



Onderzoeken over virulentie-opwekking bij saprophytische bacteriën

<https://hdl.handle.net/1874/253980>

gu. 4h.

Bed. 6 Maart 1901

ONDERZOEKINGEN

over virulentie-opwekking bij

saprophytische bacteriën. o o

recht

2

B. C. VAN DER NAGEL.

A. qu.
192

ONDERZOEKINGEN

OVER VIRULENTIE-OPWEKKING BIJ SAPROPHYTISCHE BACTERIËN.

RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT



1903 0133

ONDERZOEKINGEN

over virulentie-opwekking bij saprophytische
bacteriën

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN

DOCTOR IN DE GENEESKUNDE

AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT

NA MACHTIGING VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS

Dr. A. A. W. HUBRECHT

HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE

*volgens besluit van den Senaat der Universiteit tegen de bedenkingen van
de faculteit der Geneeskunde te verdedigen*

OP

DONDERDAG 6 MAART 1902 DES NAMIDDAGS TE 4 UREN

DOOR

BARTHOLOMEUS CORNELIS VAN DER NAGEL

ART'S

geboren te ROTTERDAM



ROTTERDAM — C. A. TERNEDEN

1902

AAN MIJN VADER

EN

AAN DE NAGEDACHTENIS MIJNER MOEDER.

Aan het einde mijner Academische studiën gekomen, zij het mij vergund U, Professoren en Lectoren der Medische en Philosophische faculteit, mijnen dank te betuigen voor het onderwijs, dat ik van U heb mogen genieten.

In het bijzonder richt ik een woord van dank tot U, Hooggeleerde EIJKMAN, Hooggeachte Promotor, voor de groote bereidwilligheid en de voorlichting mij bij het samenstellen van dit proefschrift betoond. De uren, op Uw laboratorium doorgebracht, zullen steeds bij mij in aangename herinnering blijven.

I N H O U D.

	Bladz.
Inleiding	I
Literatuur-overzicht	10
Techniek	29
Diffusie-proeven	37
Navolging der proeven van Vincent met bac. megatherium	53
Proeven met bac. fluorescens.	70
Proeven in cavia-bouillon met konijnenbloed . .	78
Conclusies	85
Stellingen.	89

Inleiding.

Verschillende bacteriologen hebben over de vraag naar de variabiliteit der vormen de meest uiteenlopende meeningen verkondigd. Naegeli ¹⁾ sprak als zijne meening uit, dat alle bacteriën met elkander verwant waren en dat zij haar vorm en chemisme wijzigden al naar mate de middenstof was, waarin zij verblijf hielden; dat hetzelfde geslacht in den loop der jaren, nu eens verzuring der melk, dan eens rotting, dan weer typhus of diphtherie en andere ziekten kon verwekken, al naar gelang het in melk, vleesch of het lichaam kwam te groeien. In denzelfden geest sprak Billroth ²⁾ zich uit, hij bracht alle bacteriën tot één soort, welke hij den naam van *coccobacteria septica* gaf. Ook Ray-Lankester ³⁾ meende dat alle bacteriën genetisch aan elkaar verwant waren en dat zij, niettegenstaande den verschillenden vorm, waarin zij zich voordoen, als coccen, bacillen of spirillen, tot één zelfde soort behooren.

1) C. v. Naegeli. Die niederen Pilze 1877.

2) Untersuchungen über die Vegetationsformen von *Coccobacteria septica* 1874.

3) On a peach-coloured Bacterium. Quart. Journal of microscopical science 1873 Serie II.

