



Over een tot dusver onbekenden pathogenen bacil

<https://hdl.handle.net/1874/240323>

H. 3. 10. 12 *— 1882*



OVER EEN TOT DUSVER

ONBEKENDEN

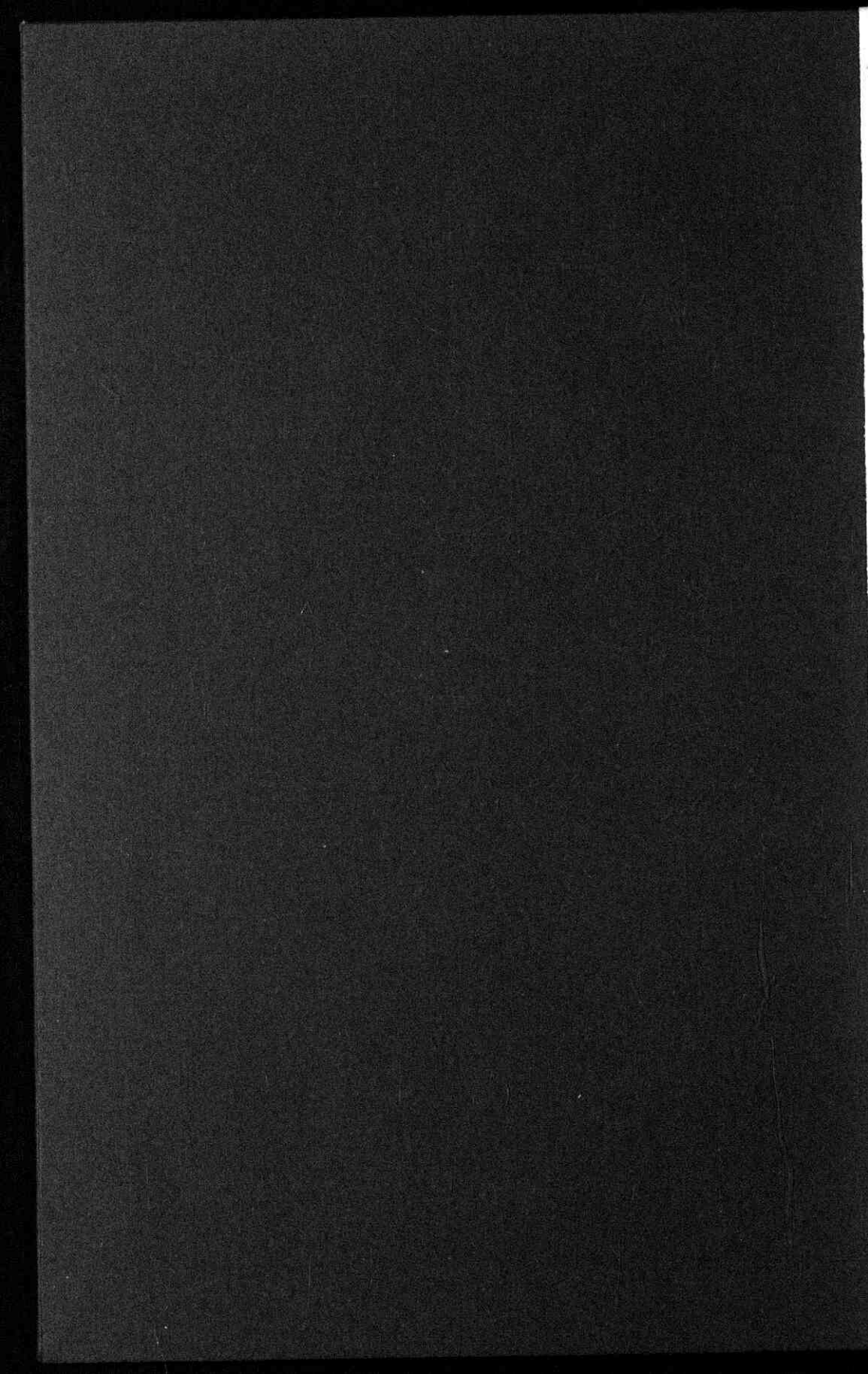
PATHOGENEN BACIL.

B. KOSTER.

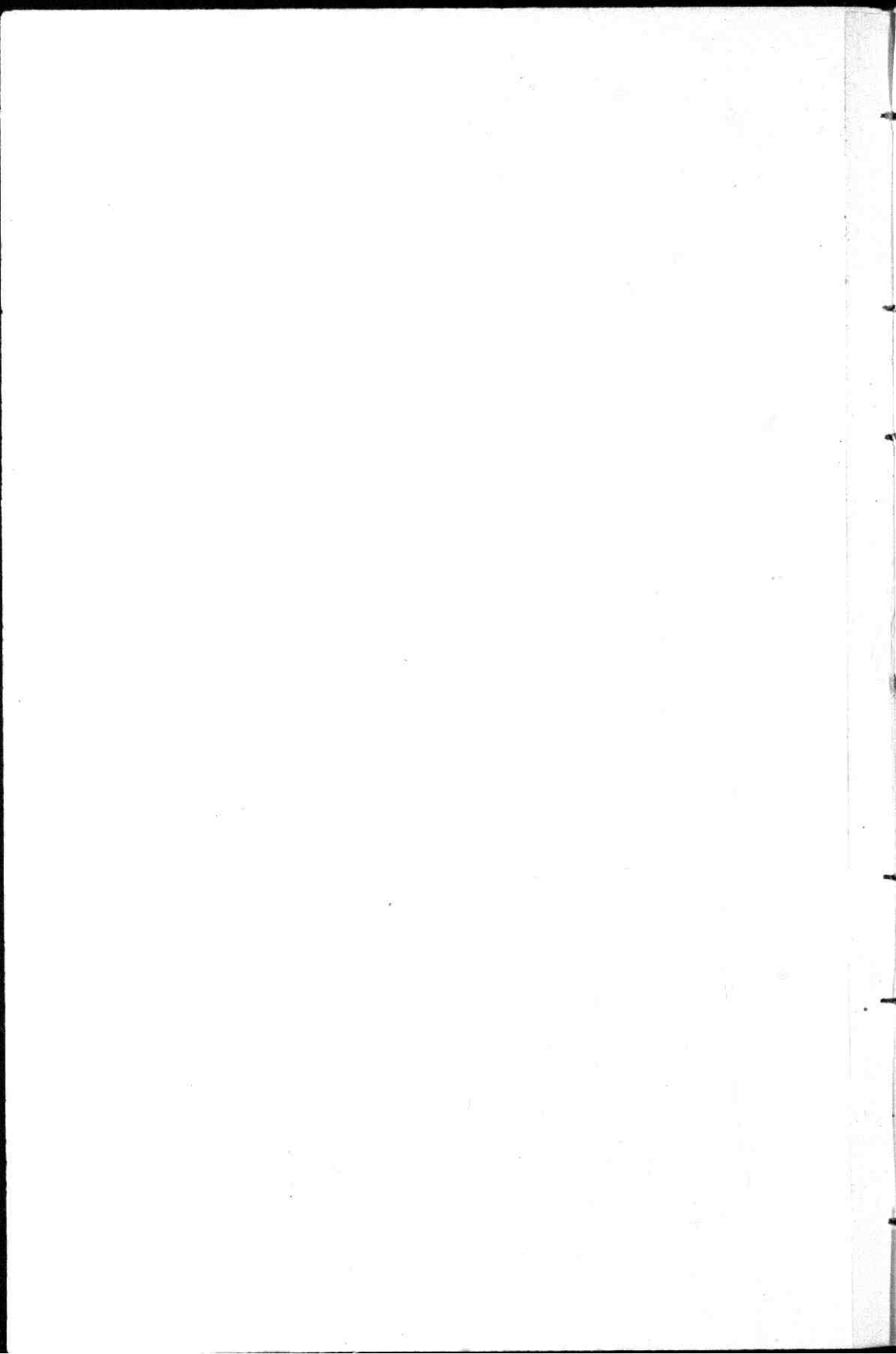


1.

A. qu.
192







OVER EEN TOT DUSVER

ONBEKENDEN

PATHOGENEN BACIL.

Typ. J. VAN BOEKHOVEN, Utrecht.

OVER EEN TOT DUSVER
ONBEKENDEN PATHOGENEN BACIL.

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN



Doctor in de Geneeskunde

AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT,

NA MACTHTIGING VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS

Dr. J. H. GALLÉE,

Hoogleraar in de Faculteit der Letteren en Wijsbegeerte.

VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAAT DER UNIVERSITEIT

TEGEN DE BEDENKINGEN DER MEDISCHE FACULTEIT

TE VERDEDIGEN

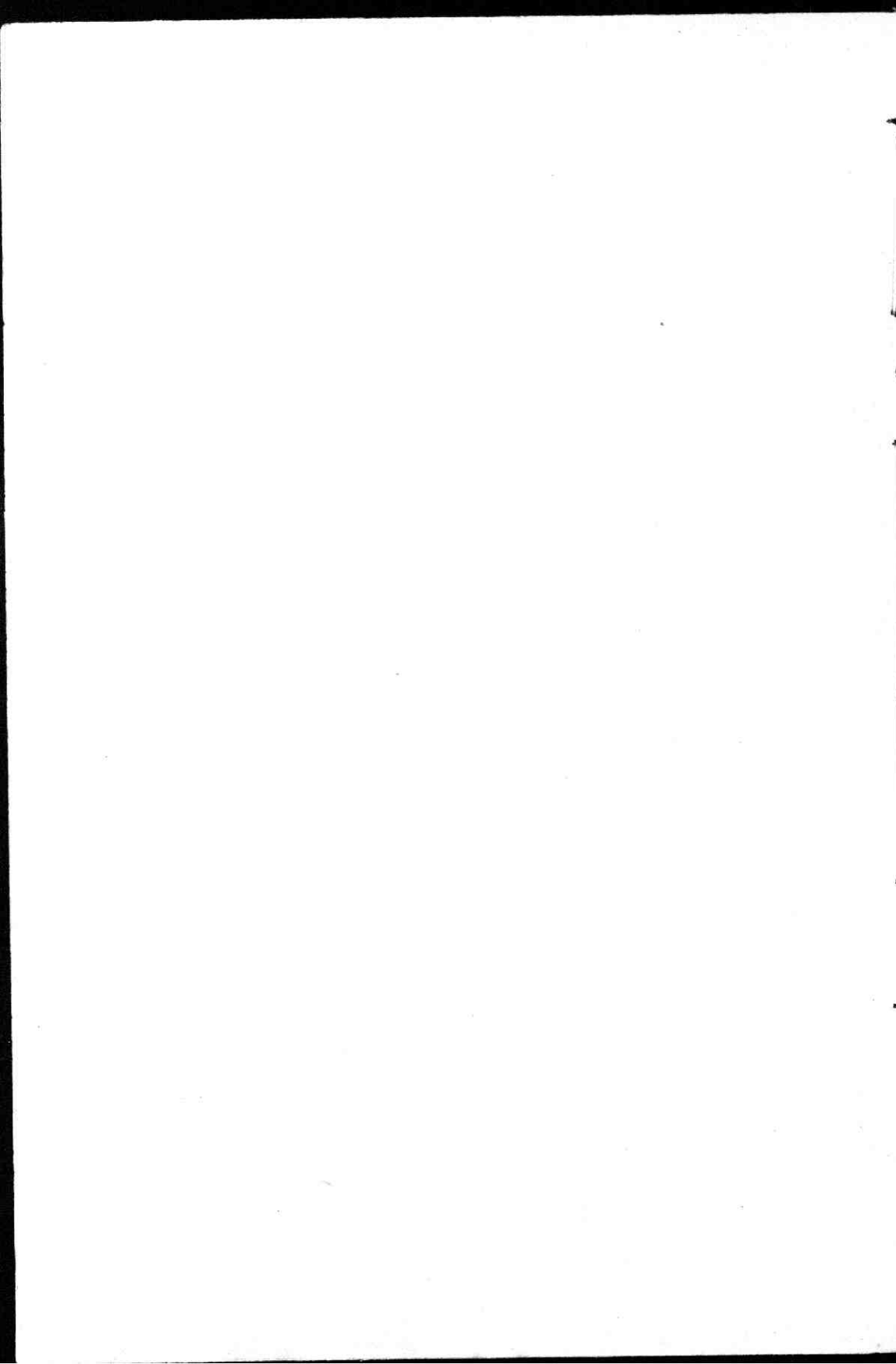
op Donderdag den 11^{den} December 1890, des namiddags te 4 uur,

DOOR

BONNE KOSTER,

geboren te Hoogeveen.

UTRECHT,
J. VAN BOEKHOVEN,
1890.



AAN MIJNE AANSTAANDE.

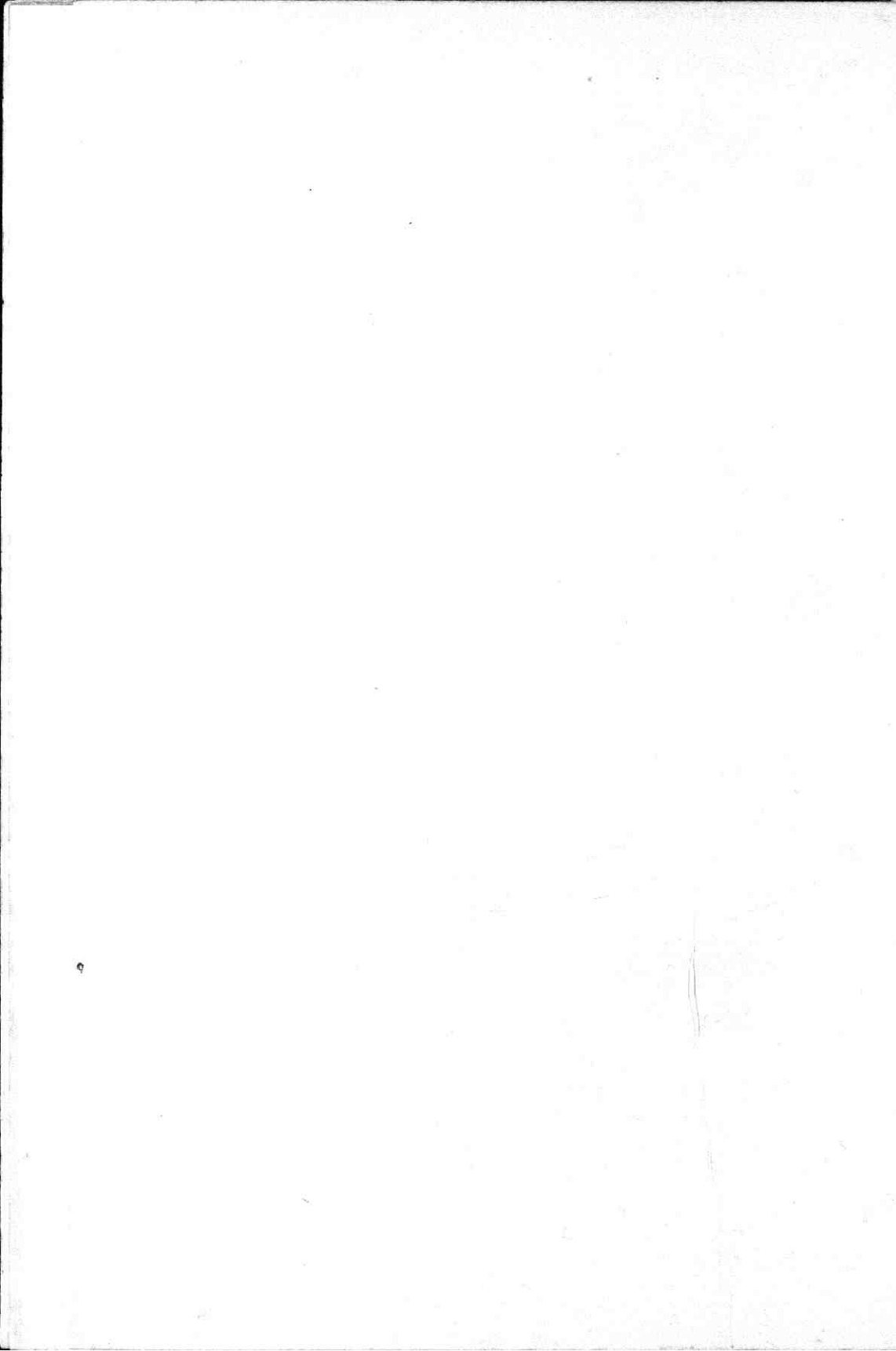
Bij het voltooiën van mijn proefschrift is het mij eene aangename taak U, Hooggeleerde Heeren Professoren en Zeergeleerde Heeren Lectoren, der Medische faculteit mijnen hartelijken dank te brengen voor het vele en goede dat ik van U heb mogen hooren, voor alles wat Gij tot mijne ontwikkeling hebt bijgedragen.

