, zooveel doenlijk, alle oorzaken van mislukking uit te sluiten, door eenvoudig in te spuiten met levende versche culturen. Ik zag echter, dat een konijn slechts zeer kleine doses daarvan verdroeg en dan nog met vrij ernstige, algemeene symptomen en locale necrose reageerde. Niettemin moesten er groote doses bacillen ingespoten worden, om met zekerheid te kunnen constateeren of agglutinatie op deze wijze te verkrijgen was, ja of neen.

Door de culturen te verhitten zou misschien een factor ingevoerd worden, die het succes juist onmogelijk maakte, zooals de proeven van LANDSTEINER en NICOLLE zouden kunnen doen vermoeden.

Daarom kwam ik, daarbij eenigszins geleid door de mededeelingen van NICOLAS, op de gedachte de dieren te immuniseeren met antidiphtherisch serum, en dan groote doses cultuur in te spuiten, die aldus zonder bezwaar zouden worden verdragen.

De uitkomst overtrof mijne verwachtingen.

Een konijn, dat vooraf of tegelijk eenige cM³. antidiphtherisch serum kreeg, bleek enorme doses diphtherie-cultuur te verdragen. Daarbij trad na eenige dagen

een hoog agglutineerend vermogen van het bloed-serum op.

De gebezigde bacil, *Utr. γ*. vóór ongeveer een half jaar geïsoleerd, was sterk virulent en toxigeen, en had het groote voordeel, gemakkelijk homogeen-troebele bouillonculturen te geven. Deze eigenschap deed hem door mij verkiezen om het agglutineerend vermogen van sera te bepalen.

Bij het verrichten van een zoo groot aantal quantitative bepalingen van het agglutineerend vermogen van verschillende bloedsera, als ik in den loop van deze onderzoekingen heb moeten doen, was het van veel belang, eene eenvoudige methode te hebben, waarmede snel en zeker kon gewerkt worden.

Als eene zoodanige heb ik daarbij leeren waardeeren eene wijze van handelen, die mij door professor SPRONCK werd aangeraden, en die bij dergelijke experimenten goede diensten had bewezen.

Hierbij gaat men als volgt te werk:

Voor twee PRAVAZ' spuitjes worden naalden uitgekozen, die bij loodrecht omlaag gericht stand, druppels van hetzelfde volumen leveren, wanneer men dezelfde vloeistof daaruit laat druppelen. De aldus gearmeerde spuitjes zijn zeer geschikt om daarmede snel en nauwkeurig de noodige verdunningen van het serum te maken.

Hiertoe vermengt men in horlogeglazen een of meer druppels serum met het noodige aantal druppels bouillon, in verhouding van 1:1, 1:2, 1:4, 1:9 enz., waardoor men 2 maal, 3 maal, 5 maal, 10 maal, enz. verdunde serumoplossingen verkrijgt. Van deze oplossingen

wordt één druppel met 9 druppels van de cultuur vermengd. Dit geschiedt in groote uitgeholde objectglazen, die daarna met dekglazen worden afgesloten, om verdamping te voorkomen. Gedurende een half uur, of zooveel langer als men dat wenscht, worden de aldus gemaakte praeparaten bij kamertemperatuur geobserveerd, zoowel macroscopisch, als microscopisch. Het laatste geschiedt bij zwakke vergrooting. (LEITZ Obj. 3. Oc. I).

Contrôlepraeparaten, bestaande uit 10 dr. cultuur of uit 9 druppels cultuur + 1 dr. normaal serum, mogen niet ontbreken, daar het soms voorkomt, dat in de diphtherieculturen spontaan eenige agglutinatie optreedt. Valt de agglutinatieproef positief uit, dan ziet men na langer of korter tijd macroscopisch zichtbare fijne korreltjes in de oorspronkelijk homogeen-troebele vloeistof ontstaan, die naar den bodem van het uitgeholde glas zakken. Bij sterk uitgesproken reactie treden vaak min of meer straalsgewijze gerangschikte, veervormige vlokken op.

De tijd, die voor het ontstaan der reactie noodig is, bedraagt minstens eenige minuten. Het sterkste serum, dat ik tot mijne beschikking heb gehad, agglutineerde in verdunning van 1 : 1000 in 30 minuten, in verdunning van 1 : 100 in 7 minuten.

Eene totale clarificatie van de vloeistof treedt echter meestal niet op. Enkele bacillen blijven steeds in suspensie. Toch is het verschil met de contrôleproeven uiterst manifest.

Hier ziet men wel, vooral bij langer waarnemingstijd en 't sterkst als de cultuur intensief troebel was, een gedeeltelijk uitzakken der bacillen, zoodat de bodem

van het glas met eene gelijkmatige laag bedekt wordt, doch macroscopisch zichtbare korrels komen niet voor den dag.

Bij microscopische waarneming is het mogelijk, nog veel scherper grens te trekken tusschen positieve en negatieve reactie. Men kan dan ook kleine vlokjes nog onderkennen, zwevende in de vloeistof, die grootendeels vrij van bacillen is geworden, terwijl in het contrôlepraeparaat de groote massa der bacillen gesuspendeerd is gebleven en de bodem met eene gelijkmatige laag uitgezakte bacillen bedekt is.

Als bacillen-suspensie werd steeds eene 20-24 uur oude bouilloncultuur gebruikt. Kunstmatige emulsies van culturen op vasten voedingsbodem waren minder bruikbaar. Wel komt het vaak voor, dat ook de bouillonculturen te veel vlokken bevatten; door de groeiende culturen herhaaldelijk krachtig te schudden, gelukt het echter de een of andere maal toch wel van elken bacil eene bruikbare cultuur te verkrijgen. Zoo noodig kan men door centrifugeeren de emulsie van vlokken zuiveren.

Een vijftal stammen leverden bijna altijd goede homogene culturen. Dit waren de bacillen Utr. Mei, Utr. γ , Utr. IV, Parijs en Utr. 102, die langen tijd, $\frac{1}{2}$ tot 4 jaar, op kunstmatige voedingsbodems waren voortgekweekt.

De tien andere stammen, waarvan negen uit Rotterdam en één uit Bergen op Zoom afkomstig, waren van veel recenter datum. Deze gaven niet zoo gemakkelijk homogene culturen. Een herhaald overzetten in bouillon bleek hier, zooals ook BRUNO ¹⁾ aangeeft, nuttig te werken.

¹⁾ B. K. W. 1898. 19 Dec.

Het is moeilijk geheel geïsoleerde bacillen te verkrijgen. De corynebacteriën hebben groote neiging in kleine groepjes aan elkaar te blijven hangen. Deze omstandigheid hindert echter volstrekt niet bij de microscopische observatie met zwakke vergrooting. De kleine groepjes bacillen in de normale culturen doen zich daarbij als goed zichtbare zwarte puntjes voor, die homogeen door de vloeistof verspreid zijn. Treedt nu agglutinatatie op, dan vereenigen zich een groot aantal dier puntjes tot groote korrels, die macroscopisch als een fijn stof imponeeren, microscopisch als groote vlokken.

Een groot voordeel van deze methode is, dat zij snel werken toelaat.

Wanneer na 30 minuten geen agglutinatatie optrad, dan werd het resultaat doorgaans als negatief beschouwd. Eenige malen zag men dan soms na 40 of 50 minuten nog een spoor van positieve reactie verschijnen; — doch bij het vergelijkenderwijs bepalen van de sterkte van verschillende sera en verschillende bacillen, is er natuurlijk geen bezwaar in, deze willekeurige grens van waarnemingsduur te trekken. De sterkte van een serum werd dus bepaald door de hoogste verdunning, waarin het nog in staat was, binnen 30 min. een bepaalden bacil te doen agglutineeren.

Zoo had bijvoorbeeld het serum van konijn n°. II op 24 October een sterkte van 1 : 1000 voor bac. γ. (Zie Tabel VII).

Waar het gold uit te maken, of een bacil absoluut niet geagglutineerd wordt, werd de observatietijd langer genomen.

Zonder twijfel kleven ook aan deze methode, zooals

trouwens aan elke andere, verschillende fouten, waardoor de quantitatieve bepalingen niet geheel betrouwbaar zijn.

KÜHNAU ¹⁾ noemt eenige factoren op, die hier ook in aanmerking komen.

Zoo is bijvoorbeeld eene belangrijke inconstante grootheid, de graad van troebelheid der gebruikte culturen.

Deze is ongetwijfeld voor verschillende bacillen en zelfs voor denzelfden bacil verschillend. Ze zal o. a. afhangen van de groeikracht van den bacil en van de hoeveelheid cultuur, waarmede de bouillon bezaaid is. Waar deze onmogelijk steeds gelijk kunnen zijn, zal de concentratie der cultuur noodzakelijkerwijze moeten variëeren. Deze variaties zijn slechts, en dan nog maar gebrekkig, te ondervangen door kunstmatige emulsies van culturen op vaste voedingsbodems te gebruiken. Dit is echter voor den diphtheriebacil onpraktisch.

Eene constante fout is voorts een gevolg van het feit, dat een druppel serum niet precies even groot is, als een druppel bouillon, of als een druppel cultuur. Deze is echter bij alle proeven in dezelfde richting werkzaam. Ze stoort dus bij vergelijkende proeven niet.

De schommelingen in de kamertemperatuur hebben waarschijnlijk ook invloed. Op dagen, waarop de temperatuur hooger is, zou men ceteris paribus hogere cijfers van het agglutineerend vermogen der onderzochte sera kunnen krijgen.

¹⁾ Berl. Klin. Woch. 1897, n^o. 19, p. 397.