Lijnrecht hiertegenover stond de meening van Pasteur ¹⁾. Bij zijne onderzoekingen om reine culturen te verkrijgen van elke gisting, kwam hij er toe om voor elke gisting een eigen soort aan te nemen, en toen hij later bij elke wijnziekte een eigen microbe kon aantoonen, stond het voor hem vast, dat elke vorm aan een eigen soort en elke soort aan een eigen ziekte beantwoordde. Ook Cohn ²⁾ en de school van Koch hebben over dit onderwerp vele onderzoekingen gedaan en komen tot de conclusie dat de bacteriën even goed in bepaalde soorten in te deelen zijn, als andere lagere planten en dieren. Maar, zegt Cohn verder, bij de indeeling wordt men zeer bemoeilijkt door de buitengewone kleinheid, het meestal samenleven van meerdere soorten en de variabiliteit der soorten. Vooral de onderzoekingen van Rodet ³⁾ en Roux hebben meer licht geworpen over deze variabiliteit. Zij toch toonen aan, en meerderen na hen hebben dergelijke resultaten gepubliceerd, dat zij in staat waren de morphologische, physische en chemische eigenschappen derzelfde soort te wijzigen, door verandering te brengen in den voedingsbodem, de temperatuur, den toevoer van zuurstof en de toetreding van licht.

1) Comptes rendus 1858.

2) Cohn. Untersuchungen über Bacteriën. Beiträge zur Biologie der Pflanzen 1 Heft. 2 1872.

3) A. Rodet. De la variabilité dans les microbes au point de vue morphologique et physiologique. Paris (Baillière fils) 1895.

Voor ons van meer gewicht echter is de vraag, hoe verhouden zich de pathogene eigenschappen. Ook hierover weer zijn de meeningen zeer verschillend. De vraag toch, vanwaar kwamen de eerste gevallen van infectieziekten, ligt zeer voor de hand. Heeft eene bacteriesoort steeds de eigenschap bezeten om in een voor de ontwikkeling gunstig geval zijne pathogene eigenschappen te doen gevoelen of zijn dit kunstproducten? Terecht, meen ik, zegt Pasteur hiervan: „C'est là une question insoluble dans l'état actuel de la science, puisqu'il rentre dans le grand inconnu de l'origine même de la vie!”

Kruse ¹⁾ geeft als zijne meening dat het pathogene effect afhankelijk is van verschillende voorwaarden: van de geschiktheid der bacterie om zich in het levende lichaam te vermenigvuldigen, van zijn vermogen plaatselijk en algemeen werkende stoffen te produceeren, van de hoeveelheid, den graad van virulentie en de porte d'entrée der micro-organismen.

Van een pathogene of niet-pathogene bacterie, zegt hij, zonder meer mag men in den strengen zin van het woord niet spreken, want er is geen bacterie, die onder omstandigheden niet eene ziekte verwekken kan, en aan den anderen kant kunnen als zeer pathogeen beschouwd wordende micro-organismen in vele gevallen zonder werking blijven. En, zegt hij verder, een autochtoon ontstaan van ziekte-verwekkende bacteriën uit

1) Die Micro-organismen. Dr. C. Flügge 1896, pag. 271.

saprophyten is tot nu toe voor geen enkel geval bewezen of waarschijnlijk gemaakt.

Hueppe¹⁾ zegt: hoewel voor vele soorten de standvastigheid of variabiliteit aanwezig is onder bepaalde omstandigheden, zoo zijn er toch ook gevallen, waarbij eene toevallige of kunstmatig bewerkte verandering der functie aan het licht komt.

Pasteur²⁾ verklaarde het verlies van virulentie van culturen van de hoendercholerabacterie als eene functioneele verandering, bij constant blijven der vormkenmerken. Loeffler³⁾ daarentegen beschouwde dit virulentieverlies aldus, dat wellicht eene niet virulente soort door toevallige verontreiniging de virulente soort overwoekerd had.

Later deelden Pasteur⁴⁾ en Buchner⁵⁾ gelijktijdig mede, dat hunne miltvuurbacteriën de virulentie konden verliezen, zoo zij ze aan bepaalde levenscondities onderwierpen. Pasteur verklaarde hierbij dat bij zijne proeven de graad der virulentie afgenomen was, hoewel de vormeigenschappen dezelfde gebleven waren. Buchner echter ging verder en meende dat bij voortzetting der proeven de miltvuurbacillen in hooibacillen en vice versa

1) Hueppe. Formen der Bacteriën.

2) Pasteur. Comptes rendus 1880. T 90.

3) Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte II 1881.

4) Comptes rendus T 92.