In het bijzonder geldt dit U, Hooggeleerde SPRONCK, Hooggeachte Promotor. Ontvang de verzekering dat ik uwe hulp en raad, mij bij de vervaardiging van dit proefschrift steeds zoo welwillend verleend, altijd in dankbare herinnering zal houden.

Zij het mij geoorloofd mij ook verder in uwe welwillendheid aan te bevelen.

INHOUD.

	Bladz.
Inleiding	1
HOOFDSTUK I.	
Morphologische en biologische eigenschappen van den bacil.	4
HOOFDSTUK II.	
Pathogene eigenschappen van den bacil	18
A. Proeven bij konijnen.	
<i>a.</i> Intraveneuse injectie van den bacil	18
<i>b.</i> Subcutane injectie	35
<i>c.</i> Intraperitoneale injectie.	43
<i>d.</i> Inoculatie in de cornea.	47
<i>e.</i> Inspuitingen in de maag	47
<i>f.</i> Proeven met bacillenvrije filtraten van bouillon-cultures	48
Aanhangsel.	
Injectie van door middel van verhitting geste- riliseerde cultures in de subcutis.	53
B. Proeven bij duiven	55
Résumé	58
STELLINGEN	67



INLEIDING.

De studie van een' tot dusver onbekenden pathogenen bacillus, maakt het onderwerp uit van mijn proefschrift.

Op grond van mijn onderzoek zal ik dezen bacillus den naam geven van *Bacillus pyogenes foetidus liquefaciens*.

De *Bacillus pyogenes foetidus liquefaciens* heeft, zooals later blijken zal, eenige overeenkomst met den *Bacillus pyogenes foetidus* van *Passet*¹⁾, maar wijkt aan den anderen kant van dezen laatste toch zoo belangrijk af, dat ik mij gerechtigd acht, den bacil als eene bijzondere species te beschouwen en met een' bijzonderen naam aan te duiden.

De door mij onderzochte bacil werd mij in het pathologisch Instituut der Rijks-Universiteit alhier in reiculture aangeboden. Hij was door professor *Spronck* gecultiveerd uit de lever van een' aan acute gele lever-atrophie overleden volwassen man.

Omtrent het oorzakelijk verband tusschen het ziekte-

1) *Passet*. Untersuchungen über die Aetiologie der eiterigen Phlegmone des Menschen. Berlin 1885.

proces en den bacil, dien ik bestudeerde, is niets bekend. Alleen dit wensch ik op te merken, dat het een geval van idiopathische lever-atrophie gold, en dat uit de lever, die 18 uren na den dood bacterioscopisch onderzocht werd, behalve de door mij bestudeerde bacil nog een tweede tot dusver onbekende, eveneens pathogene bacil werd geïsoleerd, terwijl eindelijk naast deze beide bacillen-species nog een groote, niet pathogene micrococcus werd aangetroffen. In het lijk werd nergens eenig absces of etterig ontstekingsproces gevonden.

Bij het uitzaaien van het sap der zieke lever waren reeds binnen 24 uren de agar-agar-platen, bij 33° C. geplaatst, met een bijna ontelbaar aantal kolonien bedekt, die verreweg voor het grootste aantal, kolonien bleken te zijn van den door mij onderzochten bacillus.

Kolonien van den bovengenoemden tweeden bacil, waren uiterst spaarzaam aanwezig, terwijl ook slechts enkele micrococcen-kolonien in de platen waren opgekomen.

Met deze waarneming vormt het microscopisch onderzoek van de lever een opvallend contrast; niettegenstaande de aanwending van de meest verschillende basische anilin-kleurstoffen en methoden, om bacterien in weefsels te kleuren, mocht het mij niet gelukken in de lever den bacillus pyogenes foetidus liquefaciens op te sporen. De oorzaak hiervan is evenwel gelegen, zooals later blijken zal, deels in de enorm geringe afmetingen van den bacil, deels

in de omstandigheid, dat de bacil uiterst moeilijk kleurstoffen opneemt en, wat wellicht vok van invloed is, binnen korten tijd involutievormen vertoont, die in het geheel niet meer tingeerbaar zijn. Ten aanzien van de lever, waaruit de bacillus pyogenes foetidus liquefaciens geïsoleerd werd, kan ik derhalve volstaan met te zeggen, dat zij het typische beeld der acute gele lever-atrophie aanbod, zoowel bij macroscopisch als bij microscopisch onderzoek.

Tevens wil ik niet nalaten hier te verklaren, dat ik juist het bestudeeren van dezen bacil gaarne tot onderwerp van mijn proefschrift heb gekozen, omdat ik daardoor in de gelegenheid werd gesteld, mij practisch in het bacteriologisch-experimenteel onderzoek te oefenen.

HOOFDSTUK I.

MORPHOLOGISCHE EN BIOLOGISCHE EIGENSCHAPPEN VAN DEN BACIL.

De bacil, wiens eigenschappen ik mij ten taak stelde in bijzonderheden te bestudeeren, biedt wat zijn vorm betreft, niets karakteristieks aan. Hij behoort tot de groep der kleinste bacillen, die wij thans door de onderzoekingen der laatste jaren nauwkeuriger hebben leeren kennen. Het staafje is uiterst eenvoudig van bouw, homogeen, de uiteinden zijn afgerond. De lengte van het staafje is vrij constant en vertoont geen merkbare verandering, op welken bodem de bacil ook gecultiveerd zij. Zij bedraagt gemiddeld 1.5 mikron. De breedte van den bacil is nauwlijks direct meetbaar, doch kan ongeveer op een vijfde tot een kwart van de lengteafmeting geschat worden.

In reïncultures treft men de bacillen, onverschillig welke de voedingsbodem zij, meestal als geïsoleerde cel-individuen aan. Bij nader toezien evenwel ontdekt men, dat somtijds twee cel-individuen met elkander verbonden zijn, terwijl slechts bij uitzondering schijn-

draden worden aangetroffen. De langste schijndraden, die ik in mijne cultures heb kunnen ontdekken bezaten eene lengte van 6 μ ., en deden zich voor als gebogen staafjes, waaraan met de beste objectieven geene geleding ontdekt kon worden. Onze bacillen vertoonen levendige eigenbewegingen. Zij dragen dus hoogstwaarschijnlijk cilien, hoewel ik daarvan niets heb kunnen waarnemen. De geringe afmetingen van den bacil gaven trouwens weinig hoop ook met de nieuwere methoden (*Löffler*) cilien te ontdekken.

De bacil neemt basische anilinkleurstoffen in het algemeen moeilijk op. De fraaiste tinctie verkreeg ik met eene geconcentreerde waterige oplossing van gentiaanviolet, waarmede ik de bacillen, vooral wanneer ik verwarming aanwendde, vrij intensief kon kleuren. Ook de methode van *Gram* is toepasselijk, hoewel de tinctie meestal relatief zwak uitvalt.

Löffler's methyleenblauw kleurt de bacillen slechts uiterst zwak, al laat men de kleurstof nog zoo lang inwerken. Andere methoden, tot het kleuren van bacillen gebruikelijk, gaven evenmin eenig resultaat.

De bacil vormt geen sporen. Het is mij althans niet gelukt daarvan iets waar te nemen. Wel vertoonen de bacillen zeer spoedig regressieve metamorphosen. Zij zwellen daarbij op, nemen de meest grillige vormen aan en kleuren zich niet meer, of onregelmatig. Regelmatig kon ik mijne cultures volkomen doen afsterven, wanneer ik ze gedurende een half uur in een waterbad van 60° C. dompelde.

Ik ga thans over tot de beschrijving mijner cultures.

De bacil groeit weelderig op gelatine en doet haar vrij snel vervloeien. Legt men een streep-culture op gelatine aan, dan ziet men bij gewone kamertemperatuur eene grijs-witte culture ontstaan, die evenwel door de vervloeiing van den voedingsbodem, die onmiddellijk met den groei van den bacil gepaard gaat, verder niets karakteristieks aanbiedt. Ter plaatse waar de met bacillen bezwangerde naald de oppervlakte heeft aangeraakt, ziet men reeds binnen 48 uren een gootvormige sleuf ontstaan, waarlangs de vervloeide gelatine met de bacillen naar den bodem van het buisje afvloeit. Men vindt dan de bacillen in den vorm van eene grijs-witte massa op den bodem van het buisje liggen. Na 3—4 dagen is de vervloeiing meestal nog aanmerkelijk voortgegaan en vindt men een dikke, vlokkige grijs-witte bacillen-massa uit de vloeistof uitgezonden.

Veel fraaier kan men de ontwikkeling van den bacil in steekcultures bestudeeren. Na 24 uren bespeurt men bij kamertemperatuur een grijs-wit streepje, dat zich over de geheele lengte van het steekkanaal vertoont, doch in het bovenste gedeelte daarvan veel krachtiger ontwikkeld is, dan in de diepte. Over de oppervlakte breidt zich de cultuur volstrekt niet uit; ook verheft zij zich niet ter plaatse van de enting boven het niveau. In tegendeel, na 3 dagen begint zich ter plaatse van de steekopening eene kleine inzinking te vertoonen, die regelmatig breeder en dieper wordt. Terwijl deze vervloeiing

zich aanvankelijk in den vorm van een horlogeglas voordoet, op welks bodem de bacillen uitgezakt zijn, vindt men meestal op den vierden dag de oppervlakte gelijkmatig vervloeid over eene hoogte van ± 5 mM. Vervolgens gaat de vervloeiing zeer langzaam en met horizontaal niveau naar beneden voort. Laat men zulk eene cultuur bij kamertemperatuur staan, dan ziet men, terwijl de groei in het steekkanaal geheel stil staat, de vervloeiing uiterst langzaam, maar gaandeweg voortschrijden. Zoo was eene steekculture, op 14 Maart aangelegd, die eene hoogte bezat van 6 cM., in Mei nog niet geheel vervloeid. Eerst op 4 Juni, dus na 83 dagen, was de gelatine geheel vloeibaar geworden; er lag eene dikke, grijze bacillen-massa op den bodem van het buisje, terwijl de daarboven staande vloeibare gelatine eene geringe troebelheid vertoonde. Reeds den tweeden dag verspreiden de boven beschreven cultures eene penetrante foetide lucht, die soms door den wattenprop heen, merkbaar wordt.

Bij de gelatine plaatcultures zal ik slechts kortelings stilstaan. Binnen 24 uren verschijnen grijs-witte ronde kolonies, die aan de oppervlakte der gelatine sneller en krachtiger groeien, dan daar waar zij beneden de oppervlakte gelegen zijn. Na 24 uren begint reeds vervloeiing, die verhindert, de verdere ontwikkeling der kolonies te vervolgen.

Na deze korte beschouwing der culture op gelatine wend ik mij tot die op agar-agar-gelei en wensch bij deze wat langer stil te staan.

Beschouwen we in de eerste plaats de plaatculturen. Onderzoekt men eene agar-plaatculture, die 24 uren bij kamertemperatuur gehouden is, zoo kan men daaraan met het bloote oog nog geene kolonies ontdekken. Microscopisch vindt men evenwel de kolonies, die in eerste ontwikkeling begrepen zijn zeer gemakkelijk. Bij zwakke vergrooting ziet men ze als min of meer onregelmatige, kantige of ster-vormige lichaampjes met grijs-gele tint. Ook bij sterke vergrooting blijken de randen dezer jeugdige kolonies zeer onregelmatig te zijn. Laat men de plaat verder bij kamertemperatuur staan, dan groeien de kolonies langzaam voort, worden langzamerhand voor het bloote oog zichtbaar, vertoonen eene grijs-witte tint en bereiken na 4 dagen ongeveer 1 m.M. in doorsnede. Bij zwakke vergrooting vindt men dan eene ronde kolonie met ietwat gekartelden rand, bij doorvallend licht lichtgeel van tint, terwijl in het centrum een donkerder gekleurd, bruin-gele, vrij scherp omschreven kern valt waar te nemen.

In de broeistoof bij 37° C. geplaatst, vindt men dat de platen reeds na 24 uren kolonies vertoonen, die voor het bloote oog zeer duidelijk zichtbaar zijn. Zij zijn rond, grijswit van kleur en zeer verschillend van grootte. De kolonies namelijk, die aan de oppervlakte van de plaat tot ontwikkeling zijn gekomen, of die de oppervlakte spoedig bereikt hebben, zijn 6 tot 10 maal grooter dan die welke zich onder de oppervlakte van de agar ontwikkelen. Bij microscopisch onderzoek gelijken zij op die hierboven bij kamer-

temperatuur beschreven. Beschouwt men ze bij zwakke vergrooting, dan herinneren zij eenigermate aan cellen met een kern voorzien. Deze laatste ligt nu eens in het midden dan weer aan de periferie van het cellichaam en doet dit laatste als het ware plaatselijk wat uitpuilen. Terwijl de kolonie aanvankelijk afgezien van de genoemde kern, die daarin constant aanwezig is, zich homogeen voordoet, ziet men ze eenige dagen later hare homogeniteit verliezen en vlekkelig worden, doordien op talrijke plaatsen minder doorschijnende plekken in de kolonie te voorschijn treden. Na 24 uren vertoonen de grootste kolonien eene doorsnede van 2—2.5 m.M. Na 4 dagen bij 37° C. vertoefd te hebben, maten de grootste kolonies 4 m.M. in doorsnede. Die, welke op de agar liggen zijn plat en verheffen zich een weinig boven het niveau. De veel kleinere en in ontwikkeling aanzienlijk achterblijvende, van de lucht afgesloten kolonies zijn daarentegen meestal lensvormig.

In streepcultuur op agar-agar-gelei groeit onze bacil bij 37° C. zeer levendig. Na 24 uren vindt men langs de geheele streep eene breede, vrij dikke, grijs-witte bacillen-massa. De cultuur heeft onregelmatige randen en is niet scherp begrensd. Aan den rand is de cultuur wat meer doorschijnend dan in het midden, waar zij min of meer korrelig is en een fijne, netvormige structuur laat waarnemen. In het algemeen is de cultuur glanzend, vochtig van oppervlak.

Bij 33° C. is de groei reeds duidelijk minder krachtig dan bij 37° C., terwijl bij kamertemperatuur de groei zeer aanmerkelijk geringer is. Laat men de temperatuur boven 37° C. stijgen, dan is aanvankelijk geen verschil in groei waar te nemen. Eerst wanneer de temperatuur tot 45° C. geklommen is, valt eene duidelijke vermindering van den groei te constateeren, terwijl bij 48° C. geen groei meer valt te bespeuren.