Bij het observeeren der proeven, moeten de glaasjes herhaaldelijk onder den microscoop gelegd en weder daaronder uit genomen worden. Deze bewegingen bevorderen vaak het optreden van de agglutinatie. Het is dus zaak, dit zooveel mogelijk met alle proeven op dezelfde wijze te doen en in 't geheel zoo weinig mogelijk te schokken.

Ik heb beproefd, door met iedere proef een gelijk aantal malen opzettelijk groote schommelingen uit te voeren, den invloed der kleine, ongewenschte bewegingen tot een verwaarloosbaar minimum te reduceeren. Dit bleek echter bij diphtherieculturen van tijd tot tijd de proef onduidelijk te maken. Het is gewenscht, de diphtherieproeven zoo rustig mogelijk te laten staan.

Bij agglutinatieproeven met pseudodiphtheriebacillen zijn opzettelijke schommelingen niet ongunstig. Deze bacillen hebben weinig neiging tot pseudoagglutinatie, en zakken ook minder snel uit, als ze niet geagglutineerd worden. Ze vormden steeds fraai homogene culturen.

Dat, bij nauwkeurige bepalingen, op de grens tusschen positief en negatief resultaat eene zekere mate van willekeur onvermijdelijk is, die aanleiding kan geven tot eene fout in het eindijfer, waarvan de grootte afhangt van de objectiviteit van den waarnemer, behoeft geen betoog.

Dit alles in aanmerking nemende, kan men tot eene zuiveré beoordeeling der gegevens, in navolgende tabellen geregistreerd, komen.

Opgemerkt moet nog worden, dat ik zelden met sterkere concentraties werkte, dan 1:10 (= 1 dr.

serum op 9 dr. cultuur); viel de uitkomst negatief uit, dan werd echter nog wel eens 1: 4 beproefd.

De gewone microscopische methode van waarneming in den hangenden druppel bij sterke vergrooting, is door mij ook eenige malen beproefd. Hierbij was het verschijnsel der agglutinatie ook fraai te zien. Ik vond echter geen aanleiding daarom van de boven beschreven gecombineerde methode of te wijken.

Het serum van konijnen werd verkregen door punctie van de randvena van het oor met een PRAVAZ' naald van zóó gekozen kaliber, dat hij gemakkelijk in die ader kon worden gestoken, nadat deze door elastische omsnoering van het oor tot zwellen gebracht was. Het aldus onder aseptische cautelen opgevangen bloed leverde den volgende dag het serum, dat werd afgeschonken en gecentrifugeerd. Bloed van cavia's verkreeg ik door de dieren uit de carotiden te laten verbloeden.

In *Tabel n^o. VI.* vindt men de eerste proef, die met injectie van serum en cultuur bij een konijn genomen is, in bijzonderheden beschreven.

Aldus was gebleken, dat het mogelijk was een sterk agglutineerend diphtherieserum te verkrijgen.

Intusschen was met de injectie van antidiphtherisch serum nevens de cultuur, een vreemde factor ingevoerd, waarvan de beteekenis diende te worden nagegaan.

Het serum, afkomstig van het Bacterio-therapeutisch Instituut te Utrecht, wordt verkregen door paarden in te spuiten met toxine van eenen bacil, die, sedert 1894 in het laboratorium voortgekweekt, uitmunt door sterke toxineproductie. (*Bacil: Utrecht 102*).

De culturen, gegroeid op gistdecoct, worden gefiltreerd

door papier en met 0,3 % carbol gesteriliseerd. Het is dus mogelijk, dat de paarden eene, zij 't ook ongetwijfeld zeer geringe hoeveelheid doode bacteriën met de toxine mee ontvangen; niettemin agglutineerde het antidiphtherisch serum, herhaaldelijk onderzocht met een drietal bacillen ¹⁾, nooit. Het bloed wordt 11 dagen na de laatste toxineinjectie afgetapt en het serum tot 58° à 59° verhit ²⁾.

Om nu te zien of de agglutineerende werking, die het serum van het konijn door injectie van bacillen + serum verkregen had, aan de cultuur alléén mocht toegeschreven worden, spoot ik bij een tweede konijn groote doses antidiphtherisch serum onder de huid. Het dier kreeg telkens 10 cM³.

Merkwaardigerwijze trad nu ook bij dit dier een sterk agglutineerend vermogen eenige dagen na de eerste injectie op.

De sterkte van het serum steeg hier na eenige injecties spoedig tot 1:1000 en meer. (Zie *Tabel VII.*) Het blijkt dus nog niet, dat de cultuurinspuiting zelf tot het agglutineerend vermogen van het serum heeft bijgedragen.

Een derde dier kreeg op dezelfde wijze een groot aantal injecties met normaal paardenserum. Dit dier vertoonde nooit enig agglutineerend vermogen ten opzichte van eenen diphtheriebacil.

Bij een tweetal andere konijnen, die ook met serum antidiphthericum behandeld werden, trad eveneens

¹⁾ Dit waren de Bacillen *Utr.* 102; *Utr.* Mei, en *Utr.* γ.

²⁾ Bijzonderheden over de toxine en serum-bereidingen vindt men in het *Tijdschr. voor Geneeskunde*, 1898. I, n^o. 17 en 18, en *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898, 25 Oct.

agglutinatie op. Hier bereikte het serum echter geen hoogere sterkte dan 1 : 40. (Zie *Tabel VIII* en *IX*), terwijl na eenigen tijd het agglutineerend vermogen geheel verdween en met nieuwe seruminspuitingen niet meer kon worden opgewekt. Het scheen hier alsof een toestand van uitputting van het organisme was ingetreden, waarbij het vermogen om agglutineerende stof te produceeren, was verloren gegaan.

In *Tabel VII*, Konijn n^o. II, ziet men ook eene daling optreden, niettegenstaande herhaalde injecties. Ongelukkigerwijze stierf dit dier echter onverwacht, zoodat ik niet heb kunnen nagaan, of ook daar misschien de eigenschap om op seruminjectie met de vorming van agglutinine te reageeren spontaan zou verdwijnen. Eénige andere konijnen, eveneens met grootere of kleinere doses serum behandeld, gaven slechts een betrekkelijk laag en korten tijd durend agglutinatievermogen.

Belangrijk was hierbij, dat twee dieren, vóór zij in behandeling genomen werden, bleken een in verdunning van 1 : 40 agglutineerend serum te leveren.

Bij de andere agglutineerde het serum vóór de behandeling met diphtheriebacillen niet, doch trad het agglutineerend vermogen eerst na de injectie op.

Het is mij tot nu toe niet gelukt, eene verklaring te vinden voor het uiteenloopen der resultaten, met verschillende konijnen verkregen.

Het serum, bij de verschillende dieren gebruikt, stamde van verschillende paarden, welke echter alle op dezelfde wijze behandeld waren. Het was ook, wat zijn immuniseerend vermogen betreft, steeds van ongeveer gelijke sterkte.

De konijnen waren, op twee na, van gelijke afstamming. We moeten ons dus voorloopig er toe bepalen, te constateeren, dat er individueele verschillen in 't spel zijn.

We zouden ons de zaak aldus kunnen voorstellen:

Daar de diphtherie-agglutinine eene stof schijnt te zijn, die in specifieke betrekking staat tot den diphtheriebacil, is het niet waarschijnlijk, dat zij in het organisme van het proefdier reeds gepraeformeerd, zij 't dan ook in eenen onwerkzamen vorm voorkomt. Meer waarschijnlijk is, dat in het diphtherieserum eene specifieke stof bestaat, die echter zelf niet agglutineerend werkt.

Deze stof, die men „Agglutininogeen” zou kunnen noemen, moet echter om actief te worden, in het lichaam van een proefdier eene modificatie ondergaan. Deze modificatie zou kunnen zijn eene scheikundige ontleding of omzetting, — of misschien eerder eene verbinding met eene andere, in het lichaam van het dier aanwezige, niet specifieke stof. Indien nu deze laatste stof uitgeput raakt, of het vermogen van het organisme om de gedachte chemische omzetting of ontleding tot stand te brengen, door een vermoeiingsproces of op andere wijze verloren gaat, dan zou het konijnenserum de agglutineerende werking verliezen, niettegenstaande door herhaalde seruminjecties het „agglutininogeen” in voldoende hoeveelheid aangevoerd wordt.

Bij het gebruik van het woord „agglutininogeen” denk ik aan de onwerkzame zymogenen waarvan de physiologische scheikunde spreekt, die gemakkelijk in de werkzame enzymen overgaan.

De vraag doet zich voor, of en in hoeverre de agglu-

tineerende stof, die door subcutane injectie van antidiphtherisch paardenserum in het bloed van proefdieren optreedt, voor analoog is te houden met de agglutinenen, welke door injectie van bacteriën van verschillende soort ontstaan.

Het is bekend, en boven reeds in herinnering gebracht, dat, met deze waarschijnlijk overeenkomende, agglutinenen ook kunnen optreden door injectie van filtraten van culturen, welke van de bacillen zelf geheel bevrijd zijn.

Bij diphtherie-immunisatie blijkt echter de injectie bij dieren van (verhitte) culturen géén agglutinine te doen ontstaan. Evenmin treedt in de meeste gevallen eene dergelijke stof op bij injectie van cultuurfiltraten. Dit is door de proeven met antidiphtherisch paardenserum gebleken. Daarentegen wordt eene agglutineerende stof onder omstandigheden manifest, wanneer dit serum bij verse dieren wordt ingespoten.

We zien dus in de genese een zeer merkwaardig onderscheid.

Eene zekere mate van overeenkomst schijnt echter te bestaan.

GRUBER ¹⁾ meldt, dat zelfs na injectie van kolossale hoeveelheden cultuur meerdere dagen verloop, voor de agglutinatie optreedt.