5) Ueber die experimentelle Erzeugung des Milzbrandcontagiums aus dem Heupilzen. Neu abgedruckt in Naegeli's Untersuchungen über niedere Pilze 1882. s. 140.

met tusschengelegen vormen overgingen. Koch ¹⁾ bestreed dit en sprak als zijne meening uit, dat ook hier eene toevallige verontreiniging had plaats gegrepen, waardoor de eene soort de andere overwoekerd had. Buchner ²⁾ verklaarde daarop later zijne omzetting van miltvuurbacillen in hooibacillen als eene verandering der miltvuurbacillen in onschadelijke, morphologisch identische bacillen.

Prazmowski ³⁾ toonde later nog aan dat de ontkieming der sporen voor beide bacteriën eene verschillende is, ook Buchner ²⁾ zelf bewees later dat er verschil bestaat in de resistentie der sporen en in het optimum en minimum der temperatuur voor de vorming en ontkieming der sporen, waardoor het bewijs geleverd was ten gunste van Pasteur.

Wijst hetgeen tot hiertoe medegedeeld is op het verloren gaan van eene eigenschap van een microbe, van meer gewicht voor ons doel zijn de volgende onderzoeken, waar het geldt het verkrijgen van eene nieuwe eigenschap.

Door Rodet ⁴⁾ en Roux is getracht den typhus-bacil uit *bact. coli commune* te kweeken en wel beschouwen zij het, dat *coli* in staat is in het menschelijk lichaam het vermogen te verkrijgen om typhus

1) Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte I. 1881.

2) Virchow's Archiv 1883 Bd. 91.

3) Biologisches Centralblatt. 1884. No. 13.

4) A. Rodet. De la variabilité dans les microbes au point de vue morphologique et physiologique, Paris (Bailliére fils) 1895.

abdominalis op te wekken. Doch het bewijs, dat dit geen hypothese doch een voldongen feit is, werd niet gegeven.

Maar ook om den graad der virulentie te verhoogen zijn verschillende pogingen in het werk gesteld met meer of minder succes, ja zelfs, om van een saprophyt een virulente bacterie te kweeken.

Met dit laatste heeft Vincent ¹⁾ zich geoccupeerd en ging daarbij te werk op eene wijze, die in hoofdzaak afweek van de methode door andere onderzoekers vóór hem gebruikt.

Vóór hem toch was door de onderzoekers steeds de bacterie, waarmede de proeven genomen werden, in direct contact gebracht met de sappen uit het dierlijk organisme en blootgesteld aan de inwerking der leucocyten ²⁾, of wel in symbiose met een andere bacterie gekweekt ³⁾, of gekweekt met toxine van andere bacteriën ⁴⁾. Geheel hiervan afwijkend handelde *Vincent*, die de methode door *Roux* voor een ander doel aangegeven, volgde, nl. door de bacteriën in collodiumzakjes ingesloten, te brengen in de peritoneaalholte van dieren. Zijn doel was, hierdoor de bacteriën

1) Sur les aptitudes pathogènes des saprophytes. Annales de l'Institut Pasteur, 25 Dec. 1898.

2) Charrin et Nittis. Un bact. subtilis pathogène, Soc. de Biologie 17 Juillet 1897.

3) Debrand. Annales de l'Institut Pasteur 25 Nov. 1900.

4) Trumpp. Centralblatt. f. Bacteriologie XX, p. 721.

tegen den invloed der leucocyten te beschermen en slechts diffusibele stoffen toe te laten.

Nocard, die eveneens met deze zakjes proeven heeft genomen, zegt ervan :¹⁾

La paroi de collodion offre une barrière infranchissable aux microbes comme aux cellules; les microbes ne peuvent sortir du sac, mais ils peuvent s'y multiplier en toute sécurité, car, les cellules ne pouvant y pénétrer, ils sont à l'abri de la phagocytose. D'autre part, cette paroi inaccessible aux microbes et aux cellules est perméable aux liquides comme aux substances dissoutes; elle forme une membrane osmotique parfaite; à son niveau s'établissent des échanges qui modifient profondément la composition primitive du liquide emprisonné; des substances élaborées par le microbe peuvent diffuser au dehors et, quand elles sont suffisamment actives, elles peuvent entraîner la mort du sujet ou des accidents d'intoxication plus ou moins graves, sans qu'un seul microbe ait envahi les tissus; en tout cas, c'est une condition favorable à la culture, l'auto-intoxication microbienne s'en trouvant diminuée, sinon supprimée; enfin, des produits venus de l'organisme du sujet pénètrent dans le sac qui peuvent être favorables ou non à la culture du microbe; en tout cas, la pénétration de ces produits ne se fait