De steekcultuur in agar vertoont geene noemenswaardige bijzonderheden. Na 24 uren vindt men bij 37° C. een grijs-witte draad over de geheele lengte van het steekkanaal, in de nabijheid van de oppervlakte evenwel krachtiger ontwikkeld dan in de diepte. Laat men deze cultuur langeren tijd bij 37° C. staan, dan ziet men de cultuur, uitgaande van de steekopening, zich langzamerhand over de oppervlakte uitbreiden. Meestal wordt evenwel niet de geheele oppervlakte van het buisje door de cultuur in beslag genomen. Vaak is slechts de helft van de beschikbare oppervlakte met een grijs-wit laagje bedekt. Bij kamertemperatuur verhoudt zich de agar-steekcultuur op dezelfde wijze. Alleen is voor de ontwikkeling der cultuur veel meer tijd noodig.

Al de genoemde cultures vertoonen evenals gelatine cultures zeer spoedig eene penetrante, hoogst onaangename lucht. Streepcultures verspreiden dezen foetiden stank in hooge mate in de eerste periode van hunne ontwikkeling, terwijl de groei van de bacillen

zeer levendig is. Bij 37° C. is deze lucht na 24 uren het sterkst. Langzamerhand neemt zij af, en na eenigen tijd in de broeistoof gestaan te hebben is daarvan niets meer te bespeuren.

Op gestold runderserum groeit de bacil eveneens zeer levendig. Bij 37° C. is ook hier de groei het krachtigst. Over de geheele lengte van de entstreep ziet men bij deze temperatuur reeds na 24 uren eene sleufvormige inzinking beneden het nivean der omgeving, waarin eene grijs-witte bacillen-massa woerkt. Ook hier gaat dus evenals bij de ontwikkeling op gelatine, de groei onmiddellijk gepaard met vervloeiing. Na 3 dagen vindt men reeds een groot gedeelte van het serum vervloeid, terwijl eene grijs-witte bacillen-massa op den bodem is uitgezakt. Onder verspreiding van dezelfde penetrante stinkende lucht, waarvan hierboven melding is gemaakt, gaat dan de vervloeiing langzaam voort. Men vindt dan ten slotte eene bruinachtige vloeistof, terwijl op den bodem eene dikke grijs-witte massa bacillen is gezonken.

In bouillon is de groei van onze bacillen eveneens zeer levendig. Bij 33° C. geplaatst vindt men na 24 uren het kolfje troebel en ondoorschijnend geworden. Laat men de bouillon-culture bij dezelfde temperatuur rustig staan, dan valt in de eerstvolgende dagen daaraan niets bijzonders waar te nemen. Zij verspreidt evenwel eene sterk foetide lucht, die door den wattenprop heen dringt. Na 8 dagen aldus gestaan te hebben, ziet men evenwel eene verandering in de bouillon-cultuur optreden. Er

begint zich namelijk om dezen tijd aan de oppervlakte der bouillon een grijs-wit vliesje te vormen, terwijl de bouillon tevens eene donkerder tint aanneemt. Cultures, die zeer lang in de broeistoof gestaan hebben, vertoonen eene donker-roode kleur, terwijl het vliesje van de oppervlakte verdwenen is. De geheele bacillen-massa in de cultuur tot ontwikkeling gekomen, vind ik dan op den bodem liggen in den vorm van eene homogene, grijs-witte massa, terwijl het daarboven staande vocht vrij doorschijnend was.

Onze bacillen groeien voorts evenzoo weelderig in melk en op aardappelen. In gesteriliseerde melk uitgezaaid, bij 33° C. geplaatst, bespeurt men in de eerste twee dagen geene verandering aan de vloeistof; alleen verspreidt de cultuur na 48 uren de reeds meermalen genoemde foetide lucht. Laat men de cultuur bij dezelfde temperatuur staan, dan ziet men na enkele dagen aan de oppervlakte der melk een dik vlies ontstaan, de geheele oppervlakte bedekkend. Onder genoemd vlies, dat een geel-witte kleur vertoont, ziet men dan gaandeweg het vocht donkerder worden. Aanvankelijk ziet de vloeistof er uit alsof de melk met vuil water vermengd ware, maar langzamerhand wordt het vocht troebel, terwijl de geel-witte massa aan de oppervlakte blijft drijven. Nog later vindt men op den bodem een donker, troebel bezinksel.

Tot besluit eenige woorden over de aardappelcultuur. Op gesteriliseerde aardappelschijfjes uitge-

zaaid, levert de bacil bij 37° C., reeds binnen 24 uren eene voor het bloote oog zichtbare, grijs-gele, bruine, glanzende cultuur, die geen neiging vertoont om zich over de beschikbare oppervlakte uit te breiden, veeleer vrij scherp omschreven is. Ook bij langer verblijf in de broeistof breidt zich de cultuur, die zich duidelijk boven het niveau verheft, niet over de oppervlakte uit. Ook bij kamertemperatuur groeit de bacil op aardappelen, maar ook hier veel langzamer dan bij lichaamstemperatuur. Ook verpreiden aardappel-culturen dezelfde eigenaardig penetrante, foetide lucht. Ja, de ontwikkeling dezer lucht schijnt hier nog sterker, dan bij de ontwikkeling van den bacil op andere voedingsbodems.

Na deze beschouwing van den groei van onzen bacil op de meest gebruikelijke voedingsbodems wend ik me tot het onderzoek van zijn' groei, bij afwezigheid van zuurstof. Ik ben daarbij te werk gegaan als volgt: Groote met een guttapercha-stop afgesloten reageerbuizen, werden tot op $\frac{1}{4}$ der hoogte met agar-agar-gelei gevuld. In genoemden stop bevonden zich twee openingen. In elk dezer openingen bracht ik een glazen buisje, het eene tot op den bodem van de reageerbuis reikend, het tweede tot even beneden de opening van den stop. Nadat de uitwendige opening der rechthoekig omgebogen glazen buizen met wattenpropjes afgesloten waren, werden een aantal van aldus samengestelde apparaten

in toto gesteriliseerd in stoom van 100° C. Na deze bewerking plaatste ik de reageerbuizen in een waterbad van 35° C. om de agar vloeibaar te houden en voerde gedurende 45 minuten een stroom van waterstofgas door de agar heen, om aldus de in de agar aanwezige zuurstof te verdrijven. Vervolgens liet ik de agar-agar-gelei bij schuinen stand der buisjes stollen, terwijl ik er voor zorg droeg, dat het uiteinde van het tot op den bodem van de reageerbuis reikende buisje zich boven het niveau der gestolde agar bevond. Vervolgens opende ik de reageerbuizen, legde streepculturen met de bacillen aan, en sloot ze vervolgens weder. Nu leidde ik nogmaals gedurende 15 minuten een stroom van waterstof door de toestellen, waarbij de reageerbuizen met de stoppen naar beneden gehouden werden en de waterstof langs de langste buis toestroomde. Eindelijk werden de glazen buisjes dichtgesmolten en de guttapercha-stoppen met een laag paraffine bedekt. Aldus kon ik er zeker van zijn, dat in de agar geen zuurstof meer aanwezig was, en dat zich ook daarboven een zuurstofvrije atmosfeer bevond.

Plaatste ik de aldus geënte buisjes in de broei-stoof bij eene temperatuur van 33° C. dan bleek de groei aanzienlijk geringer dan bij aanwezigheid van zuurstof. Na 24 uren was in de buizen slechts een uiterst dun grijs-wit laagje bacillen tot ontwikkeling gekomen, bij opvallend licht nauwelijks, bij doorvallend evenwel duidelijk te constateeren. Ook de

volgende dagen werd deze cultuur niet volumineuser, veeleer scheen zij zeer spoedig in ontwikkeling volkomen te blijven stilstaan.

Men ziet derhalve, dat onze bacil bij aanwezigheid van zuurstof veel levendiger groeit, dan in een waterstof-atmosfeer, maar dat zijn groei door de afwezigheid van zuurstof niet geheel wordt uitgedoofd. Ik kan dus den bacil tot de groep der facultatief anaërobieën rekenen, waartoe, zooals bekend is, verreweg de meeste der bekende pathogene bacteriën behooren.

Tevens valt op te merken, dat de bacil bij zijn' ontwikkeling in een waterstof-atmosfeer evengoed als bij aërobieose eene foetide lucht verspreidt. Ik meende althans deze lucht in mijne waterstof-cultures te bespeuren, ofschoon zij overeenkomstig den geringeren groei der bacillen veel zwakker was, dan onder gewone omstandigheden.

Er rest mij nog, mijne ervaringen mede te deelen omtrent de levensvatbaarheid der cultures. Bij overenting van cultures, die meerdere weken oud waren, en zonder eenigen voorzorgsmaatregel om uitdrooging tegen te gaan, gewoon bij kamertemperatuur, en enkel met een wattenprop afgesloten, bewaard waren, bleek al spoedig, dat de bacillen, hoewel, zooals wij boven zagen van sporen-vorming geen sprake was, hunne levensvatbaarheid geruimen tijd behielden. Steeds ontwikkelden zich volumineuse cultures reeds binnen 24 uren, wanneer ik eene kleine quantiteit der oude cultuur op agar uitzaaide en de buisjes bij lichaams-

temperatuur plaatste. Verder en verder tot oudere cultures opklimmend, bleek dat de levensvatbaarheid der bacillen zeer lang behouden blijft. Ten bewijze daarvan wil ik slechts vermelden, dat eene agar-cultuur op 5 Maart 1890 gekweekt, op den 9 Juli daaraanvolgend, dus na 4 maanden, nog volkomen levensvatbaar bleek (Proef 4). Eene bouillon-culture op 15 Januari 1890 gekweekt, en vervolgens bij kamertemperatuur aan zich zelve overgelaten, bleek op 12 Juni van hetzelfde jaar, derhalve na 5 maanden, nog volkomen levensvatbaar. Het komt mij waarschijnlijk voor, dat de cultures hare vitaliteit nog veel langer bewaren, dan uit de aangehaalde feiten blijkt.

In hoeverre eene vergelijking van onzen bacillus met de tot dusver bestudeerde species, punten van verschil of van overeenkomst aanbiedt, wensch ik hier nog niet na te gaan, omdat ook zijne pathogene eigenschappen, die ik in een volgend hoofdstuk wensch te bespreken, bij die vergelijking van overwegende beteekenis zijn.

In het algemeen wensch ik echter nu reeds op te merken dat de bacil, wat zijne cultureele eigenschappen betreft, zeel veel overeenkomst aanbiedt met een aantal saprogene schizomyceten. Zijn weelderige groei op alle voedingsbodems, die ik hem aanbod en de productie van stinkende gassen, gepaard met vervloeiing, wijzen daarop. Tevens blijkt, en uit

het feit dat de bacil zoo weinig kieskeurig is met betrekking tot den voedingsbodem, in uit de omstandigheid dat zijn groei bij zoo verschillende temperaturen een levendige is, dat wij hier te maken hebben met een bacillen species, die ook in de buitenwereld, dat is buiten het organisme, zich hoogstwaarschijnlijk zeer gemakkelijk zal kunnen vermenigvuldigen.

HOOFDSTUK II.

PATHOGENE EIGENSCHAPPEN VAN DEN BACIL.

Reeds bij de eerste infectie-proeven, die met den in het vorige hoofdstuk bestudeerden bacil verricht werden, kwam aan het licht, dat de zooals boven gezegd uit de lever van den mensch geïsoleerde bacil pathogeen was voor het konijn. Ik zal hier niet in den breede over mijne voorloopige proeven uitweiden, daar de mededeeling van de resultaten dier proeven door een later onderzoek overbodig geworden is.

Ik wend mij daarom onmiddellijk tot de systematische beschouwing van enkele proefreeksen bij konijnen en bij duiven verricht.

A. PROEVEN BIJ KONIJNEN.

a. *Intraveneuse injecties van den bacil.*

Wanneer men bij een volwassen konijn eene ruime hoeveelheid van eene troebele bacillen-suspensie, verkregen door eene jeugdige, een tot twee

dagen oude, agar-agar-culture met gesteriliseerd water aan te mengen, of eene ruime hoeveelheid van eene bouillon-culture onder de noodige voorzorgsmaatregelen in de oor-vena injicieert, dan ziet men, dat het dier reeds na enkele uren ziekteverschijnselen vertoont. Het dier gaat rustig ineengedoken in een' hoek van het hok zitten, het eet niet meer en sterft meestal reeds binnen 24 uren. Het eenige verschijnsel, dat bij het konijn nog de aandacht trekt, is de bijzondere frequentie der ademhaling, die aan den dood voorafgaat.

Na den dood vindt men regelmatig de organen der buikholte hyperaemisch. Daarnaast vond men eene enkele maal op verschillende plaatsen in het lijk kleinere en grootere bloeduitstortingen in het subperitoneale weefsel, in de mucosa van het darmkanaal, in het pancreas, in de pleura en in het pericardium. Overigens kon het bloote oog in het lijk geene verandering ontdekken.

Zaait men een weinig lever-sap of een druppel bloed, met een platina lis uit het hart genomen, op agar-agar uit, dan ontwikkelen zich zeer spoedig een groot aantal kolonien van den bacil, waarmede het dier geïnfecteerd werd. Agar-agar-buisjes, waarop een druppel vocht uit de voorste oogkamer of een druppel sereus vocht uit de peritoneaal holte werd uitgezaaid, bleven daarentegen volkomen steriel.

Geheel anders daarentegen verloopt het ziekteproces, wanneer men eene kleinere quantiteit eener bacillen-suspensie in de oor-vena injicieert. Nu blij-

ven de proefdieren korter of langer tijd in leven, al naar mate de geïnjecteerde quantiteit bacillen grooter of kleiner is. Maar al is de quantiteit bacillen ook relatief zeer klein, toch volgt voor zoover ik uit mijne proeven kan afleiden, de dood van het proefdier, al sterft het ook eerst na geruimeren tijd. Bij deze dieren nu vindt men bij de obductie het typische beeld der pyaemie. Zoowel in de klierachtige organen, alsook tusschen de spieren en in de andere weefsels van het lichaam treft men talrijke abscessen aan, die daaromtrent geen twijfel laten bestaan. In sommige gevallen was het aantal dezer abscessen enorm groot en vond ik voornamelijk de lever, de milt en de nieren met kleinere of grootere abscessen bezaaid. In andere gevallen was het aantal abscessen in de inwendige organen kleiner, maar bleken tusschen de spieren en in het subcutane weefsel van romp en ledematen een groot aantal abscessen aanwezig te zijn. De genoemde abscessen bevatten een dikken breiachtigen etter, die volstrekt geen foetide lucht bezit, maar waarin met behulp der cultuur de aanwezigheid van onzen bacil in vrij grooten getale in alle gevallen, die daarop werden onderzocht, regelmatig kon worden aangetoond.

Bij het bacterioscopisch onderzoek van het bloed dezer aan pyaemie te gronde gegane dieren bleek nu eens dat daarin de geïnjecteerde bacillen aanwezig waren, dan weer dat zij ontbraken.

Ten bewijze van het hierboven vermelde laat ik hier de protocollen mijner proeven volgen.

Proef 1.

28 Nov. 89. Bij een zwart konijn, dat 1900 gram weegt, wordt eene met gesteriliseerd water aangemengde agar-agar-cultuur, die acht dagen oud is (33° C.), in de oor-vena gespoten.

In genoemde cultuur zijn de bacillen bij microscopisch onderzoek nauwelijks te herkennen, zoo aanzienlijk zijn de degeneratieve veranderingen, die de bacillen vertoonen. De bacillen zijn echter volkomen levensvatbaar, zooals bij uitzaaiing blijkt.

29 Nov. Heden ochtend wordt het dier dood in het hok gevonden. Bij de obductie vindt men de milt hyperaëmisch. Ook de lever en de nieren zijn bloedrijk. Overigens valt in het lijk niets bijzonders te constateeren.

Van de onder behoorlijke voorzorgsmaatregelen opengesneden lever wordt een weinig bloederig sap op twee agar-agar buisjes geënt. Deze buisjes vindt men reeds na 24 uren met een groot aantal kolonies bedekt, allen bestaande uit de bij het konijn in het bloed geïnjecteerde bacillen.