LEVY en BRUNS ²⁾ zagen na injectie van culturen na 5 dagen, na injectie van filtraten na 3½ dag het agglutineerend vermogen voor den dag komen.

¹⁾ Munch. Med. Wochensch. 1897, pag. 480.

²⁾ Berl. Klin. Woch. 1897, n^o. 23, pag. 491.

CHANTEMESSE ¹⁾ spreekt van 5 dagen.

Het scheen LEVY en BRUNS toe, dat de reactie dan niet langzaam stijgend, doch in eens sterk optrad. Wanneer men in mijne tabellen de gevolgen van de eerste seruminjectie nagaat, dan ziet men dat in dezen eene belangrijke analogie niet is te miskennen.

Het is bekend, dat GRUBER een eng verband aanneemt tusschen agglutinatie en immuniteit, eene opvatting, die door PFEIFFER met kracht bestreden is. Misschien zouden verdere onderzoekingen over de wijze, waarop de diphtherie-agglutinatie tot stand komt, en de omstandigheden, waaronder zij uitblijft, in deze quaestie nog nieuw licht kunnen geven. Hierbij zij in herinnering gebracht, dat door VAN DE VELDE ²⁾ is gevonden, dat behalve de gift-immuniteit, ook eene bacterie-immuniteit tegen diphtherie door de inspuiting van sterke sera ontstaat. Daarmede is het verband tusschen de serumwerking bij diphtherie en de immuniteitsprocessen bij cholera en typhus tot zekere hoogte aangetoond.

¹⁾ Soc. méd. des Hôpitaux, 1897.

²⁾ Centralbl. f. Bakt. XXII. 1897, pag. 527.

§ 3. VERGELIJKEND ONDERZOEK NAAR DEN INVLOED
VAN VOOR DEN DIPHThERIEBACIL SPECIFIEKE SERA OP
DIPHThERIE- EN PSEUDODIPHThERIEBACILLEN.

Het voornaamste doel, dat ik met het zoeken naar een sterk agglutineerend serum beoogde, was de diagnostiek der corynebacteriën te vergemakkelijken. Zooals uit het hooger medegedeelde reeds is op te maken, zijn de eischen van de praktijk in dit opzicht nog niet bevredigd.

De clinicus, die voor een verdacht geval geplaatst wordt, kan niet wachten op dier-experimenten, de hygiënist-ambtenaar moet zoo spoedig mogelijk weten, wat hem te doen staat.

De boven door mij aangegeven methode van onderscheiding met afgekrabde diphtherieculturen, vraagt ook, behalve den voor reinkweeking noodigen tijd, nog minstens een of twee dagen om het resultaat van de cultuurproef te kunnen beoordeelen. De agglutinatieproef zou althans 24 uur op de infectieproef doen winnen, wanneer men zorg droeg, een bruikbaar serum steeds ter beschikking te houden. Zij is eenvoudig, gemakkelijk en er scheen kans te bestaan op een ondubbelzinnig resultaat.

Jammer genoeg, is mij gebleken, dat bij diphtherie de zaak lang niet zoo eenvoudig is, als bij typhus en cholera, en dat zelfs het bezit van sterk agglutineerende sera, voor de diagnostiek nog slechts beperkte waarde heeft.

Met de sterke sera der beide eerste konijnen kon ik slechts een vijftal diphtheriebacillen onderzoeken. Eenige weken later echter, beschikte ik over een tiental andere culturen. Toevalligerwijze was toen geen serum van hoge potentie aanwezig en leverden de konijnen, die ik in behandeling nam, ook geen serum van meer dan 1 : 40 sterkte op.

Ik besloot daarom eenige cavia's in behandeling te nemen.

Door voorafgaande proeven kon ik constateeren, dat het bloed van deze dieren normaliter den diphtheriebacil niet, althans niet vaak agglutineert.

Ofschoon het effect der seruminjecties ook hier niet constant was, kreeg ik van cavia's bruikbare sera, zonder te veel dieren te moeten opofferen.

Voor zoover uit een elftal proeven is af te leiden, schijnt de beste methode te zijn, groote doses serum in eens in te spuiten.

Een enkele maal gaf een herhaling van een groote dosis nog beter resultaat. (Zie *Tabel XIII*).

Men ziet uit *Tabel XI* en *XII*, dat een enkele inspuiting van 2 of 4 cM³. antidiphtherisch serum na 5 dagen een agglutineerend vermogen t. o. v. *Bac. Utr.* 102 doet ontstaan van meer dan 1 : 100, terwijl een herhaalde inspuiting van 4 cM³. in één geval de sterkte van het serum deed stijgen tot 1 : 360.

Dagelijksche inspuitingen van kleine doses (0,1-0,2 cM³.) gedurende 8 of 10 dagen, gaven slechts zwak agglutineerende sera (1 : 10 tot 1 : 40). In eenige gevallen gaven ook injecties van 1 cM³. geen hooger resultaat dan 1 : 10, ook niet bij herhaling met tusschenpoozen

Tabel X.

Overzicht van de onderzochte diphtherieculturen.

Naam der cultuur.	Plaats van herkomst.	Tijdstip van Isolering.	Virulentie: Cavia sterft na ¹⁾
Utr. 102.	Utrecht.	1894.	40 uur.
Utr. γ.	Utrecht.	Mei 1898.	40 uur.
Utr. Mei.	Utrecht.	Mei 1898.	40 uur.
Utr. IV.	Utrecht.	Juni 1898.	40 uur.
Parijs.	Parijs.	vóór Aug. 1898.	40 uur.
Rott. I.	Rotterdam.	October 1898.	40 uur.
Rott. II.	Rotterdam.	October 1898.	40 uur.
Rott. III.	Rotterdam.	October 1898.	48 uur.
Rott. IV.	Rotterdam.	October 1898.	40 uur.
Rott. V.	Rotterdam.	October 1898.	40 uur.
Rott. VI.	Rotterdam.	October 1898.	40 uur.
Rott. VII.	Rotterdam.	November 1898.	drie dagen.
Rott. VIII.	Rotterdam.	November 1898.	vier dagen.
Rott. IX.	Rotterdam.	November 1898.	24 uur.
Bergen op Zoom I.	Bergen op Zoom.	November 1898.	zes dagen.

van 5 à 6 dagen. Met drie verschillende sera, die voor B. *Utr.* 102, welke voor de bereiding van het serum antidiphthericum gediend had, van een sterkte van 1 : 100 of meer waren, konden nu 15 stammen van diphtheriebacillen en 10 van „pseudodiphtheriebacillen” onderzocht worden.

Verder waren met de sterkere konijnsersa reeds vroeger eenige proeven gedaan, welke het niet ondienstig

¹⁾ De virulentie werd bepaald door subcutane inspuiting van 1 cM³. eener 24 uur oude bouilloncultuur bij cavia's van 400 tot 500 Gram gewicht.

Tabel XI.

Agglutinatieproeven met diphtherie- en pseudodiphtheriebacillen.

10 Dec.: Cavia (bonte) subcutane injectie met 2 cM³. antidiphtherisch serum, niet verhit.

15 Dec.: Cavia gedood. Serum onderzocht 16 Dec. Sterkte voor bac. Utr γ , 1 : 120.

Werking van dit serum op:

Pseudodiphtheriebacillen.		Echte diphtheriebacillen.	
Bacil.		Bacil.	
III.	agglut. 1:10 negatief.	Utr. γ .	agglut. 1:120. positief.
VII.	" 1:10 positief*)	Utr. 102.	" 1:100. "
	" 1:20 negatief.	Utr. Mei.	" 1:100. "
VIII.	" 1:10 negatief.	Parijs.	" 1:100. "
IXa.	" 1:10 positief*)	Utr. IV.	" 1:10 negatief.
	" 1:20 negatief.	Rott. I.	" 1:100. positief.
IXb.	" 1:10 positief*)	Rott. II.	" 1:100. "
	" 1:20 negatief.	Rott. III.	" 1:100. "
XI. <i>geele</i> .	" 1:10 positief*)	Rott. IV.	" 1:100. "
	" 1:20 negatief.	Rott. V.	" 1:100. "
XIc. <i>m. n.</i>	" 1:10 positief*)	Rott. VI.	" 1:50. "
	" 1:20 negatief.	Rott. VII.	" 1:10. "
XI. <i>w. z. n.</i>	" 1:10 negatief.	Rott. VIII.	" 1:100. "
XII.	" 1:10 ?	Rott. IX.	" 1:10 "
	" 1:20 negatief.		
XVI.	" 1:10 negatief.		

*) Onvolledige reactie.

Tabel XII.

Agglutinatieproeven met diphtherie- en pseudodiphtheriebacillen.

4 Jan.: Cavia van 370 gram. Injectie van 4 cM³.
antidiphtherisch serum, onverhit.

9 Jan.: Cavia gedood. Serum onderzocht 10 Jan.
Sterkte voor Bac. Utr. 102, 1 : 120.

Werking van dit serum op:

Pseudodiphtheriebacillen.			Echte diphtheriebacillen.		
Bacil.			Bacil.		
III.	agglutineert	1:10 negat.	Utr. 102.	agglut.	1:120. positief.
VII.	"	1:10 "	Utr. γ.	"	1:100. "
VIII.	"	1:10 "	Utr. Mei.	"	1:50. "
IXa.	"	1:10 "	Utr. IV.	"	1:10 negatief.
IXb.	"	1:10 "	Parijs.	"	1:100. positief.
XI. geele.	"	1:10 spoor.	Rott. I.	"	1:100. "
XI. w. m. n.	"	1:10 negat.	Rott. II.	"	1:50. "
XI. w. z. n.	"	1:10 "	Rott. III.	"	1:50. "
XII.	"	1:10 "	Rott. IV.	"	1:100. "
XVI.	"	1:10 "	Rott. V.	"	1:10. "
			Rott. VI.	"	1:100. "
			Rott. VII.	"	1:50. "
			Rott. VIII.	"	1:100. "
			Rott. IX.	"	1:10 spoor.
			Bergen-op-Z. I.	"	1:100. positief.