1) Nocard. Annales de l'Institut Pasteur 25 Sept. 1898 pag. 564.

que lentement, graduellement; peu à peu, le microbe s'accoutume à ce nouveau milieu et quand on le tire du sac qui l'a protégé contre l'action phagocytaire il est beaucoup mieux armé pour se développer dans le milieu primitivement hostile ou réfractaire, que représentait l'animal incubateur.

Vincent nu entte voedingsbouillon in zulk een zakje met een niet-pathogene bacterie, bracht het zakje gesloten in het peritoneum en liet het hierin 5—6 dagen, daarna nam hij het er uit, entte van den inhoud in nieuwen bouillon, welke bij 37° in de broedstoof werd geplaatst. Na 2 dagen entte hij wederom van dezen bouillon in een zakje, bracht dit weer 5—6 dagen in het abdomen van eene cavia om daarna weer van den inhoud in bouillon in vitro te enten. Na 4 dezer passages zegt hij reeds resultaat te hebben en na de 6^e passage was de bacterie zeer virulent. Hij zegt dan ook in zijn artikel:

C'est ce procédé qui m'a fourni les résultats les plus efficaces.

Als van zelf rijst na het lezen van dit artikel de vraag, welke zijn dan de stoffen, die door den wand van het collodiumzakje heen dringen? Om op deze vraag een antwoord te geven, besloot ik met een aantal stoffen zoowel in vivo als in vitro enkele proeven te nemen, waarvan het resultaat in de volgende bladzijden wordt meegedeeld.

Tevens werden door mij met een der bacillen en wel Bac. Meg. en een ander, nl. Bac. fluoresens, de proeven op dezelfde wijze, als door Vincent beschreven, gedaan, waarvan eveneens het resultaat in de volgende bladzijden beschreven is.

Literatuur-overzicht.

Alvorens over te gaan tot de beschrijving der proeven, meen ik in enkele woorden te moeten meedeelen, welke proeven al reeds met collodiumzakjes genomen zijn. Hoewel niet alle met hetzelfde doel genomen werden, n.l. om van een saprophyt een virulente bacterie te kweken, meen ik toch goed te doen ze te vermelden, voor een deel om de resultaten door deze methode verkregen, voor een ander deel omdat uit enkele proeven blijkt, welke stoffen door den wand van het zakje in vivo diffundeeren.

Om eene betere vergelijking met mijne proeven mogelijk te maken, volgt hier dan allereerst hetgeen *Vincent* zelf over zijne proeven met *B. Meg.* meedeelt.

(*Annales de l'Institut Pasteur* 25 Dec. 1898, bladz. 788).

Expériences faites avec le „*B. Megaterium*.”

Le *B. megaterium* est un saprophyte très commun dans le sol. L'échantillon qui m'a servi a été isolé de la terre de jardin.

Ce microbe est inoffensif pour le lapin, le cobaye et la souris blanche; cette dernière peut recevoir 1 c. c. de culture sans en éprouver de dommage.

Un premier sac est fait le 17 avril 1897, et inséré dans le péritoine d'un cobaye; il en est retiré le 24 avril. Le contenu est faiblement trouble. On trouve, au microscope, des bacilles légèrement agglutinés, immobiles, sans spores. La deuxième culture en sac était plus trouble que la précédente. Ni l'une ni l'autre ne se montra encore pathogène.