Proef 2.

29 Nov. 89. Bij een zwart konijn, wit gevlekt, 1570 gram wegend, wordt ten 11 ure 1 cm^3 . van eene troebele bacillen-suspensie, verkregen door eene 24 uren oude cultuur met gesteriliseerde keukenzoutoplossing aan te mengen, in de oor-vena gespoten.

30. Nov. 89. Heden ochtend ten 9 ure sterft het dier. De eenige verschijnselen, die waargenomen werden, waren frequente ademhaling en ontbreken van eetlust. In het hok vond men dunne ongevormde faeces. Bij de obductie vindt men behalve eenige hyperaemie van lever, milt en nieren geene verdere afwijkingen.

Proef 3.

18 Juni 90. Van eene agar-agar culture, (24^o generatie) die 24 uren oud is, wordt eene troebele suspensie gemaakt door aanmenging met 2 cM³. gesteriliseerd water. Deze wordt ten 3 ure in toto geïnjectieerd in de oor-vena van een wit konijn, dat 1970 gram weegt.

Het dier, dat voor de injectie levendig en vroolijk rondsprong, zit een uur na de injectie stil ineengedoken in een hoek van het hok en neemt geen voedsel.

19 Juni 90. Heden ochtend ten 9 ure vind ik het dier dood in het hok. Bij de obductie blijkt de lever donkerrood van kleur. De milt is gezwollen, blauwrood. Ook de nieren zijn hyperaemisch. In de serosa der maag worden enkele bloeduitstortingen gevonden. Aan het slijmvlies der sterk gevulde maag valt niets bijzonders te constateeren; daarentegen treft men in de mucosa van het geheele darmkanaal talrijke stipvormige haemorrhagien aan. Ook in het pancreas, de pleurae pulmonales, het pericardium vindt men kleine bloeduitstortingen. Overigens worden in het lijk macroscopisch geene afwijkingen gevonden.

Onder de noodige voorzorgsmaatregelen wordt een weinig leversap, voorts een druppel vocht uit de voorste oogkamer en uit de peritoneale holte op agar-agar-gelei uitgezaaid.

20 Juni 90. Van de gisteren geënte buisjes, die bij 33° C. vertoefden, vertoonen de met leversap bezaaide een ontelbaar aantal volkomen overeenkomstige, glanzende, grijs-witte koloniën, waarvan het microscopisch onderzoek leert, dat zij uit dezelfde bacillen bestaan, die bij het dier in het bloed waren gespoten. De overige buisjes zijn geheel steriel gebleven en ook, nadat zij meerdere dagen in de broeistoof vertoefden, kwam daarin geene verandering.

Proef 4.

9 Juli 90. Gisteren werd eene sinds 5 Maart 1890 bij gewone kamertemperatuur bewaarde agar-agar-cultuur of agar-agar-gelei overgezet en bij 33° C. gekweekt.

Heden ochtend is eene fraaie dochter-cultuur verkregen, die met 2 cM³. gesteriliseerd water wordt aangemengd en in toto in de oor-vena van een grijs konijn wordt ingespoten. (Lichaamsgewicht 2600 gram). De injectie vond plaats heden ochtend te half twaalf en te twee ure 's namiddags ligt het dier reeds dood in het hok. Bij de onmiddellijk na den dood verrichte obductie, vind ik in het peritoneum nergens bloeding; de vaten van het mesenterium en van het darmkanaal zijn evenwel sterk geïnjecteerd. De lever is hyperaemisch. De milt blauwrood en gezwollen;

ook de nieren zijn donkerrood van kleur. In de mucosa van maag en darmkanaal zijn geene haemorrhagien aanwezig. Uit het rechter hart wordt een platina lis bloed op agar-agar-gelei uitgezaaid. Ook van de doorsnede der lever wordt een weinig sap op agar-agar geënt.

10 Juli 90. Al de gisteren met bloed en leversap geënte agar-agar buisjes vertoonen talrijke koloniën van de in het bloed geïnjecteerde bacillen.

Proef 5.

28 Juni 90. Van eene bouillon-culture, die 16 dagen bij 33° C. heeft gestaan, worden 3 cM³. gespoten in de oor-vena van een geel konijn (Lichaamsgewicht 2480 gram). De injectie geschiedt 's morgens ten 11 ure. Het dier was voor dien tijd zeer levendig. 's Middags ten twee ure ligt het proefdier op zijde in het hok. Het is zeer kortademig, laat zich niet opjagen, de ooren hangen langs den kop naar beneden.

Het dier maakt den indruk van zwaar ziek te zijn.

29 Juni 90. Het proefdier wordt dood in het hok gevonden. Het lichaamsgewicht bedraagt 2470 gram.

Obductie: De milt is onveranderd. De lever en nieren zijn bleek, evenals de hartspier. De longen zijn sterk hyperaemisch. De maag is gevuld. Nergens worden haemorrhagien aangetroffen.

Uit lever en hart wordt uitgezaaid op agar-agar en deze wordt bij 33° C. geplaatst.

29 Juni 90. Er zijn zeer talrijke kolonien, rein-cultures der ingespoten bacillen, opgekomen.

Proef 6.

10 Juli 90. Men spuit heden ochtend in de oor-vena van een wit-grijs konijn (lichaamsgewicht 1090 gram) $1\frac{1}{2}$ cM³. eener bouillon-culture, die 48 uren oud is. 's Middags zit het dier ineengedoken in het hok. Het maakt den indruk van niet wel te zijn.

11 Juli 1890. Het proefdier wordt 's morgens 9 uur dood in het hok gevonden. Het dier weegt 1040 gram.

Obductie: De lever is donker gekleurd. De milt en de nieren zijn bleek. De vaten van het mesenterium zijn matig geïnjectieerd. De maag is gevuld. De mucosa van de maag evenals die van de darmen is normaal. Nergens worden haemorrhagien gevonden. Het vocht uit de lever en het bloed uit het hart worden uitgezaaid op agar-agar. Deze agar-agar, bij 33° C. geplaatst, vertoont 24 uren later talrijke kolonien van reïncultures der geïnjectieerde bacillen.

Proef 7.

2 Dec. 89. Van eene agar-agar-culture, die gedurende 20 uren bij 33° C. vertoefde, wordt door aanmenging met gestereliseerde physiologische zout-solutie eene weinig troebele bacillen-suspensie gemaakt en hiervan bij een zwart konijn dat 2280 gram weegt, 0.3 cM³. in de oor-vena geïnjectieerd.

4 Dec. 89. Het proefdier heeft tot dusverre gene ziekteverschijnselen vertoond. Het dier springt vroolijk rond en eet goed.

22 Dec. 89. Het dier, dat aanzienlijk vermagerd is ligt dood in het hok. Ter plaatse waar de injectie in de oor-vena geschiedde, vindt men een etterend ulcus, ontstaan na afstooting van een stukje gene-crotiseerd weefsel. De inwendige organen zijn be-zaaid met talrijke abscessen, waarvan de kleinste zich als geel-witte stippen voordoen; de grootste abscessen hebben den omvang bereikt van eene kleine kers en bevatten een breiachtigen, dikken etter, die geen foetide lucht verspreidt. Het grootste aantal abscessen vindt men in de lever en in de be-langrijk vergrootte milt. In de nieren is het aantal abscessen kleiner. In de longen worden slechts enkele abscessen gevonden, terwijl ook in de hartspier een paar kleinere etterhaarden worden aangetroffen. In de spieren en in het subcutane bindweefsel worden nergens etterhaarden gevonden. Daar het dier reeds meerdere uren dood in het hok heeft gelegen, worden de organen en abscessen niet bacterioscopisch onderzocht. Van de lever en de milt, in alcohol ge-hard, worden fijne doorsneden na insmelting in paraf-fine vervaardigd. In deze doorsneden vindt men naast de reeds voor het bloote oog zichtbare abscesjes nog een groot aantal kleinere. Verder valt aan deze laat-sten nog duidelijk te constateeren, dat men inderdaad met beginnende absces-vorming te doen heeft, geken-merkt door plaatselijke ophooping van een groot aantal leucocythen in het weefsel. Voorts kan men in elke doorsnede de verschillende stadia van de ontwikkeling der abscessen gemakkelijk vervolgen

en constateeren, dat in het centrum der infiltraten weldra necrose van het praeëxisterend weefsel plaats heeft, gepaard met een te gronde gaan der aldaar opgehoopte leucocythen, waaraan zich dan blijkbaar spoedig eene verweeking van het centrum aansluit. Aan coupes met gentiaan-violet gekleurd, zijn ook met de beste immersie-systemen slechts uiterst weinig bacillen te ontdekken. Ja, in vele abscessen gelukt het niet eens met den microscoop een enkele bacil te vinden. Waar zij gevonden werden, lagen de kleine bacillen tusschen de cellen aan den rand der etterige infiltraten.

Proef 8.

17 April 90. Eene agar-agar-culture (16^o generatie), die 48 uren oud is, wordt aangemengd met 3 cM³. gesteriliseerd water en van deze suspensie wordt 1 cM³. gespoten in de oor-vena van een grijs-wit konijn, gemerkt met pikrinzuur aan den kop, gewicht 1615 gram. De injectie had in de eerstvolgende dagen geen merkbaren invloed op het dier. Ik woog het van tijd tot tijd en constateerde daarbij de volgende gewichtsvermindering.

Het proefdier weegt op 19 April 90 1480 gram.

” ” ” ” 24 ” ” 1280 ”

29 April. Het proefdier, dat 1100 gram weegt, wordt gedood en verliest daarbij veel bloed. Bij de obductie worden geene abscessen in de lever gevonden. In den darmwand bevinden zich multiple abscessen en in den processus vermiformis vele folli-

culaire ulcera. De nieren zijn bleek. De milt is niet vergroot. Geen eiwit in de urine. Langs de 6 bovenste ribben aan de linkerszijde worden multiple abscessen gevonden. Ook langs de voorpooten worden abscessen aangetroffen, deels met eene weeke, deels met eene half vaste massa gevuld, die absoluut geen foetide lucht verspreidt. Deze abscessen zijn veel grooter dan die langs de ribben. Het vocht uit de lever en dat uit de rib-abscessen wordt uitgezaaid op agar-agar. Op de agar-agar uit de lever geënt, zijn na 24 uren talrijke kolonien opgekomen, die zoowel bij macroscopisch als microscopisch onderzoek blijken te bestaan uit reinculturen der ingespoten bacillen.

Ook de agar-agar, uit de rib-abscessen geënt, is na 24 uren, met eene diffuse culture bedekt. Deze culture bleek ook eene reiculture der gebruikte bacillen te zijn.

Proef 9.

17 April 90. Bij een haaskleurig konijn injectieer ik 1 cM³. van dezelfde bacillen-suspensie, bij proef 8 gebruikt, in de oor-vena. Lichaamsgewicht 2125 gram.

In de eerste dagen na de injectie en ook de daarop volgende viel aan het proefdier alleen eene vermindering van het lichaamsgewicht te constateeren, zooals blijkt uit de volgende cijfers.

Op 19 April 90 weegt dit proefdier 1870 gram.

"	21	"	"	"	"	"	1830	"
"	24	"	"	"	"	"	1660	"

Op 28 April 90 wordt dit proefdier dood gevonden. Lichaamsgewicht 1425 gram.

Obductie: De lever is sterk gezwollen, donker gekleurd, bezaaid met multiple hardjes, die grijs-wit van kleur, tegen de omgeving sterk afsteken. Enkele van deze hardjes hebben de grootte van een speldekknop. De galblaas bevat eene zeer bleeke gal. De milt is gezwollen en doorzaaid met kleine abscessen. De maag is weinig gevuld. De dikke darmen bevatten veel weeke faeces, terwijl onder in het darmkanaal enkele normale faeces gevormd zijn. In het mesenterium zijn enkele bloeduitstortingen.

De nieren, die bleek zijn, vertoonen dezelfde hardjes, echter in veel geringer aantal dan milt en lever. In de gefiltreerde urine, uit de blaas ontlast, wordt veel eiwit aangetoond. In de samengetrokken hartspier zijn macroscopisch geene harden te zien.

De longen zijn rose van kleur, met uitzondering van de rechter onderkwab, die gedeeltelijk rood is en waarin enkele grijs-witte stipjes zijn waar te nemen; overigens valt aan de longen niets bijzonders te constateeren. In het subcutane bindweefsel op den rug werd een absces gevonden.

Op de plaats van inspuiting in het oor is oedeem der omgeving en oppervlakkige necrose der huid, die er gemakkelijk wordt afgeschraapt.

In de oor-vena vindt men een zwart stolsel.

In de hersenen is geene verandering te zien.

Proef 10.

12 Juni 1890. Eene 24 uren oude culture (22^e generatie) wordt aangemengd met 3 cM³. gesteriliseerd water. Van dit mengsel wordt $\frac{1}{2}$ cM³. gespoten in de oor-vena van een wit-grijs konijn.

Ook bij dit proefdier valt weer eene vermindering in lichaamsgewicht te constateeren, zooals blijkt uit de volgende opgave:

Lichaamsgewicht op	12 Juni 1890:	1830	gram.
„	„	13	„
„	„	14	„
„	„	15	„
„	„	17	„
„	„	18	„
„	„	19	„

Op 13 Juni en volgende dagen zit het dier met opstaande haren ineengedoken in het hok. Het gebruikt weinig of geen voedsel en maakt den indruk van ziek te zijn. De beweging der achterpooten is gestoord, echter niet in die mate als bij het dier in proef 11 vermeld. Hier is slechts eene stijfheid der achterpooten, die op 17 Juni iets is verbeterd.

Op 19 Juni 1890 vindt men het dier dood in het hok. Bij de autopsie wordt de lever bleek en broos gevonden. In de pyramides der nieren zijn talrijke zeer kleine abscessen. De milt is gezwollen. De follikels zijn duidelijk te zien. Er zijn geene abscessen in te constateeren. De maag en het darmkanaal

vertoonen geene afwijkingen. In den linker longtop bevindt zich een absces. Verder zijn in de longen en in het hart geene afwijkingen te constateeren.

Er is oppervlakkige necrose van de huid op de plaats van injectie aan het linker oor.

In het subcutane celweefsel aan den hals links worden talrijke abscessen aangetroffen, waaronder enkele groote.

De vochten uit het oog, het hart, de lever en uit een der abscessen aan den hals, worden uitgezaaid op agar-agar en deze bij 33° C. geplaatst.

Na 24 uren zijn op de agar-agar, uit het absces geënt, ontelbare grijs-witte kolonien opgekomen, die macroscopisch volkomen gelijken op kolonien der ingespoten bacillen.

Op de agar-agar, met de vochten uit de andere organen geënt, is geen groei te bespeuren.

Proef 11.

12 Juni 1890. Van de bacillen-suspensie bij proef 10 gebruikt, wordt $\frac{1}{2}$ cM³. geïnjecteerd in de oor-vena van een wit-grijs konijn, gemerkt met pikrinzuur voor den kop.

Ook bij dit dier treedt duidelijk vermindering in lichaamsgewicht op, zooals blijkt uit de volgende cijfers:

Lichaamsgewicht op 12 Juni 1890: 2080 gram.

”	”	”	13	”	”	1905	”
”	”	”	14	”	”	1850	”
”	”	”	16	”	”	1750	”

Lichaamsgewicht op 17 Juni 1890: 1650 gram.

” ” ” 18 ” ” 1620 ”

” ” ” 19 ” ” 1580 ”

Op 13 Juni is er parese der achterste extremiteiten. Het proefdier zit ineengedoken, met opstaande haren in het hok. Het gebruikt weinig of geen voedsel. Deze toestand blijft de volgende dagen dezelfde.

18 Juni. De beweging der achterpooten is geheel verdwenen. Het dier ligt plat op den grond en vertoont, wanneer het aan de extremiteiten wordt vastgehouden, nu en dan hevige abnormale bewegingen, die op krampen gelijken. Het dier schijnt zeer ziek te zijn.