Tabel XIII.

Agglutinatieproeven met diphtherie- en pseudodiphtheriebacillen.

4 Jan.: Cavia van 560 gram. Injectie van 4 cM³. serum, onverhit.

9 Jan.: dito.

14 Jan.: gedood. Serum onderzocht 16 Jan. agglutineert bac. Utrecht 102 in verd. van 1 : 360 in 30 min. — 1 : 500 in 45 min.

Werking van dit serum op:

Pseudodiphtheriebacillen.				Echte diphtheriebacillen.			
Bacil.				Bacil.			
III.	aggl.	1 : 10 in 1½ uur	negat.	Utr. 102.	agglut.	1 : 360.	positief.
VII.	"	1 : 10	dito "	Utr. 7.	"	1 : 100.	"
VIII.	"	1 : 10	dito "	Utr. Mei.	"	1 : 100.	"
IXa.	"	1 : 10	dito "	Utr. IV.	"	1 : 10 negatief.	
XI. geele	"	1 : 10 in 30 min.	zwak.	Parijs.	"	1 : 100.	positief.
		1 : 40	dito spoor.	Rott. I.	"	1 : 100.	"
XI.w.m.n.	"	1 : 10 in 1½ uur	negat.	Rott. II.	"	1 : 100.	"
XI.w.z.n.	"	1 : 10	dito "	Rott. III.	"	1 : 100.	"
XII.	"	1 : 10	dito "	Rott. IV.	"	1 : 50.	"
XVI	"	1 : 10	dito "	Rott. V.	"	1 : 50.	"
				Rott. VI.	"	1 : 50.	"
				Rott. VII.	"	1 : 100.	"
				Rott. VIII.	"	1 : 50.	"
				Rott. IX.	"	1 : 10 negatief	
				Bergen-op-Z. I.	"	1 : 100.	positief.

Tabel XIV.

Agglutinatiproeven met serum van konijn n°. I.

(Zie Tabel VI.)

Serum van	Sterkte voor Bac. Utr. γ .	Bacil.	Verdunning.	Resultaat.
12 Oct.	1 : 320	D. B. Utr. 102.	1 : 100	positief.
12 Oct.	1 : 320	D. B. Utr. Mei.	1 : 100	positief.
19 Oct.	1 : 300	D. B. Utr. IV.	1 : 10	questieus.
19 Oct.	1 : 300	Ps. D. B. III.	1 : 10	negatief.
19 Oct.	1 : 300	Ps. D. B. IXb.	1 : 10	negatief.
19 Oct.	1 : 300	Ps. D. B. XI, <i>geele</i> .	1 : 10	spoor.
19 Oct.	1 : 300	Ps. D. B. XI <i>w.m.n.</i>	1 : 10	negatief.

Tabel XV.

Agglutinatiproeven met serum van konijn n°. II.

(Zie Tabel VII.)

Serum van	Sterkte voor Bac. Utr. γ .	Bacil.	Verdunning.	Resultaat.
24 Oct.	1 : 1000	D. B. Parijs.	1 : 100	positief.
24 Oct.	1 : 1000	D. B. Utr. IV.	1 : 10	negatief.
24 Oct.	1 : 1000	Ps. D. B. III.	1 : 10	negatief.
24 Oct.	1 : 1000	Ps. D. B. IXa.	1 : 10	negatief.
24 Oct.	1 : 1000	Ps. D. B. XI, <i>geele</i> .	1 : 10	negatief.

schijnt, in dit verband tevens te vermelden (Zie *Tabellen* XIV en XV). Vooraf zij 't een en ander medegedeeld over de onderzochte diphtherieculturen.

Deze waren van verschillende herkomst, korteren of langeren tijd in 't laboratorium voortgekweekt en hadden de morphologische eigenschappen van den diphtheriebacil. De virulentie voor cavia's was door inspuiting van 1 cM³. eener 24 uur oude cultuur gebleken. Uit een dergelijke, vrij ruwe bepaling kan over den graad van virulentie slechts een gebrekkig oordeel geveld worden. Toch bleek daarbij, dat enkele culturen belangrijk zwakker virulent waren, dan de overige. Het zal niet ondienstig zijn een tabellarisch overzicht van de gebezigde culturen hier in te voegen (Zie *Tabel X*).

De pseudodiphtheriebacillen, die hier ter sprake komen, zijn in een vroeger hoofdstuk uitvoerig beschreven.

De *Tabellen* XI tot XV geven het resultaat van herhaalde agglutinatieproeven op overzienbare wijze aan. Opmerking verdient nog, dat, nadat eens de sterkte van elk serum met één bacil was bepaald, waarvoor 't zij B. *Utr.* 102, de in het Bacterio-therapeutisch Instituut gebruikte, of de met dezen t. o. v. de agglutinatatie vrij wel overeenkomende Bac. *Utr.* γ gebruikt werd, de andere bacillen slechts met de verdunningen 1 : 10, 1 : 50 en 1 : 100 werden onderzocht. De observatietijd was in den regel 30 minuten. Waar een negatief resultaat verkregen werd, was 't echter noodig ook in verdunning van 1 : 4 en gedurende langer tijd te observeeren. Dit bleek echter geen verschil te geven. In die gevallen, waar in de tabellen als agglutinatatie-resultaat is aangegeven 1 : 100 is dus

niet uitgesloten, dat misschien ook sterkere verdunningen nog een positief resultaat zouden hebben kunnen geven.

In menig opzicht heeft dit onderzoek interessante uitkomsten opgeleverd.

In de eerste plaats, wat betreft de echte diphtheriebacillen.

Hier zijn vooral belangrijk de culturen *Utr.* IV en *Rott.* IX. De eerste heeft bij herhaald onderzoek zich nooit laten agglutineeren, afgezien van een enkele maal, waar een twijfelachtig resultaat met een weinig (1:10) verdund serum van hooge potentie werd verkregen (*Tabel XIV*), welke uitzondering nog zeer in beteekenis vermindert, wijl 't bleek, dat een nog veel sterker serum weder geheel onwerkzaam was (*Tabel XV*).

B. *Rott.* IX liet zich ook moeilijk agglutineeren en moet misschien met B. *Utr.* IV op één lijn gesteld worden. Het is mogelijk, dat we hier moeten denken aan eene analogie met de door DURHAM ¹⁾ voor verschillende cholera-sera en culturen gevonden feiten. Sterker virulente cholera-culturen lieten zich minder goed agglutineeren door sera, met zwakker virulente bacillen verkregen.

Echter schijnt het mij zeer gewaagd toe in deze richting te beslissen. Pogingen, om door nauwkeurig onderzoek van de eigenschappen der afwijkende culturen meer licht te zoeken, zullen nog gedaan moeten worden. Al de andere diphtheriebacillen agglutineerden met de verschillende sera steeds goed. Quantitatieve afwijkin-

¹⁾ Journal of Pathol. and Bacteriol. Vol. IV. 1897.

gen kwamen evenwel bij enkele bacillen voor. Een zelfde bacil vertoonde met nagenoeg even sterke sera nu eens sterkere, dan weer zwakkere agglutinatie.

Bij de beperkte betrouwbaarheid der quantitatieve methode, meen ik daaraan geen groot gewicht te kunnen hechten. Met name verschilde de densiteit der culturen vaak belangrijk.

De meeste culturen, en daaronder de langst voortgekweekte, die steeds het fraaist homogeen waren, gaven vrij constante resultaten.

Wat betreft de verhouding der pseudo-bacillen valt het volgende op te merken:

Vier van de tien bacillen vertoonden nooit, 5 andere slechts ééns eene (onvolkomen) agglutinatie in verhouding van 1 : 10 met een niet zeer sterk serum. Deze laatste lieten zich echter door sterkere sera weder niet agglutineeren. Ik meen daarom gerechtigd te zijn aan dit eene afwijkende serum eene toevallige, niet specifieke werking op die pseudo-diphtherieculturen toe te schrijven, en in 'talgemeen aan te nemen, dat het specifiek agglutineerende diphtherieserum op deze pseudo's niet werkt.

Iets anders is het met Bac. XI *geele*. Deze liet zich vrij constant agglutineeren (eens zelf in verdunning van 1 : 40 nog eenigszins), schoon nooit zoo sterk, als de diphtheriebacillen. Echter was merkwaardigerwijze het sterkste serum juist op hem onwerkzaam. Toch is het niet onmogelijk, dat in dezen bacil een verwant van den echten diphtheriebacil is te zien, waarvoor ook de groote morphologische overeenkomst (Zie Hoofdstuk I) schijnt te pleiten. De afwijkende pathogene werking (abs-

cesvorming), die door serum antidiphthericum niet geïnfluenceerd wordt, bewijst echter, dat hij geen diphtheriebacil is. Analoge gevallen, dat namelijk een verwante, doch stellig niet gelijksoortige bacil positief, schoon veel zwakker, wordt geagglutineerd door een serum, dat voor een bepaalden bacil eene hooge potentie bezit, zijn in de litteratuur meermalen beschreven ¹⁾.

Wanneer wij de resultaten van deze agglutinatieproeven vergelijken met hetgeen door NICOLAS en BRUNO is verkregen, dan zien we, dat eene schrede voorwaarts is gedaan. Ongetwijfeld waren de zwak agglutineerende anti-diphtherische sera, welke door hen gebruikt werden, onvoldoende om een definitief oordeel over de vraag der serodiagnostiek van den diphtheriebacil te laten vellen.