Après quatre passages en sac, interrompus, chaque fois, par la culture en bouillon et à l'étuve, le bacille avait déjà acquis de la virulence. Quinze gouttes, additionnées d'un peu de bouillon neuf, tuent la souris en moins de 24 heures, en injection souscutanée. A l'autopsie, on trouve, au point inoculé, un peu de liquide d'oedème de couleur jaune clair, renfermant quelques bacilles et de très rares lymphocytes. Les préparations faites avec l'enduit péritonéal montrent également quelques bacilles prenant bien la coloration. Dans la rate et le foie, les bacilles sont cependant vacuolaires et se teignent à peine par le Gram. Les poumons sont vivement congestionnés, parsemés de petits foyers de pneumonie. Le sang du coeur renferme des bacilles dégénérés. Le microbe, quoique déjà un peu virulent, était donc, néanmoins, atteint lui-même dans sa vitalité. Ainsi exalté par cultures successives en sac, le bacille finit, cependant, par acquérir, après le sixième passage, une virulence considérable. Quatre gouttes et même, dans un cas, deux gouttes injectées sous la peau tuaient la souris en 10—12 heures, avec des lésions de péricardite et de pleurésie hémorragiques. Au microscope, le liquide épanché montrait de nombreux bacilles, parfaitement colorables. On apercevait de très rares lymphocytes intacts, et de nombreux leucocytes dégénérés, parfois même à peine reconnaissables, dont le noyau était fragmenté en un nombre infini de granulations irrégulières, éparses dans le protoplasme de la cellule. Nulle apparence de globules rouges, malgré l'aspect hématique de l'épanchement pleuro-péricardique.

Il y avait donc, en même temps qu'une leucolyse intense, une dissolution de l'hémoglobine telle qu'on l'observe dans les septicémies hémorragiques. Le sang du coeur présentait l'aspect dissous; le

bacille y était abondant. L'abdomen était météorisé; le foie, d'aspect lavé; la rate, très tuméfiée molle et noire. L'exsudat péritonéal renfermait de nombreux bacilles, sans trace de phagocytose.

Ce microbe, si actif pour la souris blanche, était également très redoutable pour le cobaye et pour le lapin: un demi c. c. tuait un cobaye de 450 gr. en 24 heures, après injection péritonéale; en 2 ou 3 jours en injection sous-cutanée, avec envahissement des viscères et du sang. L'inoculation intraveineuse de la culture en sac amenait la mort, en 12 heures, d'un lapin pesant 1,850 gr., à la dose de un demi c. c. Un c. c. tuait un autre lapin en 8 heures. L'autopsie ne révélait qu'un peu de congestion des reins et des poumons, et du gonflement de la rate. Le sang contenait de nombreux bacilles.

On avait donc réussi à communiquer au *B. megaterium* des propriétés pathogènes très prononcées qui le rendaient capable d'agir avec la même activité redoutable que les virus les plus énergiques. Il tuait les animaux sans déterminer de lésion locale, presque sans altération apparente des viscères, avec la marche d'une septicémie suraiguë.

En même temps que le bacille acquérait de la virulence, on constatait un changement manifeste dans les caractères de ses cultures. A l'état normal, le *B. megaterium*, ensemencé dans le bouillon, y forme, à la surface, un voile assez épais bordé d'une collerette. Le bouillon sous-jacent est presque clair et renferme quelques grumeaux, visibles quand on l'agite. Or, dès le quatrième passage en sac, notre bacille troublait abondamment et uniformément le bouillon, formait des ondes chatoyantes quand on agitait celui-ci, et ne sécrétait plus de voile ni de collerette à la surface. Il semblait s'être adapté, aux nouvelles conditions d'anaérobiose relative réalisées par la culture dans les sacs de collodion.



In de Annales de l'Institut Pasteur verscheen een artikel getiteld:

Toxine et antitoxine cholérique par El Metchnikoff, E. Roux et Taurelli Salembini.

Ook bij de daarin medegedeelde proeven werd van collodiumzakjes gebruik gemaakt en wel ter beantwoording der vraag of de vibrio cholerae reeds tijdens het leven of eerst na den dood toxine afscheidt.