19 Juni. 's Morgens ten 12 ure is het dier geheel stijf. Het schijnt bij aanraking veel pijn te hebben. 's Middags ten 3 ure wordt het dier dood gevonden.

Obductie: De lever die zeer bleek en broos is vertoont een paar zeer kleine abscessen. In de schors der bleeke nieren vindt men enkele zeer kleine abscessen. De milt is gezwollen. De follikels zijn duidelijk te zien. Er zijn geene abscessen in de milt. De maag is weinig gevuld. Zij vertoont geene afwijkingen evenmin als het darmkanaal.

In longen en hart zijn geene veranderingen. Subcutaan worden geene abscessen aangetroffen. Aan het oor is de huid necrotisch op de plaats van injectie.

Proef 12.

9 Juli 90. Van eene agar-agar-culture, sinds 5 Maart 1890 bij gewone kamertemperatuur bewaard,

wordt met 2 cM³. gesteriliseerd water eene weinig troebele suspensie gemaakt.

De geheele suspensie wordt ingespoten in de oor-vena van een haaskleurig konijn. Lichaamsgewicht 1600 gram.

Het proefdier is de volgende dagen lusteloos en eet weinig; er valt ook hier weer eene vermindering in lichaamsgewicht te constateeren.

Op 12 Juli 1890 weegt dit proefdier 1230 gram.

Op 5 Augustus 1890 weegt dit proefdier 930 gram.

6 Augustus 1890. Het proefdier wordt dood in het hok gevonden en weegt 920 gram.

Obductie: In de buikholte wordt een weinig helder vocht gevonden. De lever en de milt zijn donker gekleurd. De nieren zijn bleek. De maag is weinig gevuld. Het slijmvlies van maag en darmen is normaal.

De hartspier en de linkerlong zijn normaal.

In de onderkwab van de rechterlong wordt een groot absces gevonden.

Aan het oor wordt op de plaats van injectie eene oppervlakkige necrose aangetroffen. Ook vindt men aldaar nog een klein absces.

Proef 13.

28 Juni. Van eene bouillon-culture, die 16 dagen bij 33° C. heeft gestaan, worden 2 cM³. geïnjecteerd in de oor-vena van een haaskleurig konijn van 1530 gram lichaamsgewicht. Het dier dat 's morgens ten 11 ure is geïnfecteerd, maakt 's middags ten 2 ure

den indruk van niet wel te zijn. In het hok worden dunne faeces gevonden.

30 Juni. Het proefdier schijnt veel beter te zijn dan een paar dagen te voren. Ook hier volgt wederom eene vermindering in lichaamsgewicht.

Op 30 Juni weegt dit proefdier 1350 gram.

„	2	Juli	„	„	„	1270	„
„	4	„	„	„	„	1280	„
„	8	„	„	„	„	1345	„
„	10	„	„	„	„	1370	„

4 Juli. Het dier schijnt gezond te zijn, het laat het oor, waarin de injectie heeft plaats gehad, langs den kop hangen.

8 Juli. Op de plaats van injectie vindt men aan het rechteroor een necrotisch stuk, lang 3 à 4 cM. en breed 1 cM. Het blijkt nu dat er zich een absces gevormd heeft op de grens van necrotisch en gezond weefsel, dat de geheele dikte van het oor inneemt. De etter uit dat absces wordt uitgezaaid op agar en deze bij 33° C. geplaatst.

Na 24 uren zijn talrijke kolonien der ingespoten bacillen op deze agar opgekomen.

Op 10 Juli wordt het proefdier gedood.

Bij de autopsie vindt men de lever bleek en broos. Hoewel spaarzaam, worden toch enkele zeer kleine abscessen in de lever aangetroffen. Milt en nieren zijn normaal. De maag is gevuld. De darmen zijn

normaal. De hartspier is bleek. De longen zijn normaal. Het sap uit de lever en het bloed uit het hart worden uitgezaaid op agar. Deze agar, bij 33° C. geplaatst, vertoont, na 24 uren, 6 kolonien, namelijk 5 op de agar uit de lever en eene op de agar uit het hart geënt. Deze kolonien gelijken macroscopisch op reinculturen der geïnjecteerde bacillen.

b. *Subcutane injectie.*

De injectie van onzen bacil in het subcutane celweefsel van het konijn, verwekt etterige ontsteking. In de protocollen mijner proeven 1—13 is herhaaldelijk vermeld, dat aan de ooren der proefdieren, waarbij intraveneuse injectie verricht was, necrose en etterige ontsteking optraden. Dit proces was evenwel nooit progredient en strekte zich slechts weinig uit in de omgeving van de plaats, waar de naald van het injectie-spuitje in de oor-vena was gestoken. Ook constateerden wij in een dier gevallen (proef 13), dat de etter de geïnjecteerde staafjes bevatte. Bleek reeds uit de genoemde waarnemingen, dat onze bacil ook bij enting in het subcutane celweefsel een heftig ontstekingsproces opwekt, nog duidelijker trad dit in het licht, wanneer ik eene relatief groote quantiteit bacillen in gesteriliseerd water gesuspenderd bij een konijn onder de huid spoot.

Hieronder laat ik volgen de aantekeningen van een viertal proeven, die daarvan het afdoend bewijs leveren. Bij twee konijnen (proef 14 en 15)

spoot ik onder de huid van den rug 1 cM³. eener bacillen-suspensie, verkregen, door eene 28 uren oude agar-agar-culture aan te mengen met 3 cM³. gesteriliseerd water; bij twee andere konijnen (proef 16 en 17) injecteerde ik 1 cM³ eener suspensie, bereid door eene 24 uren oude cultuur met 2 cM³. gesteriliseerd water aan te mengen.

In de eerstvolgende dagen na de subcutane injectie trad op de plaats van inoculatie eene duidelijk fluctueerende zwelling op, die gaandeweg in omvang toenam. De huid vertoonde daar ter plaatse geene afwijking. Tegelijkertijd nam de eetlust bij enkele proefdieren af; deze zaten ineengedoken in een hoek van het hok. Tevens verminderde het lichaamsgewicht.

Een mijner proefdieren stierf op den vijfden dag na de subcutane injectie (proef 15), een tweede doodde ik op den 10^{den}, een derde op den 11^{den}, een vierde op den 24^{sten} dag na de inoculatie. Bij al deze proefdieren bleken zeer uitgebreide abscessen in het subcutane celweefsel aanwezig te zijn. De etterige ontsteking was niet beperkt gebleven tot de plaats van injectie en hare naaste omgeving, maar zij had zich ook belangrijk in de omgeving uitgebreid. De etter, die deze abscessen bevatten, was half vloeibaar, op de eene plaats dikker dan op de andere, en verspreidde niet het geringste spoor van de foetide lucht, die de cultures van onzen bacil karakteriseert. Toch lijdt het geen twijfel, dat de etterige ontsteking door onze bacillen en niet door andere

toevallig binnengedrongen pyogene organismen was teweeggebracht. De uitzaaiing toch van den etter leverde onmiddellijk reïncultures van den ingespoten bacil, en gaf ons niets te ontdekken van eenige verontreiniging. Zelfs bij het proefdier, welks absces eerst 25 dagen na de inoculatie bacterioscopisch onderzocht werd, leverde de uitzaaiing van een platina-lis etter, een onetlbaar aantal kolonies der ingespoten staafjes.

Het lijdt dus geen twijfel of onze bacil verwekt in het subcutane celweefsel van het konijn eene etterige ontsteking met progressief karakter. In hoever deze langzaam voortschrijdende ontsteking ten slotte in staat is het proefdier te gronde te richten, heb ik niet verder nagegaan. Bij geen enkel mijner proefdieren heb ik in de inwendige organen, metastatische ettering gevonden en ook door middel van de cultuur-methode konden onze bacillen noch in de weefsels, noch in het bloed aangetoond worden. Wat de oorzaak van den dood van proefdier N^o. 15 was, heb ik niet kunnen bepalen.

Van het feit, dat de groote quantiteiten pus geen spoor van de foetide lucht verspreidden, die bij de cultuur van den bacil zoo sterk is uitgesproken, moet ik de verklaring schuldig blijven. Zooals hierboven gebleken is, ontwikkelt onze bacil dezelfde foetide lucht ook bij anaërobiose, zoodat de afwezigheid van zuurstof in het subcutane celweefsel niet beschouwd mag worden als de oorzaak, waarom de etter reukeloos was.

Proef 14.

4 Juni 90. Eene culture (20^e generatie) die 28 uren oud is, wordt aangemengd met 3 cM³. gesteriliseerd water en van deze bacillen-suspensie wordt 1 cM³. subcutaan geïnjecteerd bij een zwart konijn op den rug, links van de wervelkolom.

De haren waren op de plaats van injectie van te voren zooveel mogelijk weggeknipt en de huid aldaar met sublimaat-solutie gewasschen.

Zoals uit de volgende cijfers blijkt, vermindert het lichaamsgewicht van 4—28 Juni met 400 gram.

Dit proefdier weegt op 4 Juni 1890: 1550 gram.

„	„	„	„	6	„	„	1430	„
„	„	„	„	10	„	„	1250	„
„	„	„	„	12	„	„	1220	„
„	„	„	„	14	„	„	1200	„
„	„	„	„	16	„	„	1325	„
„	„	„	„	18	„	„	1280	„
„	„	„	„	20	„	„	1300	„
„	„	„	„	23	„	„	1220	„
„	„	„	„	25	„	„	1200	„
„	„	„	„	27	„	„	1260	„
„	„	„	„	28	„	„	1150	„

De eerste dagen na de injectie schijnt het dier niet wel te zijn, het zit ineengedoken in het hok en gebruikt weinig voedsel.)

10 Juni. De beweging van den linker achterpoot is sterk gestoord. Terwijl het dier loopt, houdt het dezen poot sterk opgetrokken, en raakt daarmee den bodem niet aan.

Op de plaats van injectie is geene belangrijke zwelling en geene necrose der huid aanwezig.

17 Juni. De beweging van den linker achterpoot is iets verbeterd. Ook de toestand van het dier zelf schijnt gunstiger. Het zit niet meer ineengedoken in het hok, maar beweegt zich daarin. Ook gebruikt het gretiger voedsel.

24 Juni. Op de plaats van injectie is eene zwelling te zien, waarin eenige fluctuatie te voelen is.

28 Juni. Het proefdier wordt gedood.

Bij de obductie vindt men een zeer groot absces op den rug, uitgaande van de plaats van injectie, links van de wervelkolom, zich over de geheele zijvlakte een gedeelte der voorvlakte van den buikwand en tot achter de linker achterextremititeit uitstrekkende. In de inwendige organen worden nergens metastase of andere afwijkingen gevonden.

Longen zijn normaal. De lever, de nieren en de hartspier zijn bleek. De milt is niet gezwollen.

De lymphklieren, gelegen in het subcutane bindweefsel der okselholte, zijn sterk gezwollen.

In het darmkanaal vindt men geene afwijkingen.

Het bloed uit het hart en uit de lever wordt uitgezaaid op agar, eveneens de etter uit het absces op den rug.

30 Juni. De agar, waarop uit het hart en de lever was uitgezaaid, blijft steriel.

Op de agar met etter uit het absces geënt, ziet men 4 groote en ontelbare kleine kolonien, die

macroscopisch geheel gelijken op kolonien der geïnjecteerde bacillen.

Proef 15.

4 Juni. Bij een blauw-grijs konijn wordt subcutaan op den rug 1 cM³. geïnjecteerd van dezelfde suspensie als bij proef 14 gebruikt.

Op de plaats van injectie zijn de haren vooraf zooveel mogelijk weggeknipt en de huid aldaar met sublimaat-solutie gewasschen.

Dit proefdier weegt op 4 Juni 1890, 1350 gram.

Op 9 Juni zit het dier ineengedoken in het hok en gebruikt geen voedsel. Het maakt den indruk van ziek te zijn en weegt 1110 gram.

Op 9 Juni wordt het dier dood gevonden en weegt 1090 gram.

Bij de obductie vindt men op den rug een etterig ontstekingsproces, uitgaande van de plaats van injectie, over den geheelen zijwand der buikholte naar beneden en verder naar voren zich uitstrekkende over den geheelen thorax tot in de linker okselholte.

In de inwendige organen vindt men nergens abscessen en geene andere afwijkingen, dan eenige hyperaemie van lever en milt.

Proef 16.

14 October 90. Bij een klein haaskleurig konijn, 1460 gram wegend, wordt 1 cM³. van eene bacillensuspensie, verkregen door eene 24 uren oude agar-agar-culture (29^e generatie), met 2 cM³. gesteriliseerd

water aan te mengen, in het subcutane celweefsel rechts van de wervelkolom gespoten.

De haren waren om en op de plaats van injectie vooraf zooveel mogelijk weggeknipt en de huid aldaar met sublimaat-solutie gewasschen.

Op 16 October 90 weegt dit dier 1410 gram.

Op 18 October 90 weegt dit dier 1380 gram; op de plaats van injectie wordt duidelijk zwelling waargenomen.

Op 20 October bedraagt zijn gewicht 1370 gram.

„ 22 „ „ „ „ 1280 „

Op 24 October 90 wordt dit dier, 1330 gram wegend, gedood.

Bij de obductie vind ik op den rug een uitgebreid etterig ontstekingsproces in het subcutane celweefsel. Er bevindt zich aldaar een absces, dat dikken etter bevat, die geene specifieke lucht verspreidt. Het absces strekt zich over eene oppervlakte van 30 à 40 cM². uit.

De lever is hyperaemisch en broos. De milt en de nieren zijn normaal. De vaten van het mesenterium zijn sterk geïnjecteerd. In de inwendige organen worden nergens abscessen gevonden. Zij zijn normaal. De etter uit het absces op den rug, het vocht uit het peritoneum, en het bloed uit hart en lever worden uitgezaaid op agar-agar. Al de geënte buisjes blijven steriel, met uitzondering van die waarop een weinig etter uit het subcutane absces aan den rug is uitgestreken. Deze laatsten vertoon na 24 uren (33° C.) cultures, die en bij

macroscopisch en bij microscopisch onderzoek blijken te zijn reïncultures der geïnjecteerde bacillen.

Proef 17.

14 October 1890. Van de bacillen-suspensie, bij proef 16 gebruikt, wordt 1 cM³. gespoten in het subcutane celweefsel op den rug rechts van de wervelkolom bij een zwart konijn, dat 2895 gram weegt. De haren werden vooraf zooveel mogelijk weggeknipt en de huid met sublumaat-solutie gewasschen.

Eenige dagen later werd op de plaats van injectie eene lichte zwelling waargenomen, die allengs grooter werd. Ook viel bij dit proefdier wederom eene vermindering van het lichaamsgewicht te constateeren, zooals uit de volgende cijfers blijkt.

Op 16 October 1890 weegt dit proefdier	2750	gram.
„ 18 „ „ „ „ „	2630	„
„ 22 „ „ „ „ „	2530	„
„ 25 „ „ „ „ „	2600	„

Het dier wordt gedood.

Bij de obductie vind ik in het subcutane celweefsel een absces, dat ongeveer 1 dM. lang en 6 cM. breed is. Dit absces bevat dikken etter, die geene specifieke lucht verspreidt. In de inwendige organen, die normaal zijn, worden nergens abscessen of andere afwijkingen gevonden. De vaten van het mesenterium zijn sterk geïnjecteerd.

Van het bloed uit het hart en uit de lever, evenals van den etter uit het abces op den rug, worden

eenige platina-lissen uitgezaaid op agar-agar en deze bij 33° C geplaatst.