Het feit, dat bij NICOLAS slechts 50 % van de onderzochte culturen agglutineerden, is dan ook zeer goed uit de geringe potentie van het gebruikte serum te verklaren. Ook ik zag, bij een onderzoek met een serum van niet meer dan 1 : 60 sterkte, bij eenige door sterkere sera goed geagglutineerde culturen, de agglutinatie in verdunning van 1 : 10 slechts zeer twijfelachtig optreden. De mogelijkheid is dan ook niet te ontkennen, en analogiën pleiten er voor, dat wanneer het gelukt, een nog sterker serum te krijgen, dan mij tot nog toe mogelijk was, de beide bacillen, die thans zich nog niet laten agglutineeren, ook zullen blijken voor het specifieke reagens niet ongevoelig te zijn. Intusschen

¹⁾ Zie o. a. WIDAL et NOBÉCOURT. Semaine Méd. 1897, n°. 36. p. 285.

staan we voor het feit, dat op het oogenblik eene serodiagnostiek der corynebacteriën nog niet mogelijk is.

Zooveel is echter ook zeker, dat een steun aan de meening, dat diphtherie- en pseudodiphtheriebacillen soortgenooten zijn, door de agglutinatie allerm minst wordt verschaft. Van alle zijden ¹⁾ is medegedeeld, dat de zwakker virulente culturen van typhus- en cholerabacillen steeds sterker geagglutineerd worden door gelijke sera, dan de sterker virulente; — waren dus de avirulente vormen echte diphtheriebacillen, dan had men eene veel sterkere werking van het specifieke serum op die culturen mogen verwachten. Waar zulks niet het geval is gebleken, kan ook dit ons slechts steunen in de opvatting, dat de avirulente coryne-bacteriën niet van den diphtheriebacil afstammen.

¹⁾ Zie: KÜHN AU; Berl. Klin. Woch. 1897. n°. 19. p. 397.
KOLLE: Deutsche Med. Woch. 1897. n°. 9; v. D. VELDE e. a.

HOOFDSTUK V.

AGGLUTINATIE DER PSEUDODIPHThERIEBACILLEN.

Reeds is met een enkel woord vermeld ¹⁾, dat ook met pseudodiphtheriebacillen agglutineerende sera kunnen worden verkregen.

Ik heb mij met twee pseudobacillen dergelijke sera verschaft, en wel met Bac. IXa., een zuurvormenden, en met Bac. III, een alkalivormenden.

Een volwassen konijn ontving groote massa's cultuur van Bac. IXa. Het dier kreeg onder de huid herhaalde malen eenige cM³. van eene versche bouilloncultuur, waarin meestal nog eene ruime hoeveelheid van eene serumcultuur van den zelfden bacil gesuspendeerd was.

Onder invloed van deze injecties begon het bloedserum van dit dier een hoog agglutineerend vermogen te vertoonen, dat zelfs tot 1 : 1400 klom.

Tabel XVI geeft verslag van de verrichte inspuitingen en van het verloop van het agglutineerend vermogen

¹⁾ Zie blz. 31.

bij dit dier. Wij zien er uit, dat dit vermogen, tengevolge van 2 inspuitingen na 8 dagen reeds boven 1 : 100 gestegen, nog snel blijft klimmen tot 1 : 1000. Daarna begint het, waar tusschen de injecties wat langer tijdruimte verloopt, weder te dalen, om onder invloed van nieuwe inspuitingen wederom te stijgen. Met dit serum heb ik nu tweemaal de verschillende bacillen, die ik ter beschikking had, onderzocht. Het bleek, dat geen der andere corynebacteriën zich door dit serum liet agglutineeren.

Voor de diphtheriebacillen was dit trouwens niet onverwacht. Zelfs wanneer Bac. IXa een avirulente diphtheriebacil ware, dan zou zijn serum mogelijk de virulente diphtheriebacillen toch niet geagglutineerd hebben. Het is toch reeds herhaaldelijk bij andere bacteriën gebleken, dat zwakker virulente microben wel geagglutineerd worden door sera, die de sterker virulente bacillen van dezelfde soort agglutineeren, doch dat omgekeerd een serum met een zwakken bacil verkregen, op sterker virulente bacillen niet zoo goed werkt. O. a. door DURHAM¹⁾ wordt iets dergelijks voor cholera-vibrionen en hunne sera vermeld.

Veel belangrijker is, dat een serum, dat Bac. IXa in verdunning van 1 : 700 agglutineerde, op de volkomen gelijke bacillen IXb, XI *w. m. n.* en XI *w. z. m.* niet werkt in eene verdunning van 1 : 10, ofschoon deze bacillen nog wel uit denzelfden pharynx geïsoleerd zijn.

Dit komt overeen met de resultaten, die DURHAM

¹⁾ Journal of Pathol. and Bacteriology Vol. IV. 1897, p. 26.

(l. c.), WIDAL ¹⁾ en vele anderen verkregen hebben met coli-bacillen. Ook deze bleken zich tegenover agglutineerende sera zeer verschillend te gedragen.

Dat de bacillen III, VII, VIII, XII en XVI, die bouillon alcalisch maken, NEISSER's reactie niet geven en ook morphologisch afwijken, zich door dit serum niet laten influenceeren is minder verrassend.

Vooraf in verband hiermede is van belang, wat ik vond bij het experimenteeren met een serum verkregen door injectie van Bac. III. Met dien bacil werd een wit konijn behandeld op analoge wijze als het vorige met Bac. IXa.

Het serum kreeg hier niet eene zoo hooge sterkte als in de vorige proef, waarschijnlijk omdat de ingespoten hoeveelheden cultuur geringer waren. Toch kon ik een serum van meer dan 1 : 100 sterkte krijgen om mijne reïnculturen te onderzoeken.

Zooals te verwachten was, gaven alle diphtheriebacillen en de zuurvormende pseudo's een negatief resultaat. Positief viel de proef uit bij bac. VII en VIII in verdunning van 1 : 50. Bac. XVI agglutineerde slechts bij 1 : 10, terwijl het serum in verdunning van 1 : 50 werkeloos was.

Bac. XII agglutineerde zelfs met 1 : 10 serum niet.

Tabel XVII. geeft van mijn waarnemingen een overzicht.

Verschillende auteurs hebben reeds het vermoeden

¹⁾ WIDAL op 't Internationaal Congres te Moskou. Zie *Semaine médicale* 8 Sept. 1897, n°. 42. pag. 332.

en WIDAL et NOBÉCOURT: *Sem. méd.* 1897, n°. 36 p. 285.

Tabel XVII.

Agglutinatieproeven met geconserveerd serum
van een konijn, behandeld met culturen van
bac. pseudodiphthericus III.

Het serum agglutineert dien bacil in verdunning
van 1 : 100.

Bacil				
III	agglutineert in verdunning	van	1 : 100.	
VII	" " "	hooger dan	1 : 50.	
VIII	" " "	" "	1 : 50.	
IXa	" " "	van	1 : 10 negatief.	
IXb	" " "	"	1 : 10 negatief.	
XI <i>geele</i>	" " "	"	1 : 10 negatief.	
XI <i>w.m.n.</i>	" " "	"	1 : 10 negatief.	
XI <i>w.z.n.</i>	" " "	"	1 : 10 negatief.	
XII	" " "	"	1 : 10 negatief.	
XVI	" " "	"	{ 1 : 10 positief 1 : 50 negatief.	

14 Echte diphtherieculturen geven in verdunning van 1 : 10 negatief resultaat.

uitgesproken, dat er verschillende soorten van pseudo-diphtheriebacillen zouden bestaan.

Reeds in 1893 meende BIGGS ¹⁾ op grond van de zuurproductie en andere verschillen, dat de naam van pseudodiphtheriebacillen aan twee verschillende organismen was gegeven.

COBBETT en PHILLIPS ²⁾ onderscheiden twee soorten

¹⁾ Scientific Bulletin n^o. 1. Health Dept. City of New-York. (Geciteerd door COBBETT and PHILLIPS.)

²⁾ Journ. of Pathol. and Bacteriol. Vol. IV, 1897, p. 133.

van pseudodiphtheriebacillen, evenals KURTH ¹⁾, die van eenen *bac. pseudodiphthericus alcali-faciens* en van eenen *bac. acidum-faciens* spreekt. Zij houden echter den laatsten voor een avirulenten diphtheriebacil.

Verder vindt men nog eenige aanwijzigingen van afwijkende typen.

DE SIMONI ²⁾ beschrijft een sporogenen pseudodiphtheriebacil. Hij vond dezen in 't secreet van de neus in een geval van ozaena. Op aardappelen en in melk vormde deze microbe sporen.

HEINERSDORFF en AXENFELD vermelden een *citroengeelen* pseudobacil, die zeer langzaam, doch tot groote massa's op gelatine uitgroeit.

SCHANZ ³⁾ meent, dat op grond van morphologische verschillen geen scheiding te maken is, omdat de echte diphtheriebacillen even sterk onderling verschillen kunnen als de pseudo's. Hij is echter ook van oordeel, dat er verschillende soorten bestaan.

Het schijnt mij toe, dat door mijne bevindingen in in deze zaak wel eenig licht is gekomen.

Mijne bacillen vertoonen morphologisch drie typen:

1°. de pyogene, lange XI *geele*;

2°. de witte, avirulente IX *a* en *b* en XI *witte*. Beide vormen produceeren in glyucose-bouillon zuur en geven de kleurreactie van NEISSER;

3°. de korte, meer spoelvormige B. III, VII enz., die geen zuur vormen en NEISSER's kleuring niet aannemen.