Aan M. Ransom en M. Behring ¹⁾ was het gelukt uit eene cultuur van choleravibrionen in bouillon een gift te bereiden van groote activiteit, hetwelk bij eene temperatuur van 100° niet veranderd werd. M. Pfeiffer ²⁾ beweerde dat dit choleragift eerst vrij komt bij het afsterven van de microben. De bedoelde proeven met collodiumzakjes nu werden om de zaak uit te maken op de volgende manier genomen.

Drie collodiumzakjes werden gevuld:

N°. 1 met gesteriliseerde oplossing van 2% pepton, hierin geënt een spoor van virulente vibrio cholerae.

N°. 2 met dezelfde oplossing, hierin geënt 2 geheele culturen van vibrio cholerae op agar, welke microben vooraf door chloroform gedood waren.

N°. 3 met sterielen bouillon.

Deze zakjes worden elk afzonderlijk in het abdomen van eene cavia van gelijk gewicht gebracht.

Cavia N°. 3 blijft gezond.

1) Deutsche Medicin. Wochenschrift 1895, No. 29.

2) Zeitschrift für Hygiene, Vol. II, 1896.

Cavia met zakje N°. 2 vertoont de volgende dagen wat temperatuursverheffing en wordt inager.

Cavia N°. 1 vertoont na 24 uur wat temperatuursverheffing, welke de volgende dagen toeneemt. Tusschen den derden en vijfden dag succombeert het dier. Bij de autopsie wordt het zakje met troebel vocht gevuld teruggevonden, noch in het bloed, noch in de organen wordt eene vibrio aangetroffen.

De vibrio is in het zakje ontwikkeld zonder in het lichaam over te gaan en heeft een oplosbaar gift geproduceerd, dat door den wand van het zakje is gediffundeerd.

In hetzelfde artikel worden ook proeven meegedeeld waarbij men met behulp der collodiumzakjes in staat was, den graad van virulentie van vibrio cholerae te versterken.

Hiertoe diende eene cultuur, afkomstig van de epidemie in Pruissen, herfst 1894, welke eene middelmatige cavia in eene dosis van eene halve agarcultuur van 24 uur doodde.

Deze vibrio werd door verschillende passages in collodiumzakjes in het peritoneum van caviae's, afgewisseld tusschen elke twee passages door eene strijkcultuur op agar, zoo versterkt dat $\frac{1}{120}$ van eene cultuur eene cavia doodde. De inhoud van het zakje was na 24 uur troebel, na 48 uur melkachtig wit, veroorzaakt door eene enorme hoeveelheid zeer beweeglijke, dunne

en korte vibrionen. Van af den 3^{en} dag ziet men naast de normale vibrionen, ronde vormen, die de volgende dagen in aantal toenemen, terwijl tegelijk weer anderen langer worden en slecht kleurstof opnemen. Van af den 7^{en} dag heeft men slechts ronde vormen; in dezen toestand zijn de vibrionen niet dood, daar na 2 maanden of langer het uitzaaien op agar voldoende is om eene cultuur te krijgen.

Gedurende de eerste dagen nu, als de vibrionen den draadvorm hebben, vermeerderd de virulentie, door directe inoculatie aan te toonen. Later als de ronde vormen domineeren, zijn zij minder virulent, doch zij herkrijgen hunne virulentie, wanneer men ze op agar ent en deze cultuur eenmaal in een collodiumzakje weer in het abdomen van eene cavia brengt.

Het maximum van activiteit verkrijgt men, indien men uit een zakje, dat 48 uur in het abdomen is geweest, direct occuleert in het peritoneum van eene cavia, het exsudaat wat daardoor ontstaat in een collodiumzakje ent en eenmaal het abdomen doet passeeren. Door deze afwisselende passage wordt de vibrio zóó virulent, dat $\frac{1}{10}$ cc eene cavia doodt, bij intra-abdominale injectie.

Laat ik er na deze mededeeling direct op wijzen dat Dr. J. H. F. Kohlbrugge deze proeven op dezelfde wijze in het Hygiënisch Instituut te Utrecht heeft verricht, doch geen spoor van virulentie-verheffing na zijn 5^e passage heeft kunnen ontdekken.