26 October 1890. Alleen op de agar-agar, bezaaid met etter uit het absces, is eene culture opgekomen. Deze blijkt bij microscopisch onderzoek te zijn eene reinculture der geïnjicieerde bacillen.

c. *Intraperitoneale injectie.*

Spuit men eene zekere quantiteit eener reinculture van onzen bacil in de buikholte van het konijn, dan ontwikkelt zich zeer spoedig eene acute etterige peritonitis, waaraan de dieren binnen weinige dagen te gronde gaan.

Bij de obductie vindt men de darmlissen onderling en met den buikwand verkleefd door fibrineus etterige pseudo-membranen, die in dikkere of dunnere lagen overal het peritoneale bekleedsel bedekken. Bij het verscheuren dezer pseudo-membranen vindt men tusschen de darmlissen en evenzoo in de laagstgelegene gedeelten der buikholte grootere quantiteiten eener sero-purulente vloeistof. Bij het eene mijner proefdieren tastte dit ontstekingsproces ook de rechter pleura-holte aan; bij het andere werden multiple abscessen in de lever aangetroffen.

Bracht ik een platina-lis van het peritoneale exsudaat op agar-agar, dan vond ik deze laatste reeds na 24 uren met eene volumineuse culture der geïnjicieerde staafjes bedekt. De uitzaaiing van het leversap gaf geheel hetzelfde resultaat, terwijl ook

het bloed uit het hart genomen, talrijke bacillen bleek te bevatten. Tot staving van het bovenstaande laat ik hier de aantekeningen van een tweetal proeven volgen.

Proef 18.

18 Juni 1890. Eene agar-agar-culture, 24 uren oud, 21^e generatie, wordt aangemengd met 3 cM³. gesteriliseerd water en van deze suspensie 1 cM³. geïnjecteerd in de buikholte van een zwart konijn.

Uit de hieronder volgende cijfers blijkt eene vermindering van lichaamsgewicht.

Lichaamsgewicht op 18 Juni 1890: 2630 gram.

„	„	„	19	„	„	2440	„
„	„	„	20	„	„	2220	„
„	„	„	23	„	„	2000	„
„	„	„	25	„	„	1870	„
„	„	„	30	„	„	1600	„

30 Juni 1890. Nadat het proefdier reeds gedurende eenige dagen den indruk had gemaakt van niet wel te zijn, wordt het heden 's morgens 9 uur stervende gevonden. Het ligt uitgestrekt en bewegingloos in het hok en maakt alleen nu en dan enkele krampachtige bewegingen met den kop. 's Middags 2 uur ligt het dier dood in het hok.

Obductie: In den buikwand vindt men op de plaats, waar de canule was ingestoken, etterige infiltratie. In de buikholte vindt men het peritoneum van het darmkanaal en van den sterk opgezetten

uterus plaatselijk met fibrineus etterige pseudo-membranen bedekt, waartusschen hier en daar etterig exsudaat is opgehoopt. De vergrootte uterus blijkt in zijne holte een groote massa pus te bevatten.

In de lever, die zeer broos is, worden talrijke kleine abscessen gevonden. De milt en de nieren zijn bleek. In de urine uit de blaas ontlast, wordt veel eiwit gevonden. De hartspier is bleek. De longen zijn gedeeltelijk hyperaemisch. Nergens worden haemorrhagien gevonden. Het exsudaat der buikholte en het leversap worden uitgezaaid op agar-agar, eveneens bloed uit het hart. Deze aldus bezaaide agar-agar wordt bij 33° C. geplaatst.

Op de agar-agar bezaaid met het exsudaat uit het peritoneum, is na 24 uren eene culture opgekomen, die geheel gelijk op eene reiculture der ingespoten bacillen. Op de andere agar-agar, uit lever en hart geënt, is na 24 uren geen groei te bespeuren.

Proef 19.

14 October 1890. Bij een wit-zwart konijn, dat 1980 gram weegt, wordt eene met 1 cM³. gesteriliseerd water aangemengde agar-agar-culture, die 24 uren oud is (29° generatie), in het peritoneum gespoten.

15 October 1890. Het dier zit in een hoek van het hok en laat den buik op den bodem rusten; het heeft minder eetlust.

16 October. Het dier, dat 1880 gram weegt, zit ineengedoken in het hok en eet weinig.

17 October. Het proefdier heeft eene frequente respiratie en neemt geen voedsel op.

18 October. 's Morgens ten 9 ure wordt het dier dood gevonden; het weegt 1830 gram.

Bij de obductie vind ik eene diffuse etterige peritonitis. Aan het peritoneum parietale vindt men door fibrineuse pseudo-membranen omgeven ettermassa's. De lever en de koepel van het diaphragma zijn met eene laag dikke fibrineus-etterige membranen bedekt. De lever is donkerrood en broos. De milt is donkerblauw, doch niet gezwollen.

De nieren vertoonen geene abscessen. In de urine uit de blaas ontlast, wordt veel eiwit aangetoond. De maag is matig gevuld. De darmen bevatten dunne faeces. Het hart is normaal. In de rechter pleura-holte vindt men eene geringe quantiteit seropurulente vloeistof, terwijl de pleura pulmonalis en costalis met fibrineuse etterige pseudo-membranen bedekt zijn. Links is de pleura normaal. De longen vertoonen inwendig geene veranderingen. Tusschen spieren en subcutaan bindweefsel van den buikwand wordt niets abnormaals gevonden.

Het vocht uit het peritoneum, het sap uit de lever en het bloed uit het hart worden uitgezaaid op agar-agar. Deze agar-agar, bij 33° C. geplaatst, is na 24 uren met eene reiculture der in de buikholte geïncieerde bacillen bedekt. De culturen verspreiden de reeds meermalen beschreven foetide lucht. Ook blijken deze cultures bij microscopisch onderzoek volkomen zuiver te zijn, d. i. zij bestaan enkel uit kleine staafjes.

e. Inoculatie in de cornea.

Om de vermenigvuldiging van onzen bacil in de weefsels nader te vervolgen, heb ik eenige entingen in het centrum van de cornea van het konijn verricht. Met eene gesteriliseerde lans bracht ik eene minimale hoeveelheid van eene versche agar-agar-culture tusschen de lamellen. Er ontstond dan op de plaats der inoculatie een klein grijs-wit vlekje, terwijl in het centrum daarvan een gering substantieverlies viel te bespeuren. Reeds na een paar dagen was evenwel het proces tot stilstand gekomen, de infiltratie breidde zich niet meer uit en weldra volgde genezing. In geen enkel geval veroorzaakte de inoculatie in de cornea eene belangrijke necrose. Na een paar weken was van de infiltratie meestal niets meer waar te nemen, terwijl de proefdieren ook overigens gezond bleven.

Daar deze inoculaties zoo uiterst geringe ontsteking verwekten heb ik mij met dit onderzoek niet langer beziggehouden.

Ik meen daarom ook, dat het overbodig zou zijn de protocollen van mijne proeven hier te vermelden.

e. Inspuiting in de maag.

Ook heb ik nagegaan of onze bacil, wanneer men hem bij het konijn in de maag brengt, schadelijken invloed op het organisme uitoefent. Ik mengde

daartoe eene versche agar-agar-cultuur met een paar cM³. gesteriliseerd water aan en bracht de geheele cultuur door middel van eene sonde in de maag. Hetzij ik de cultuur in de gevulde of in de ledige maag invoerde, de proefdieren ondervonden daarvan niet den minsten invloed en bleven volkomen gezond.

Onze bacillen worden dus waarschijnlijk door het maagsap gedood of kunnen althans langs den tractus intestinalis het konijn niet infecteeren. Ook de aantekeningen dezer proeven zal ik hier niet nader vermelden.

f. *Proeven met bacillenvrije filtraten van bouillon-cultures.*

Ten slotte heb ik nog eenige proeven verricht bij konijnen om na te gaan of de door ons bestudeerde bacil toxische stoffen produceert.

Ik wenschte dit voornamelijk daarom te onderzoeken, omdat de mogelijkheid niet uitgesloten kon worden, dat onze proefdieren, waarbij eene betrekkelijk groote quantiteit eener reïncultuur in het bloed was ingespoten niet door de bacillen zelve, maar door het een of ander chemisch vergif gedood waren, naast de bacillen in de reïncultures aanwezig.

Ik heb daarom bouillon-cultures, die korter of langer tijd bij 33° C. hadden gestaan door eene Chamberland'sche bougie gefiltreerd en van deze filtraten zekere quantiteiten in de oor-vena bij konijnen ingespoten om te zien of deze vloeistoffen vergiftige

eigenschappen bezaten. Ik zal hier de proeven laten volgen, die ik met dat doel verricht heb.

Proef 20.

12 Juni 1890. Eene bouillon-culture, sinds 15 Januari 1890 bij gewone kamertemperatuur bewaard, wordt, nadat door uitzaaiing de levensvatbaarheid der bacillen is aangetoond, door eene Chamberland'sche bougie gefiltreerd. Het heldere filtraat bezit een zwak alkalische reactie en is bruinrood van kleur. Bij uitzaaiing blijkt deze vloeistof volkomen steriel.

Van dit filtraat injecteer ik 1 c.M³. in de oor-vena van een geelbruin konijn, dat 1930 gram weegt.

12 Juli. Het konijn, dat voortdurend in observatie wordt gehouden, heeft geene ziekteverschijnselen vertoond.

Op 2 Juli bedroeg het gewicht 1670 gram.

„ 12 „ „ „ „ 1545 „

In het begin van September was het dier nog steeds gezond.

Proef 21.

12 Juni 1890. Van hetzelfde filtraat waarmede de vorige proef verricht werd, worden 8 c.M³. geïnjecteerd in de oor-vena van een bont konijn, dat 1960 gram weegt.

12 Juli Het proefdier, dat voortdurend in observatie wordt gehouden is gezond gebleven; het lichaamsgewicht bedroeg op 12 Juli 1750 gram.

Proef 22.

25 Juni 1890. Van hetzelfde filtraat bij de vorige

proeven gebruikt, worden 20 c.M³. gespoten in de oor-vena van een blauw-grijs konijn, dat 2230 gram weegt.

De injectie geschiedt des morgens ten 9 ure. 's Middags ten 2 ure ligt het dier dood in het hok.

Bij de obductie vindt men in de buikholte slechts een weinig helder vocht.

De lever, de milt en de nieren zijn niet hyperaemisch. De vaten van het mesenterium zijn weinig gevuld. Nergens vindt men haemorrhagien. Ook bestaan overigens nergens afwijkingen; het proefdier verkeert in een vergevorderd stadium van zwangerschap.

Proef 23.

12 Juni 1890. Eene bouillon-culture 8 dagen oud, (33° C.) wordt door eene Chamberland'sche bougie gefiltreerd. Het filtraat is zwak alkalisch en zooals bij uitzaaiing blijkt volkomen steriel.

13 Juni. Van genoemd filtraat, wordt 1 M³. geïnjecteerd in de oor-vena van een zwart konijn.

12 Juli. Het dier is tot dusver gezond gebleven. Alleen is het lichaamsgewicht van het dier gaandeweg wat afgenomen.

Op 16 Juni woog het dier 2225 gram.

„ 10 Juli „ „ „ 1950 „

Proef 24.

13 Juni 1890. Van hetzelfde filtraat (proef 23) wordt 1 cM³. geïnjecteerd in de oor-vena van een bont konijn, dat 1460 gram weegt.

27 Juni. Het dier is sinds de injectie gezond gebleven; zijn gewicht bedraagt 1280 gram.

12 Juli. Het proefdier weegt 1220 gram; het ziet er gezond uit.

Proef 25.

26 Juni 1890. Van hetzelfde filtraat (proef 23) worden 20 cM³. ingespoten in de oor-vena van een groot haaskleurig konijn, dat 2850 gram weegt.

2 Juli. Het dier is tot dusver gezond gebleven, het weegt 2500 gram.

12 Juli. Het dier is steeds volkomen gezond; zijn gewicht bedraagt 2770 gram.

Proef 26.

26 Juni 1890. Van hetzelfde filtraat (proef 23) worden 10 cM³. geïnjecteerd in het bloed van een wit konijn, dat 2450 gram weegt.

30 Juni. Het dier, dat volkomen gezond is, weegt 2240 gram.

12 Juli. Het dier, dat 2130 gram weegt, is steeds volkomen gezond gebleven.

Proef 27.

28 Juni 1890. Eene bouillon-culture, die 16 dagen oud is (33° C.) en waarmede proef 5 verricht werd, wordt gefiltreerd door eene Chamberland'sche bougie. Van het steriele filtraat worden 6 cM³. ingespoten in de oor-vena van een wit konijn, dat 2270 gram weegt.

4 Juli. Het dier is tot dusver volkomen gezond gebleven en weegt 2170 gram.

12 Juli. Het dier heeft geene ziekteverschijnselen vertoond; zijn gewicht is 2200 gram.

Proef 28.

28 Juni 1890. Van hetzelfde filtraat (proef 27) worden 4 cM³. gespoten in de oor-vena van een haaskleurig konijn, dat 1410 gram weegt.

12 Juli. Het dier heeft geen enkel ziekteverschijnsel vertoond en weegt 1420 gram.

Uit de hierboven beschreven proeven blijkt voldoende, dat de dood onzer proefdieren, bij welke eene betrekkelijk groote quantiteit bacillen in het bloed werd gespoten door de bacterien zelve, niet door tevens in de cultures aanwezige toxische stoffen werd teweeggebracht.

Zoo werd een konijn, door eene intraveneuse injectie van 3 cM³. eener 16 dagen oude bouillon-cultuur binnen weinig uren gedood (proef 5), terwijl 2 konijnen volkomen gezond bleven, bij welke 4 respectieve 6 cM³. van het bacillenvrije filtraat derzelfde bouillon-cultuur in het bloed gespoten waren (proef 27 en 28). Ook de proeven 23, 24, 25, 26, genomen met het steriele filtraat eener 8 dagen oude bouillon-cultuur, spreken daarvoor. Zelfs de intraveneuse injectie eener quantiteit van 20 cM³. bleek in het minst niet schadelijk (proef 25).

Ook zeer oude bouillon-cultures bevatten geen

chemische stoffen, die bij konijnen toxische werkingen uitoefenen, zooals blijkt uit de proeven 20 en 21, waar 1 respectievelijk 8 cm^3 . van het filtraat eener 5 maanden oude bouillon-culture na intraveneuse injectie geen schadelijken invloed uitoefent. Wel is waar overleed een proefdier (proef 22) dat ik 20 cm^3 . van het laatste filtraat in het bloed injecteerde. Wat in dit geval, het eenige dat ik met doodelijken afloop heb waargenomen evenwel de oorzaak was van den dood, kan ik niet met zekerheid zeggen.

AANHANGSEL.

INJECTIE VAN DOOR MIDDEL VAN VERHITTING GESTERILISEEDE CULTURES IN DE SUBCUTIS

Naar aanleiding van *Buchner's* mededeeling, (*Centralblatt für Bacteriologie* No. 11) steriliseerde ik versche cultures van onzen bacil door ze gedurende 15 minuten tot 100° C. te verhitten en spoot dan eene suspensie der gedooide bacillen onder de huid van een konijn. Vooraf was de huid geschoren, zorgvuldig aseptisch gemaakt door wasschen met zeepwater, sublimaatsolutie en alcohol. Het Pravaz'sche spuitje, waarmede de injectie geschiedde was te voren met de meeste zorg gesteriliseerd. Na de injectie werd de huid met jodoform-collodium bestreken.

Vijf dagen na de injectie, toen, zooals uit de hiervolgende experimenten blijkt, op de plaats van inspuiting eene duidelijke zwelling viel te constateeren

werd de huid met de meeste zorg aseptisch gemaakt en ingesneden met een gesteriliseerd mes. Het exsudaat dat inderdaad etterig was, zaaide ik uit op agar, om na te gaan of ik werkelijk in dit geval met aseptische ettering te doen had.

Ik heb met dit doel een tweetal proeven genomen, waarvan ik hier slechts eene vermeld, omdat beide geheel hetzelfde resultaat gaven.