¹⁾ Z. f. Hyg. und Infectionskrankh. Bd. XXVIII. p. 409.

²⁾ Centralblatt f. Bakteriologie, Bd. XXIV, 31 Aug. 1898.

³⁾ Berliner Klin. Wochenschrift, n°. 16, 1898.

Op deze morphologische en biologische verschillen eene soortverdeeling te baseeren, schijnt mij echter wel wat voorbarig te zijn. In zooverre de agglutinatieproeven positief uitvallen, zou men daarin misschien een criterium kunnen vinden, op grond waarvan men de bacillen III, VII, VIII, en misschien ook B. XII tot ééne soort zou kunnen brengen. Om echter den morphologisch totaal gelijken B. XVI, die niet agglutineerde, alléén daarom uit te sluiten, daartoe acht ik mij niet gerechtigd. Hetzelfde geldt voor de bacillen IX en XI *witte*. Deze vier zijn zoo volkomen aan elkaar gelijk, dat ik nog niet durf beweren, dat B. IXa tegenover de drie anderen, niet geagglutineerde, geplaatst moet worden.

Door systematische, speciaal op dit punt gerichte proeven, zal waarschijnlijk deze quaestie wel opgehelderd kunnen worden.

In het geschil tusschen SCHANZ en AXENFELD ¹⁾ over de vraag of xerosebacillen en pseudo-diphtheriebacillen tot eene soort behooren of niet, zou door agglutinatieproeven misschien ook meer klaarheid kunnen gebracht worden.

¹⁾ Berl. Klin. Wochenschr. 1898, n^o. 9, 16, 24 en 30.

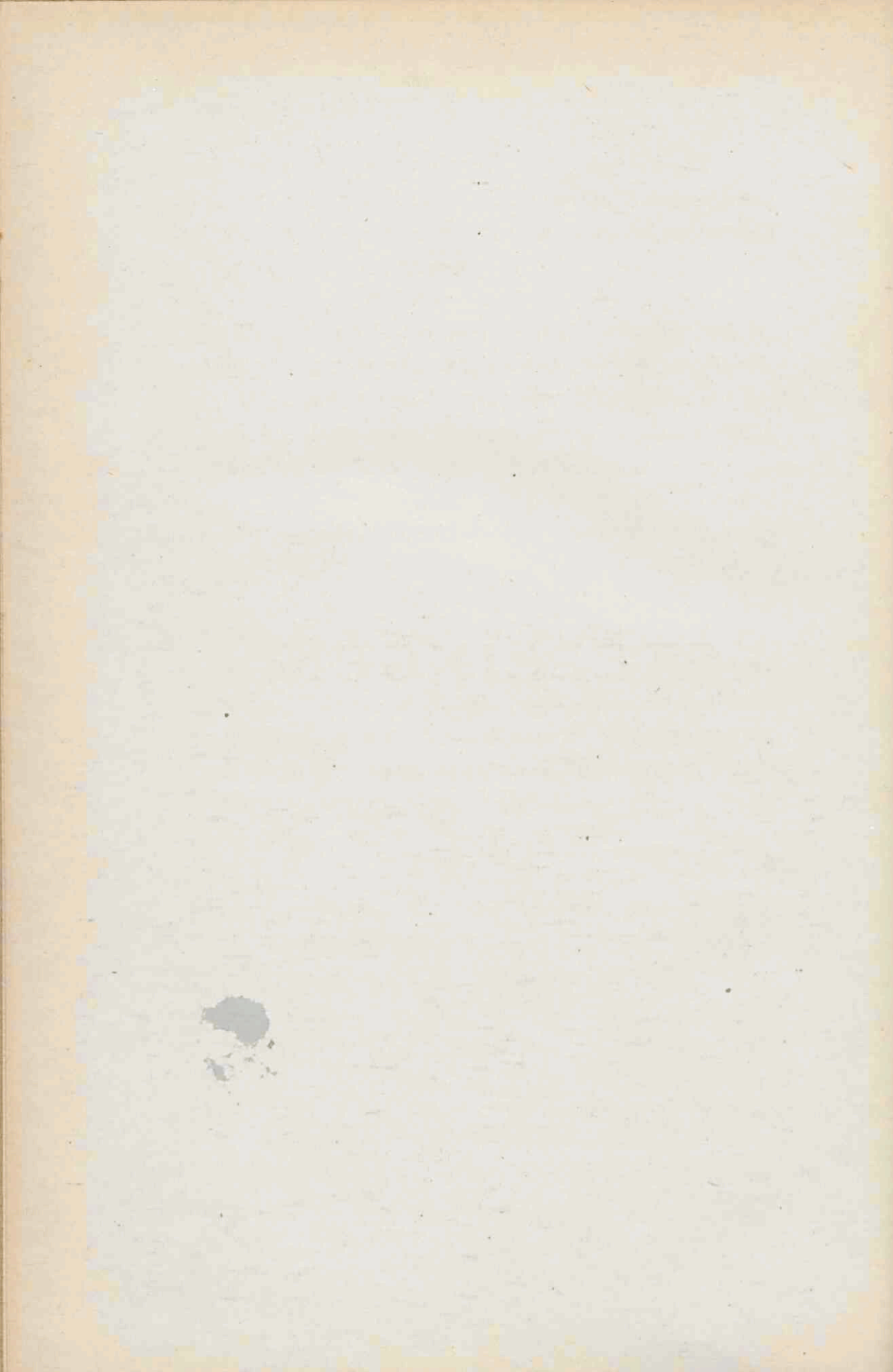
III

CONCLUSIES.

- 1°. De meening, dat vele zwak of niet virulente coryne-bacteriën diphtherietoxine kunnen produceeren, is niet juist.
- 2°. Pseudodiphtheriebacillen ontwikkelen zich vaak op een door den diphtheriebacil uitgeputten, voor dezen ongeschikt geworden voedingsbodem. Zulk een kweekbodem kan dienstig zijn voor de differentiëeldiagnose.
- 3°. Antidiphtherisch paardenserum agglutineert den diphtheriebacil in den regel niet. Door behandeling met culturen van diphtheriebacillen kan men evenmin het bloedserum van dieren agglutineerende eigenschappen doen aannemen.
- 4°. Na subcutane injectie van een niet agglutineerend antidiphtherisch paardenserum, ziet men bij dieren vrij regelmatig het bloedserum een specifiek agglutineerend vermogen voor den diphtheriebacil aannemen.

- 5°. Met zulk een agglutineerend serum is differentiatie van diphtheriebacillen en pseudodiphtheriebacillen in vele gevallen mogelijk.
 - 6°. Door dieren te behandelen met pseudodiphtheriebacillen kan men gemakkelijk sera verkrijgen, die een hoog agglutineerend vermogen voor die bacillen bezitten. Deze sera oefenen geene agglutineerende werking op echte diphtheriebacillen uit.
 - 7°. Er bestaan meerdere soorten van pseudodiphtheriebacillen.
 - 8°. Een nieuwe species van pseudodiphtheriebacillen, bij dit onderzoek ontdekt, is evident pathogeen voor cavia's. Subcutane injectie verwekt constant abscesvorming. Tegen die pathogene werking vermag praeventieve inspuiting van antidiphtherisch serum niets.
-

STELLINGEN.



STELLINGEN.

I.

Er bestaat slechts één soort van diphtheriebacillen.

II.

Het ernstig verloop van vele met streptococcen infectie gecompliceerde gevallen van diphtherie, is minder te wijten aan toename der virulentie van den diphtheriebacil door symbiose met streptococcen, dan wel aan een dergelijken invloed van den diphtheriebacil op de laatste microben.

III.

Locale behandeling van diphtherie met glycose worde beproefd.

IV.

De agglutinatieproef is het beste diagnosticum van typhus abdominalis.

V.

De giftigheid der urine wordt geheel verklaard door het gehalte aan anorganische zouten.

VI.

Lepra is contagieus, niet hereditair.

VII.

De raad door DUPLAY (Sem. méd. 1897, p. 433) gegeven, om bij verzakkingsabscessen *jodoformaether* in te spuiten, verdient geen aanbeveling.

VIII.

Het succes der moderne wondbehandeling is grootendeels te danken aan het gebruik van absorbeerende verbanden.

IX.

Het zou wenschelijk zijn, dat de medici leerden kunstbewerkingen naar behoefte met de rechter of met de linkerhand uit te voeren.

X.

Bekkenvernaauwing is géén indicatie voor provocatio abortus.

XI.

Het door AHLFELD aangegeven middel, om de diagnose van de positie van het kind in utero te vergemakkelijken door medianen druk op den uterus, verdient géén aanbeveling.

XII.

De oorzaak der eclampsie is eerder te zoeken in verminderde eliminatie, dan in vermeerderde productie van toxische stoffen.

XIII.

De schijnbaar grootere gezichtsscherpte bij wilde volkstammen is niet te verklaren door een belangrijk sterkeren visus.

XIV.

Bij conjunctivitis pseudomembranacea is bacteriologisch onderzoek gewenscht; met name om de indicatie tot serotherapie te stellen.

XV.

De methode der intraveneuse injectie is niet geschikt om in samengestelde stoffen als bloed, urine, het gehalte aan toxinen quantitatief te bepalen.

XVI.

Door mechanische prikkeling van de huid ontstaat vaak een hyperaemische plek, omgeven door een bleeken rand. Deze laatste is toe te schrijven aan vicariërende anaemie.

XVII.

De *M. tibialis anticus* is een pronator, niet, zooals GEGENBAUR, HYRTL en HEITZMANN meenen, een supinator.