Nocard en Roux ¹⁾ is het gelukt, door gebruik te maken van de methode van collodiumzakjes de microbe te ontdekken, die de peripneumonie bij het rund verwekt.

Tot dien tijd was men alleen in staat deze ziekte op te wekken door bij een rund wat sereuse vloeistof in te spuiten, die zich bij het zieke dier in de mazen van het interlobulaire longweefsel ophoopt.

Op verschillende voedingsbodems was het niet gelukt eene cultuur te kweken.

Een collodiumzakje gevuld met bouillon en een spoor sereus vocht uit de pulmo van een rund lijdende aan peripneumonie werd bij eene cavia in het abdomen gebracht. Na 15—20 dagen bevatte het eene vloeistof opalesceerend en licht eiwitrijk. De inhoud, op meerdere voedingsbodems van verschillende samenstelling uitgezaaid, leverde echter geene cultuur op.

Onder het microscoop daarentegen zag men bij zeer sterke vergrooting en sterk licht een aantal kleine lichtbrekende puntjes, waarvan ook na kleuring geen vorm was te bepalen.

Van een contrôlezakje, alleen met bouillon gevuld, vertoonde de inhoud deze puntjes niet.

Ten bewijze, dat deze puntjes levende wezens waren, werden twee zakjes ingebracht, een met bouillon gevuld, waaraan toegevoegd was een spoor van de

1) Le Microbe de la peripneumonie par M. M. Nocard et Roux. Annales de l'Institut Pasteur, Avril 1898

vloeistof, waarin deze puntjes voorkwamen, het tweede met dezelfde vloeistoffen gevuld, doch vóór het inbrengen verhit. Het eerste zakje vertoonde dan na eenige dagen weer eene troebele vloeistof, zeer vele kleine puntjes bevattend, het tweede zakje bleef helder, waaruit de schrijvers de conclusie trekken, dat de hitte de kiemen gedood heeft.

Injiceerde men nu kalveren met de aldus verkregen vloeistof, zoo deden zich bij alle de karakteristieke veranderingen voor, als bij het rund lijdende aan peripneumonie.

Aan het slot van het artikel vermelden de schrijvers dat het hun eenmaal gelukt is in vitro dezelfde kiemen te kweken. En wel door uit te gaan van bouillon, die door een verblijf van enkele weken in een collodiumzakje in het abdomen van eene cavia licht eiwitrijk was geworden ¹⁾. Aan dezen bouillon werd een weinig van het sereuse vocht toegevoegd en gedurende 72 uur in de broedstoof geplaatst. Na dien tijd was de bouillon eveneens opalesceerend, troebel en vertoonde dezelfde lichtbrekende puntjes. Na vele pogingen, dit eene 2^e maal te herhalen, zonder dat een van alle met succes bekroond werd, gelukte het den schrijvers een voedingsbodem te bereiden, waarin niet alleen de door collodiumzakjes verkregen kiemen bleven leven, maar

1) Vergelijk diffusie-proeven in vivo (bladz. 37).

waarin zij ze ook uit het sereuse vocht konden kweken. In dezen bouillon, zeggen zij, werd de virulentie beter bewaard, dan door de verschillende passages in collodiumzakjes, want hierdoor *werd de virulentie verminderd*.

De bouillon was bereid volgens Dr. Louis Martin ¹⁾ en hieraan toegevoegd $\frac{1}{5}$ serum van kalf of konijn.

In dit artikel wordt terloops meegedeeld, dat men inplaats van collodiumzakjes, ook kan gebruiken zakjes gemaakt van het binnenste vlies van een riet.

Om een bacillus, reeds pathogeen voor één diersoort, dit ook voor eene andere soort te maken, maakte Danysz ²⁾ ook gebruik van de methode van collodiumzakjes.

Een cocco-bacil, dezelfde eigenschappen vertoonend als b. coli en gelijkend op den bacillus typhi murium van Loeffler, werd geïsoleerd bij gelegenheid eener epidemie onder de veldmuizen en toonde zich iets pathogeen voor de grijze rat (*Mus decumanus*).

Van 10 proefdieren, die er mee gevoed werden, stierven er drie.