Proef 29.

6 November 1890. Van eene agar-ager-culture, (31^e generatie), die 24 uren oud is, wordt met 3 cM³. gesteriliseerd water eene troebele suspensie gemaakt. Deze suspensie wordt gedurende 15 minuten verhit in een waterbad van 100° C.

Van deze suspensie wordt vervolgens een druppel met een platina-lis uitgezaaid op agar-agar. Deze agar-agar bleef volkomen steriel.

De geheele suspensie wordt subcutaan geïnjecteerd op den rug van een blauw konijn.

Het Pravaz'sche spuitje en de naald waarmede de injectie verricht werd, was vooraf met sublimaat-solutie gereinigd en daarna eenigen tijd in kokend water gehouden.

De huid op de plaats van injectie was vooraf geschoren en met zeepwater, sublimaat-solutie en alcohol gedesinfecteerd.

8 November '90. Het proefdier schijnt volkomen gezond te zijn. Op de plaats van injectie valt eene infiltratie van het subcutane celweefsel waar te nemen.

11. November '90. Het proefdier wordt gedood. De huid op de plaats van injectie wordt evenals boven gedesinfecteerd. Vervolgens wordt met een gesteriliseerd mes eene incisie in de huid gemaakt. Onmiddellijk onder de huid wordt een etterig ontstekings-proces gevonden. Deze etter wordt uitgezaaid op 4 agar-agar-buisjes, en deze bij 33° C. geplaatst.

Vervolgens wordt de huid verder vrij geprepareerd. Rondom dit ontstekingsproces, dat zich tot het subcutane celweefsel bepaald, wordt eene aanzienlijke hyperaemie gevonden.

De met etter bezaaide agar-agar is, na 4 dagen bij 33° C. vertoefd te hebben, steriel gebleven.

B. PROEVEN BIJ DUIVEN.

Behalve de tot dusver beschreven proeven heb ik nog eenige proeven verricht bij duiven om na te gaan of onze bacil ook in staat is bij vogels etterige ontsteking op te wekken. Ook hier experimenteerde ik met bacillen-suspensies, bereid door versche agar-agar-cultures met een weinig gesteriliseerd water aan te mengen. Van zulk eene suspensie spoot ik telkens $\frac{1}{2}$ tot 1 cM^3 . of soms ook de geheele suspensie in de borstspier.

Deze injecties bleken voor de proefdieren vrij onschuldig. Bij de meeste duiven bij welke $\frac{1}{2}$ tot 1 cM^3 . van het virus in den m. pectoralis geïnjecteerd was, zag ik in het geheel geene verschijnselen optreden. Deze dieren bewogen zich levendig, vlogen

heen en weer in het hok, terwijl geen noemenswaardige afname van het lichaamsgewicht viel te constateeren.

Wanneer daarentegen eene grootere hoeveelheid van het virus was ingespoten, voldoende om bij intraveneuse injectie een konijn binnen 24 uren te dooden, dan vielen eenige ziekteverschijnselen bij de dieren waar te nemen. Een dag na de injectie vond ik dan de duif ineengedoken in een hoek van het hok zitten met den kop tusschen de veeren. Eene noemenswaardige vermindering van gewicht viel evenwel niet te constateeren. Reeds een paar dagen later keerde de normale toestand weer terug. De duiven bewogen zich weer gemakkelijker en vlogen weldra weer door het hok. Al mijne proefdieren heb ik geruimen tijd in observatie gehouden; zonder uitzondering zijn zij later volkomen gezond gebleven.

Om na te gaan welke lokale invloed de intramusculaire injectie veroorzaakte, heb ik een proefdier, waarvan ik hieronder het protocol vermeld, 5 dagen na de injectie gedood. Hier vond ik in den *m. pectoralis* van het volkomen gezond uitziende dier een sero-fibrineus exsudaat, dat hoofdzakelijk in, maar ook aan de oppervlakte van den *m. pectoralis* was uitgestort. Van ettering kon ik geen spoor ontdekken.

Uit mijn proeven, waarvan ik de beschrijving onvermeld kan laten, meen ik te mogen afleiden, dat duiven zoo niet geheel ongevoelig, dan toch veel minder gevoelig zijn voor de werking van onzen bacil dan konijnen. Bij duiven toch verwekt onze

bacil niet die heftige ontsteking welke bij konijnen wordt waargenomen; terwijl bij deze laatste zonder uitzondering ettering optreedt, bereikt de ontsteking bij de eersten slechts een lichter graad en vertoont een sero-fibrineus karakter.

Voorts onderscheidt zich het ontstekings-proces bij duiven daardoor, dat het geene neiging bezit om progressief te worden. Integendeel, weldra verdween de ontsteking spoorloos.

Proef 30.

12 Juni 1890. Eene culture, (22^{ste} generatie) die 24 uren oud is, wordt aangemengd met 3 cM³. gesteriliseerd water. Van deze suspensie wordt $\frac{1}{2}$ cM³. geïnjecteerd in den musculus pectoralis dexter van eene witte, volwassene duif. Lichaamsgewicht 370 gram.

Deze duif weegt op 14 Juni 1890: 310 gram.

„ „ „ „ 16 „ „ 310 „

„ „ „ „ 17 „ „ 300 „

Op 17 Juni 1890 wordt de duif gedood.

Bij de obductie vind ik den musculus pectoralis dexter gezwollen. In de onmiddellijke omgeving van de plaats waar de canule der *Pravaz'sche* spuit ingedrongen was, is de huid geelachtig verkleurd en droog. In de spier bevindt zich een geel-bruine haard. Deze verkleuring strekt zich ook langs het steekkanaal tot aan de oppervlakte der spier uit. In en onder den m. pectoralis vindt men een sero-fibrineus exsudaat. Van ettering wordt nergens iets waargenomen. De inwendige organen van het dier zijn niet veranderd.

RESUME.

Aan het slot van mijn onderzoek wensch ik een kort overzicht te geven van de verkregen resultaten en daaraan eenige opmerkingen toe te voegen.

Wat in de eerste plaats betreft de aard van het door mij onderzochte micro-organisme, zoo is gebleken, dat wij te doen hebben met een wel gekarakteriseerden bacil, die pathogeen is voor het konijn.

De eigenschappen van dezen bacil heb ik samen gevat in het volgend overzicht, ontworpen naar de tabellen van *James Eisenberg's* bakteriologische Diagnostik.

Bacillus pyogenes foetidus liquefaciens.

Aangetroffen:	In de lever van een' aan idiopathische acute gele lever-atrophie overleden volwassen man.
Vorm.	Korte staafjes 1.5 mikron lang; de breedte is $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{4}$ van de lengte. De uiteinden der staafjes zijn afgerond. Zelden vindt men korte schijndraden in de reïncultures.
Bewegelijkheid:	De staafjes bewegen zich levendig.
Groei: op <i>platen</i>	van galatine ontwikkelen zich grijs-witte ronde kolonien, die de gelatine snel doen vervloeien; van agar-agar groeien de bacillen tot grijs-witte ronde kolonien uit, die aan de oppervlakte der agar-ager zich weeldiger ontwikkelen dan in de diepte.
In <i>steekcultures</i> .	In gelatine ontwikkelt zich eene grijs-witte streep langs het steekkanaal, boven sterker ontwikkeld dan beneden. Vervloeiing schrijdt langzaam en gelijkmatig van boven naar beneden voort. In agar-agar grijs-witte streep aan de oppervlakte veel sterker ontwikkeld dan in de diepte.
In <i>streepculture</i> .	Op galatine treedt gelijktijdig met de ontwikkeling der culture gootvormige vervloeiing der gelatine op. Op agar-agar komt zeer snel eene grijs-witte cultuur op, die neiging vertoont om zich over de geheele oppervlakte uit te breiden, zonder die geheel te bedekken.
Op <i>aardappelen</i> .	Glanzende, snelgroeïende geel-grijze cultures.
Op <i>serum</i> .	Grijs-witte cultures die het serum snel doen vervloeien.

In <i>bouillon</i> .	Hierin groeit de bacil welig; na eenigen tijd wordt de bouillon donkerrood.
In <i>melk</i> .	Een dik vlies vormt zich boven op de melk die donker en meer doorschijnend wordt.
Temperatuur:	Groeit bij kamertemperatuur; optimum 37° C. Bij 48° C. houdt de groei geheel op.
Snelheid van groei:	Groeit snel.
Sporenvorming.	Geen sporenvorming.
Aanwezigheid van lucht.	Bij afwezigheid van zuurstof is de groei veel langzamer, doch niet opgeheven.
Gasproductie.	Verspreidt eene penetrante foetide lucht.
Verhouding tot gelatine.	Doet deze snel vervloeien.
Kleurstoffen.	Tingeërbaar met gentiaanviolet en volgens <i>Gram</i> .
Pathogenese.	Veroorzaakt bij konijnen subcutaan geïnjecteerd uitgebreide etteringsprocessen; bij intraveneuse injectie verwekken kleine hoeveelheden multiple abscessen, grootere spoedig den dood. Intramusculaire injectie bij duiven veroorzaakt eene sero-fibrineuse ontsteking.

Reeds onmiddellijk springt het aanzienlijk verschil tusschen onzen bacillus en den bacillus pyogenes foetidus van *Passet*, in het oog. Ik behoef slechts er op te wijzen, dat onze bacil in hooge mate de eigenschap bezit den voedingsbodem te doen vervloeien, (gelatine, gestold runder-serum), terwijl de *Passet*'sche bacil, die eigenschap geheel mist. Ook van alle

andere bacillen, tot dusver nauwkeuriger bestudeerd, onderscheidt zich de door mij onderzochte species voldoende, om haar daarvan te onderscheiden.

Dat onze bacil pathogeen is voor het konijn, daarvan werd door mij in de vorige hoofdstukken het afdoende bewijs geleverd. De onderzochte bacterie representeert eene echte pyogene bacillenspecies, die bij het konijn, zoowel bij directe inoculatie in het subcutane weefsel en in het peritoneum etterige ontsteking verwekt, als ook bij injectie in het bloed multiple abscessen in verschillende organen en weefsels veroorzaakt.

Dat bij de genese dezer etteringsprocessen eene vermenigvuldiging van den bacil in het organisme van het konijn in het spel is, komt mij uit het resultaat mijner proeven niet twijfelachtig voor, hoewel ik direct met den microscoop eene vermenigvuldiging der bacillen niet heb kunnen constateeren.

Bij enting toch onder de huid, ziet men de ettering een progressief karakter aannemen en ontstaan uitgebreide abscessen in het subcutane celweefsel. In de buikholte geïnjecteerd, verwekt onze bacil eene echte fibrineus etterige peritonitis, die de neiging vertoont om langs de lymphbanen van het diaphragma op de pleuraholte voort te schrijden. Spuit men eindelijk eene niet te groote hoeveelheid bacillen in het bloed, dan ontwikkelen zich binnen eenigen tijd multiple abscessen in de lever, in de milt, in de nieren, voorts in het subcutane en intermusculaire bindweefsel en ziet men het dier aan ware pyaemie

te gronde gaan. Bij uitzaaiing van dezen etter op agar-agar, kon zonder eenige uitzondering de aanwezigheid van den geïnjecteerden bacil geconstateerd worden en bleek het telkens, dat groote hoeveelheden bacillen daarin aanwezig waren, daar deze entingen met onverdunde etter geene geïsoleerde kolonien, maar onmiddellijk echte streepcultures opleverden. Zoowel gold dit voor den etter der versche abscessen, na subcutane injectie ontstaan, als voor de multiple abscessen, die langen tijd voor hunne ontwikkeling noodig hadden en waaraan eerst na meerdere dagen of eerst na weken de proefdieren te gronde gingen.

Spuut men eene grootere quantiteit bacillen in het bloed van een konijn, dan sterft het dier in den regel binnen een tot twee dagen. Bij de obductie vindt men bij macroscopisch onderzoek geene opvallende veranderingen in de organen, waarin evenwel, evenals in het bloed, talrijke bacillen worden aangetroffen, zooals bij uitzaaiing telkens bleek.

Waaraan de dood dezer dieren toegeschreven moet worden, weet ik niet met zekerheid aan te geven. Zooveel is echter zeker, dat het *aantal* bacillen dat plotseling in het bloed werd gebracht, daarbij van overwegende beteekenis is. Onze bacil is stellig geen echte bloedparasiet, hij vermenigvuldigt zich niet merkbaar in het stroomend bloed, zooals de intraveneuse injectie van kleinere bacillen-quantiteiten leert. De geïnjecteerde bacillen worden in verschillende organen en weefsels afgezet en het dier ondervindt schijnbaar in de eerste dagen geen nadeel van de injectie. De

in de organen gedeponeerde bacillen gaan nu evenwel buiten den bloedstroom in de weefsels woekeren, verwekken etterhaarden, die langzamerhand in grootte toenemen en op hun beurt tot metastasen aanleiding geven, zoodat ten slotte het dier pyaemisch te gronde gaat. In het lijk van zulk een aan pyaemie bezweken dier bleek het bloed nu eens steriel, dan weer gelukte het door uitzaaiing de aanwezigheid van enkele bacillen daarin te constateeren; eene bevinding die in overeenstemming is met de ervaring, dat ook bij de pyaemie van den mensch het bloed niet constant micrococcen, en stellig niet in grooten getale bevat.

De dood der proefdieren, waarbij grootere quantiteiten bacillen in het bloed werden ingespoten, mag hier niet toegeschreven worden aan vergiftiging door toxische producten der bacillen, in de cultures aanwezig. De proeven, die ik ter contrôle met bacillen vrije filtraten van bouillon-cultures genomen heb, toonen zulks duidelijk aan.

Konijnen, die eene groote hoeveelheid van zulk een filtraat in het bloed werd gespoten, bleven niet alleen in leven, maar vertoonden zelfs geen enkel merkbaar ziekteverschijnsel. Het zijn dus zonder twijfel de bacillen zelve die, wanneer hun aantal belangrijk is, het dier dooden en wel op eene wijze, die ik niet nader heb kunnen toelichten.

Wat betreft de pyogene werking van onzen bacil, eenige experimenten hebben mij geleerd, dat deze evenmin aan den invloed van ptomainen of toxinen kan toegeschreven worden. Injiceerde ik bij konijnen

meerdere cubiek centimeters van het door porselein gefiltreerde, kiemvrije filtraat van bouillon-cultures onder de noodige voorzorgsmaatregelen in de subcutis, dan trad nooit ettering op. De onlangs in het Centralblatt für Bakteriologie n^o. 11 door *Buchner* geplubliceerde onderzoekingen, volgens welke het protoplasma der bacterien zelve pyogeen werkt, gaven mij aanleiding zijne resultaten aan onzen bacil te toetsen. En inderdaad, ik kreeg daarbij een analoog resultaat. Spoot ik eene door verhitting tot 100° C. gesteriliseerde troebele bacillen-suspensie eener versche agar-cultuur onder de huid van het konijn (proef 29), dan ontstond op de plaats van injectie binnen weinige dagen een waar absces, dat evenwel volstrekt geene neiging vertoonde, om zich in de omgeving uit te breiden, en waarvan de etter bij uitzaaiing volkomen steriel bleek te zijn.

Het doode protoplasma onzer pyogenen bacil is dus werkelijk in staat ettering op te wekken. Welke beteekenis aan dit feit moet worden toegekend met betrekking tot de pyogene werking van den levenden bacil, daaromtrent komt mij elke onderstelling voorloopig te gewaagd voor, vooral wanneer men overweegt dat volgens *Buchner* vele bacterien-species en met name ook niet pyogene soorten dezelfde eigenschap toekomt.

Hoewel onze bacil geen sporen vormt behouden cultures op agar-agar-gelei haar vitaliteit maanden lang. Ook is de virulentie van den bacil zeer constant. Van eenige mitigatie heb ik nooit iets waargenomen.