XVIII.

Fragmentatio myocardii kan durante vita ontstaan.

XIX.

Het ontstaan van vet uit eiwit bij phosphorintoxicatie, is niet bewezen.

XX.

De vraag of secreetcapillairen inter- of intracellulair liggen, wordt beslist door de verhouding der kitlijnen.

XXI.

De meening van SCHANZ (Anat. Anzeiger, 1897), dat het geheele colon uit den anaal-darm zou ontstaan, is niet aannemelijk.

XXII.

Immunitet is niet te verklaren door agglutinatie.

XXIII.

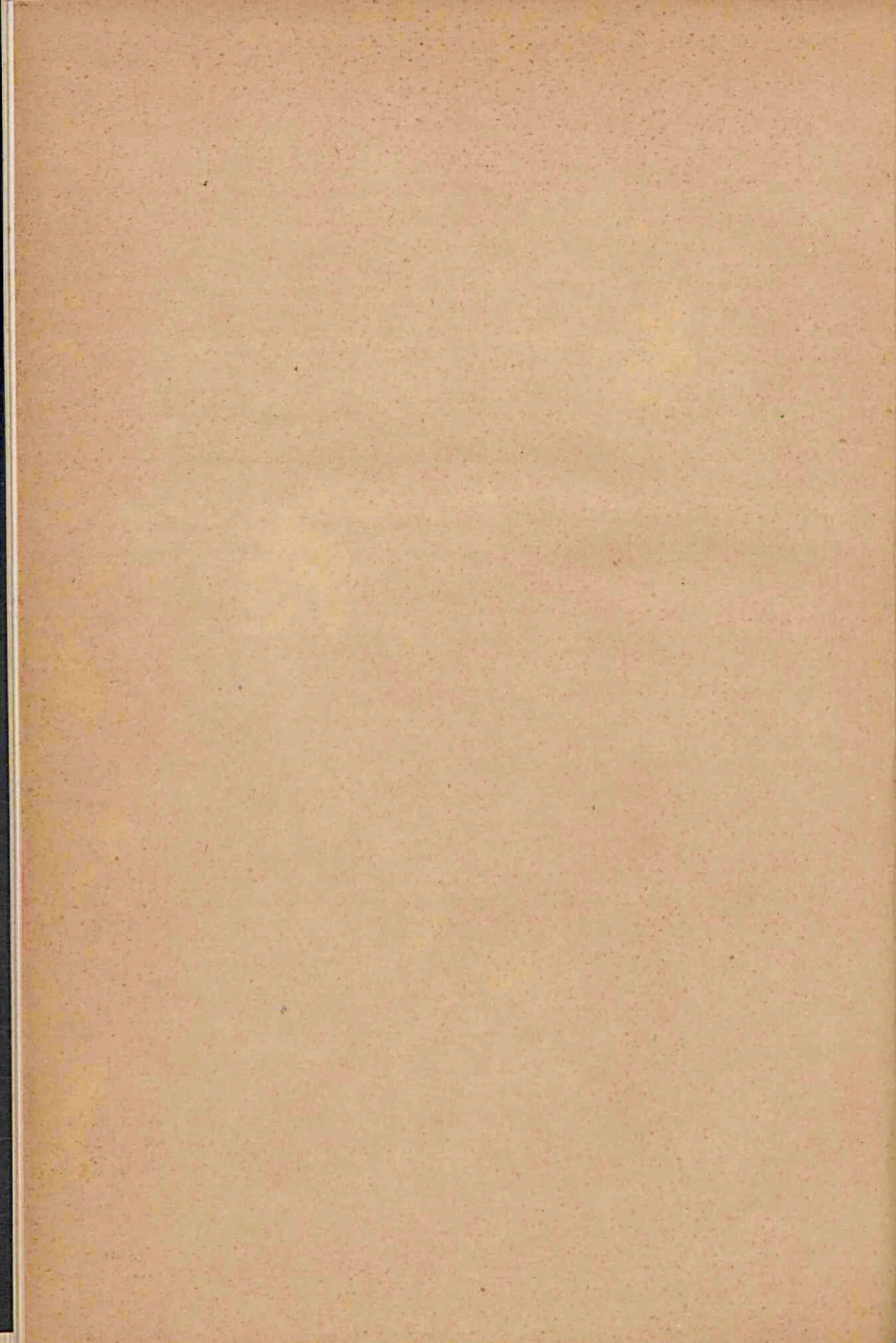
Internationale regeling der pharmacopeeën is wenschelijk.

XXIV.

Bij de opleiding van verplegingspersoneel worde het theorethisch onderwijs zooveel mogelijk beperkt.

XXV.

Dat kennis der plantkunde van alle, der dierkunde en vergelijkende ontleedkunde slechts van een deel der medische studenten geëischt wordt, is verkeerd.





A.
1

Vergelijkend onderzoek naar de productie van Diphtheriegif
MARTIN's

Diphtherie- bacil gemarkt:	Cultuurvloeistof.	Cultuur oud:	Resultaat der subcutane
			0,2 cM ³ .
Utr. γ. (1898).	Gistdecoct. MARTIN's mengsel N ^o . I.	7 dagen. 7 dagen.	Cavia = 475 G. sterft binnen 40 uur. C = 470 G. sterft na 3 dagen.
Utr. Mei (1898).	Gistdecoct. MARTIN's mengsel N ^o . III.	11 dagen. 11 dagen.	— —
Utr. 102 (1894).	Gistdecoct. MARTIN's mengsel N ^o . II.	7 dagen. 7 dagen.	C = 440 G. sterft na 46 uur. C = 430 G. oedeem, over- leeft.
Utr. Barak. (1898).	Gistdecoct. MARTIN's mengsel N ^o . II.	5 dagen. 5 dagen.	C = 470 G. sterft binnen 18 uur. C = 460 G. locale necrose, overleeft.

door Virulente Diphtheriebacillen in Gistdecoct en vloeistoffen.

inspuiting bij cavia's van het, 0,3% carbol bevattend, filtraat, in dosis van:

0,1 cM ³ .	0,05 cM ³ .	0,01 cM ³ .
C = 375 G. sterft binnen 40 uur. C = 355 G. sterft na 4 dagen.	C = 380 G. sterft na 3 dagen. C = 380 G. sterft in 5 dagen.	C = 335 G. locale necrose, overleeft. C = 370 G. locale necrose, overleeft.
C = 400 G. sterft binnen 24 uur. C = 410 G. locale necrose, overleeft.	C = 340 G. sterft binnen 40 uur. C = 340 G. gering oedeem, overleeft.	C = 370 G. locale necrose, overleeft. C = 370 G. niets, overleeft.
C = 480 G. sterft na 46 uur. C = 470 G. oedeem, overleeft.	C = 490 G. sterft na 5 dagen. C = 490 G. gering oedeem, overleeft.	C = 440 G. locale necrose, overleeft. C = 430 G. spoor oedeem, overleeft.
C = 425 G. sterft binnen 24 uur. C = 420 G. oedeem, overleeft.	C = 470 G. sterft na 3 dagen. C = 460 G. niets, overleeft.	C = 420 G. locale necrose, overleeft. C = 420 G. spoor oedeem, overleeft.

Injectie van Diphtherieculturen bij

Diphtheriebacil *Utr.* γ. Immunoserum (ader-

Datum.	BEHANDELING VAN HET PROEFDIER.
5 Oct.	11 uur, voormiddags. { Injectie van 2 cM ³ . antidiphtherisch serum subcutaan. 3 uur, namiddags. { Injectie van 1 cM ³ . antidiphtherisch serum + 2 cM ³ . bouilloncultuur, 2 × 24 uur oud + een geheele cultuur op LÖFFLER's-serum 2 × 24 uur oud.
6 Oct.	
7 Oct.	
8 Oct.	
9 Oct.	
10 Oct.	3 uur, namiddags. { Injectie van 2½ cM ³ . antidiphtherisch serum + 2 cM ³ . bouilloncultuur, 2 × 24 uur oud + een serumcultuur, 2 × 24 uur oud.
11 Oct.	
12 Oct.	
13 Oct.	
14 Oct.	
15 Oct.	
16 Oct.	
17 Oct.	
18 Oct.	
19 Oct.	11 uur, voormiddags. 3 cM ³ . antidiphtherisch serum.
20 Oct.	3 uur, namiddags. { 3 cM ³ . antidiphtherisch serum + 7 cM ³ . bouilloncultuur, 24 uur oud + 2 buisjes serumcultuur, 24 uur oud.
21 Oct.	
22 Oct.	
23 Oct.	
24 Oct.	
25 Oct.	
21 Nov.	
22 Nov.	
23 Nov.	4 cM ³ . antidiphtherisch serum + 6 cM ³ . bouilloncultuur, 2 × 24 uur oud.
24 Nov.	
25 Nov.	
26 Nov.	Konijn dood gevonden.

geïmmuniseerd, grijs Konijn, n°. I.

lating, 3 Augustus, 1898), verhit tot 58°.

AGGLUTINATIE-PROEVEN.

Venepunctie.	Serum agglutineert Bac. γ	1: 4, negatief.
Venepunctie.	Serum agglutineert Bac. γ	1: 4, negatief.
Venepunctie.	Serum agglutineert Bac. γ	1: 50, positief.
Venepunctie.		
.	. Serum van 12 Oct. agglutineert Bac. γ	1: 320, positief.
Venepunctie.		
.	. Serum van 14 Oct. agglutineert Bac. γ	1: 500, positief.
Venepunctie.		
.	. Serum van 16 Oct. agglutineert Bac. γ	1: 500, positief.
Venepunctie.		
.	. Serum van 19 Oct. agglutineert Bac. γ	1: 300, positief.
Venepunctie.		
.	. Serum van 21 Oct. agglutineert Bac. γ	1: 700, positief.
Venepunctie.		
.	. Serum van 24 Oct. agglutineert Bac. γ	1: 300, positief.
Venepunctie.		
.	. Serum van 21 Nov. agglutineert Bac. γ	1: 80, positief.