Ten slotte mag ik niet verzuimen er op te wijzen, dat het mij volkomen onbekend of de door mij onderzochte bacil met betrekking tot de pathologie van den mensch eenige beteekenis heeft. Zooals in de inleiding gezegd is, werd de bacil aangetroffen in de lever van een' aan idiopathische acute lever-atrophie overleden man. Het lijk was evenwel reeds 18 uren oud, zoodat de mogelijkheid niet te ontkennen is, dat de gevonden bacterien eerst na den dood in het zieke orgaan zijn binnengedrongen. En al onderstellen we dat onze bacil reeds gedurende het leven in de lever werd aangetroffen, ook dan nog is zijne pathogene beteekenis ons voorloopig duister.

Bezit de bacil pathogene eigenschappen voor het konijn, voor den mensch behoeft dit daarom nog niet het geval te zijn. En voorts wat betreft zijn pyogene eigenschap bij het konijn, het is de vraag of de bacil in staat is bij den mensch etterige ontsteking op te wekken, daar in het lijk nergens eenige etterige ontsteking gevonden werd.

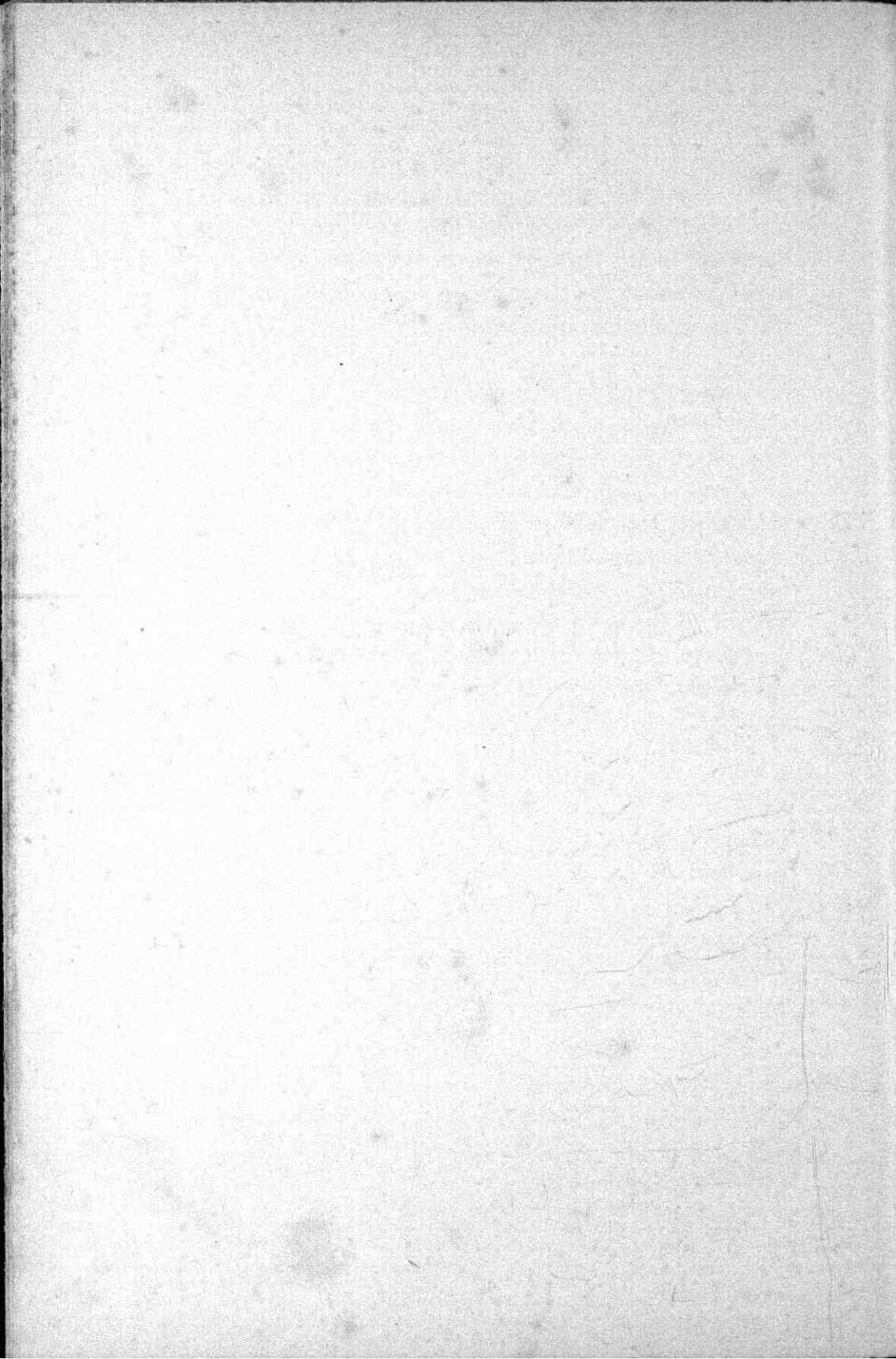
Aan den anderen kant bestaat evenwel ook de mogelijkheid dat de bacterie in eenig oorzakelijk verband tot dit geval van acute lever-atrophie stond. Om daaromtrent eenig inzicht te krijgen, zou het aangewezen zijn, infectie-proeven te verrichten bij dieren, die zooals het schaap (Duitschland) en het paard niet zelden aan acute, gele lever-atrophie te gronde gaan. Tot het verrichten van proeven bij deze dieren, ontbrak mij evenwel de gelegenheid.

Uit het weinige wat de bacteriologische onderzoe-

kingen betreffende de aetiologie der acute gele lever-atrophie aan het licht gebracht hebben, blijkt, dat de lever nu eens in het geheel geene bacterien bevatte, dan weer micrococcen of bacillen, welke laatste tot dusver evenwel niet in reincultures werden verkregen.

Ook heb ik in de inleiding er op gewezen dat naast de door mij onderzochte bacil, nog een tweede bacillen species eveneens pathogeen, uit de atrophische lever gecultiveerd werd. In den aanvang van mijn onderzoek, koesterde ik de hoop ook dezen bacil nader te onderzoeken en zijne pathogene eigenschappen te bestudeeren. Spoedig evenwel bleek mij, dat deze arbeid mijne krachten te boven ging en dat ik mij tevreden moest stellen met het onderzoek van eene species, vooral toen eenige voorloopige experimenten met de andere species leerden, dat de resultaten niet geheel constant waren.

STELLINGEN.



STELLINGEN.

I.

Uit een prophylactisch oogpunt geve men post partum steeds ergotine.

II.

Het zoogenaamde navelstrenggeruisch ontstaat niet in de navelstreng.

III.

Besluit men bij placenta praevia centralis tot het verrichten van sectio caesarea, zoo ga men daartoe over vóórdat krachtige dolores optreden.

IV.

De beste therapie bij spondylitis is absolute rust in rugligging.

V.

Hooge temperaturen, zooals bij typhus abdominalis en andere infectie-ziekten, bestrijde men niet door antipyretica.

VI.

Kunstmatig voedsel voor zuigelingen moet vóór de toediening steeds gekookt worden.

VII.

Tracheotomie is te verkiezen boven intubatie van den larynx.

VIII.

Immobiliseerende verbanden late men zoo kort mogelijk liggen.

IX.

Hydrops antri Highmori komt niet voor.

X.

Voordat men tot het doen van iridectomie overgaat, moet eerst het astigmatisme bepaald worden.

XI.

De behandeling van solutio retinae met tinctura jodii verdient nog geene aanbeveling.

XII.

Wollen kleederen, bijv. die van Jaeger, verdienen in een tropisch klimaat geene aanbeveling.

XIII.

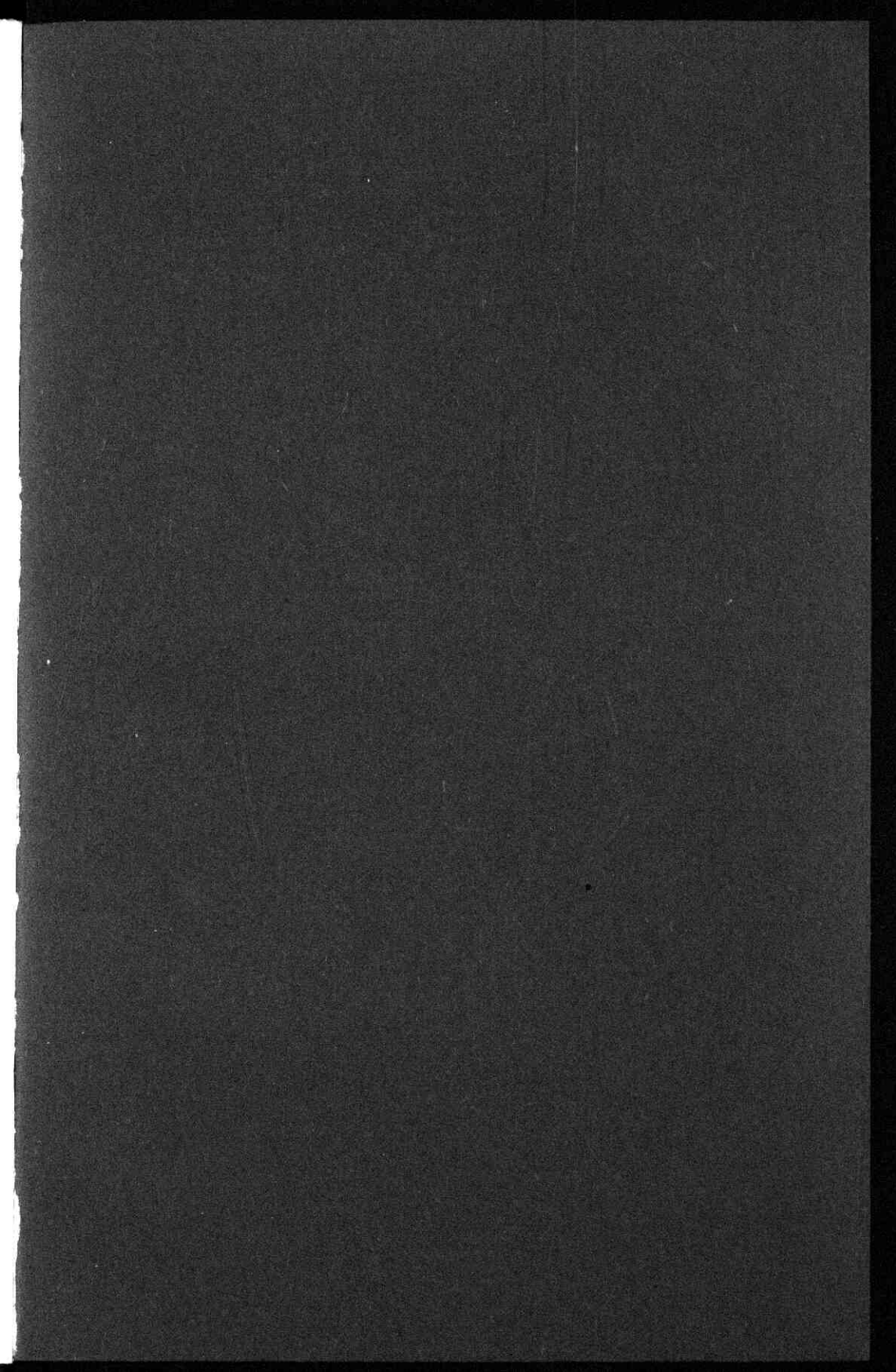
De *M. flexor pollicis brevis* is het radiale hoofd van een tweehoofdige spier.

XIV.

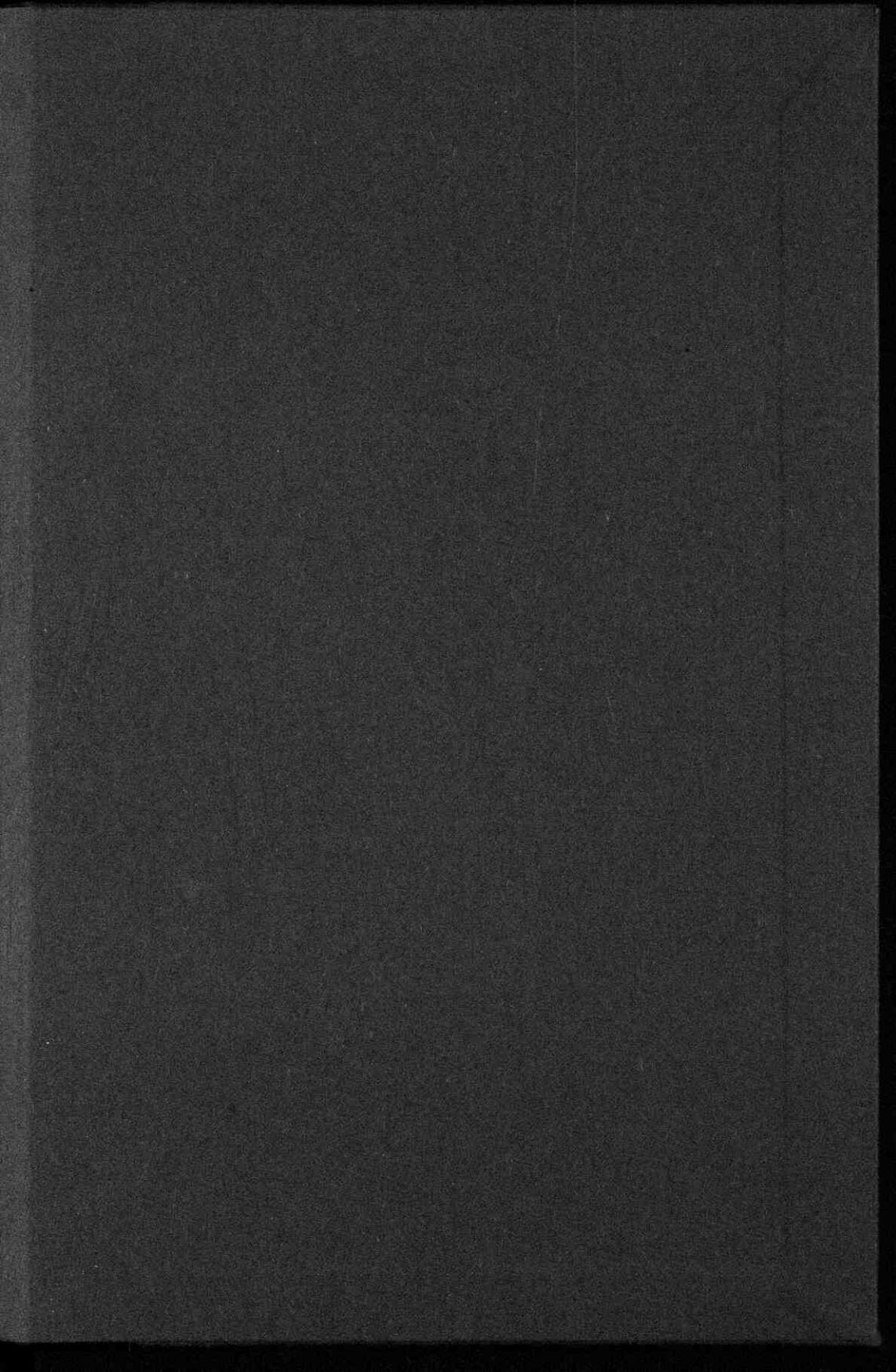
De perceptie van zuur, zoet, bitter en zout is aan afzonderlijke zenuwelementen gebonden.

XV.

Ofschoon het hoogst twijfelachtig is of de zoogenaamde Koch'sche „entstof” tegen tuberculose de therapeutische beteekenis heeft, die men te Berlijn er van verwacht, is het toch ten zeerste te betreuren, dat de bereiding dier entstof niet spoediger wereldkundig is gemaakt.







A