Proefdier: Klein

Injectie van antidiphtherisch serum

Datum.	BEHANDELING VAN HET PROEFDIER.
13 Oct.	Subcutane injectie 10 cm ³ . anti-diphtherisch serum.
14 Oct.	
15 Oct.	
16 Oct.	
17 Oct.	dito.
18 Oct.	
19 Oct.	dito.
20 Oct.	
21 Oct.	
22 Oct.	
23 Oct.	
24 Oct.	dito.
25 Oct.	
26 Oct.	
27 Oct.	dito.
28 Oct.	
29 Oct.	
30 Oct.	
31 Oct.	
1 Nov.	dito.
	Sterft onmiddelijk na injectie.

²⁾ De cultuur was heden minder fraai, zoodat de controleproef ook een weinig agglutineerd He

grijs konijn, n^o. II.

(aderlating van 19 Sept.), verhit tot 58°.

AGGLUTINATIE-PROEVEN.

Venepunctie. Serum agglutineert niet (1 : 4) B. *Utr.* γ , *Utr.* 102, *Utr.* Mei en *Utr.* IV

Venepunctie. Serum agglut. niet B. *Utr.* γ (1 : 4).

Venepunctie.

. . . . Serum van 19 Oct. agglut. B. *Utr.* γ 1 : 80 positief.

Venepunctie.

. . . . Serum van 21 Oct. agglut. B. *Utr.* γ 1 : 700 positief.

Venepunctie.

. . . . Serum van 24 Oct. aggl. B. *Utr.* γ 1 : 1000 positief.

Venepunctie.

. . . . Serum van 27 Oct. agglut. B. *Utr.* γ 1 : 1000 positief (?). 1)

Venepunctie.

. . . . Serum van 29 Oct. agglut. B. *Utr.* γ 1 : 700 spoor.

re Het cijfer is dus niet geheel betrouwbaar.

Proefdier: grijs

Injectie van antidiphtherisch

Datum.	BEHANDELING VAN HET PROEFDIER.		
5 Nov.	Subcutane injectie van 5 cM ³ . antidiphtherisch serum.		
6 Nov.			
7 Nov.			
8 Nov.			
9 Nov.	dito	5 cM ³ .	dito.
10 Nov.			
11 Nov.			
12 Nov.	dito	10 cM ³ .	dito.
13 Nov.			
14 Nov.			
15 Nov.			
16 Nov.	dito	10 cM ³ .	dito.
17 Nov.			
18 Nov.			
19 Nov.	dito	10 cM ³ .	dito.
20 Nov.			
21 Nov.			
22 Nov.			
23 Nov.			
24 Nov.			
25 Nov.			
26 Nov.			
10 Dec.	dito	10 cM ³ .	dito.
12 Dec.			
13 Dec.			
14 Dec.			
15 Dec.			
16 Dec.			
17 Dec.			

Konijn, n^o. III.

serum, verhit tot 58°.

AGGLUTINATIE-PROEVEN.

- . Venepunctie.
- Serum van 7 Nov. agglutineert niet B. *Utr.* γ .
- . Venepunctie.
- Serum van 9 Nov. agglut. B. *Utr.* γ . 1 : 40, positief.
- . Venepunctie.
- Serum van 11 Nov. agglut. B. *Utr.* γ . 1 : 40, positief.
- . Venepunctie.
- Serum van 14 Nov. agglut. B. *Utr.* γ . 1 : 40, positief.
- . Venepunctie.
- Serum van 21 Nov. agglut. B. *Utr.* γ . 1 : 40 positief.
- . Venepunctie.
- Serum van 23 Nov. agglut. B. *Utr.* γ . 1 : 10 positief.
- . Venepunctie.
- Serum van 25 Nov. agglut. B. *Utr.* γ . 1 : 40 positief.
- . Venepunctie.
- Serum van 12 Dec. agglut. B. *Utr.* γ . *niet* (1 : 10).
- . Venepunctie.
- Serum van 14 Dec. agglut. B. *Utr.* γ . *niet* (1 : 10).
- . Venepunctie.
- Serum van 16 Dec. agglut. B. *Utr.* γ . *niet* (1 : 10).

Proefdier: grijs K

Injectie van antidiphtherischserum

Datum.	BEHANDELING VAN HET PROEFDIER.
5 Nov.	Subcutane injectie van 5 cM ³ . antidiphtherisch serum.
6 Nov.	
7 Nov.	
8 Nov.	
9 Nov.	dito. 5 cM ³ dito.. . . .
10 Nov.	
11 Nov.	
12 Nov.	dito. 10 cM ³ . dito.. . . .
13 Nov.	
14 Nov.	
15 Nov.	
16 Nov.	dito. 10 cM ³ . dito.
17 Nov.	
18 Nov.	
19 Nov.	dito. 10 cM ³ . dito.
20 Nov.	
21 Nov.	
22 Nov.	
23 Nov.	
24 Nov.	
25 Nov.	
26 Nov.	

s Konijn, n^o. IV.

chserum, verhit tot 58°.

AGGLUTINATIE-PROEVEN.

- . Venepunctie.
- Serum van 7 Nov. agglutineert B. *Utr.* γ . *niet* 1 : 10.
- . Venepunctie.
- Serum van 9 Nov. agglutineert B. *Utr.* γ . 1 : 40, positief.
- . Venepunctie.
- Serum van 11 Nov. agglutineert B. *Utr.* γ . 1 : 40, positief.
- . Venepunctie.
- Serum van 14 Nov. agglutineert B. *Utr.* γ . 1 : 40, *negatief*.
- . Venepunctie.
- Serum van 21 Nov. agglutineert *niet* B. *Utr.* γ . 1 : 10.
- . Venepunctie.
- Serum van 23 Nov. agglutineert *niet* B. *Utr.* γ . 1 : 10.
- . Venepunctie.
- Serum van 25 Nov. agglutineert *niet* B. *Utr.* γ 1 : 10.

Injectie van cultuur van bacillus pseudodiphtheriae

Datum.	Behandeling van het Proefdier.	Gewicht v. h. dier.
19 Septemb.	Subcutane injectie van 3 cM ³ . bouilloncultuur, 2 × 24 uur oud, waarin een cultuur op LÖFFLER's serum gesuspenderd.	2500 Gram.
23 Septemb.	5 cM ³ . bouilloncultuur, 3 × 24 uur oud + 1 serumcultuur, 2 × 24 uur oud.	2500 Gram.
5 October	5 cM ³ . bouilloncultuur, 2 × 24 uur oud + 1 serumcultuur, 2 × 24 uur oud.	2550 Gram.
10 October	6 cM ³ . bouilloncultuur + 1 serumcultuur, beide 2 × 24 uur oud.	2500 Gram.
19 October	9 cM ³ . bouilloncultuur + 2 serumculturen, beide 24 uur oud.	2500 Gram.
27 October	7 cM ³ . bouilloncultuur + 1 serumcultuur, beide 3 × 24 uur oud.	
12 Novemb.	6 cM ³ . bouilloncultuur.	

Een met gelijke deelen carbol-bouillon (= bouillon met 1% carbol) geconserveerd serum, negatief resultaat met alle 9 andere pseudodiphtheriebacillen, evenals met de echte Sera van 4, 7 en 9 November, voor Bac. IXa van een sterkte van $\pm 1 : 700$ geven 13 stammen van echte diphtheriebacillen.

Op 15 Januari was zonder verdere injecties, het serum nog van een sterkte van

pseudodiphthericus, IXa bij een konijn.

Serum van :	Agglutinatieproeven.					
Vóór injectie agglutineerde het serum met B. IXa in verdun- ning van 1 : 10 niet.						
27 September	Agglutineert Bac. IXa in verdunning tusschen 1 : 100 en 1 : 160.					
28 September	"	"	"	"	"	1 : 260 en 1 : 500.
5 October	"	"	"	"	"	1 : 300 en 1 : 500.
7 October	"	"	"	"	"	1 : 300 en 1 : 400.
10 October	"	"	"	"	"	1 : 700 en 1 : 1000.
12 October	"	"	"	"	"	1 : 1000 en 1 : 1500.
14 October	"	"	"	"	±	1 : 1000.
16 October	"	"	"	"	tusschen	1 : 500 en 1 : 700.
19 October	"	"	"	"	"	1 : 350 en 1 : 500.
21 October	"	"	"	"	"	1 : 500 en 1 : 700.
24 October	"	"	"	"	"	1 : 1000 en 1 : 1400.
27 October	"	"	"	"	±	1 : 1400.
29 October	"	"	"	"	tusschen	1 : 1000 en 1 : 1400.
2 November	"	"	"	"	"	1 : 1000 en 1 : 1400.
4 November	"	"	"	"	"	1 : 700 en 1 : 1000.
7 November	"	"	"	"	"	1 : 700 en 1 : 1000.
9 November	"	"	"	"	"	1 : 700 (spoor).
14 November	"	"	"	"	"	1 : 1000 en 1 : 1400.
18 November	"	"	"	"	±	1 : 1400.

at Bac. XIa in verdunning van 1 : 260 agglutineert, geeft in verdunning van 1 : 4
 iphtheriebacillen, 102, γ, Mei, en IV.
 verdunning van 1 : 10, negatief resultaat met alle pseudodiphtheriebacillen, alsmede

meer dan 1 : 200.