Passages van rat op rat, zoowel door voeding als subcutane injectie, verminderden de virulentie. Ook door passages in het abdomen van ratten in collodiumzakjes *verminderde de virulentie*, hetzij onafgebroken van zakje

1) Annales de l'Institut Pasteur 25 Jan. 1898.

2) Un microbe pathogène pour les Rats, par J. Danysz. Annales de l'Institut Pasteur Avril 1900.

in zakje, of dat tusschen 2 zakjes eene cultuur op agar of in bouillon was aangelegd.

Daar het gebleken was, dat de microben geïsoleerd uit het bloed of de milt van een dier, op het oogenblik dat zij in het bloed overgaan meer virulent zijn bij voeding ermee, dan die na den dood verkregen zijn, werd op de volgende wijze gehandeld.

Eene cultuur in bouillon, geïsoleerd uit het bloed van eene muis, gedood 24 uur na de voeding met een virus, dat doodde in 4 à 5 dagen, werd 24 uur in de stoof geplaatst, uitgezaaid in nieuwen bouillon en verdeeld in kolven, zoo vol mogelijk gevuld. De kolven werden tot de ontwikkeling der cultuur in de stoof gehouden en dan bij gewone temperatuur geplaatst tot de vorming van een depôt en de klaring van den bouillon compleet was, wat 4 à 5 dagen duurde en ten doel had de microbe aan de lucht te onttrekken. Uit de kolf ging de cultuur in een collodiumzakje 24 à 36 uren in de abdominaalholte van eene rat, dan weer in gewonen bouillon, en vervolgens weer in kolven. De cultuur van deze laatste kolven werd op agar uitgezaaid en de zoo verkregen cultuur aan muizen te eten gegeven, na ze in water verdund te hebben en er brood mee gedrenkt te hebben. Dit herhaalt men meerdere malen en na 4 of 5 passages is de virulentie sterk toegenomen. De muizen, die eerst na 4 of 7 dagen stierven, sterven reeds na 36—60 uren.

Na de muizen werden witte ratten genomen van een maand of zes weken, en bij volgende passages oudere dieren. Ook voor deze dieren verkreeg de schrijver een virulenten cocco-bacil.

Op dezelfde wijze is het hem ook gelukt voor de zwarte rat een virulenten cocco-bacil te kweken.

Proeven met collodiumzakjes tot het opsporen van het tot nog toe onbekend micro-organisme van koepokken en variola worden door Manckton Coperman¹⁾ beschreven.

Proeven op verschillende voedingbodems genomen gaven geen resultaat. Injecties van lympe van koepokstof in de peritoneaalkholte van levende dieren hadden evenmin succes, waarschijnlijk ten gevolge van de tegenwoordigheid van leucocyten.

Om nu een levend medium zonder leucocyten te hebben werd een hoenderei genomen, dat bevrucht bleek te zijn, zooals aangetoond werd door het begin van ontwikkeling van het embryo na broeiing. Hiermee werd aanvankelijk eenig resultaat verkregen.

Beter echter ging het door gebruik te maken van collodiumzakjes. Deze werden met bouillon gevuld en geënt met een spoor cultuur van vaccine op lymph glycerine; gesloten en gedurende 1—2 weken in het abdomen van een hond of konijn gelaten. In de gun-

1) British medical Journal 22 Febr. 1901.

stige gevallen bevatte de vloeistof geen leucocyten, maar wel serum-albumine. Onder het microscoop bekeken zag men talrijke, levende massa's lichaampjes, die op sporen geleken, waarvan slechts de peripherie gekleurd werd. Ook kon men na enting met deze vloeistof een typischen uitslag van pokken bij het kalf opwekken.

Dr. Tremlin en de schrijver toonden ook aan, dat deze op sporen gelijkende lichaampjes vaak in buitengewoon groot aantal in het epitheel van de blaasjes van pokken van het kalf en van de kinderpokken aangetroffen worden.

Om het bewijs te leveren dat de bacillus tuberculosis hominis en de bacillus tuberculosis avium slechts twee variëteiten van één soort zijn, maakte Nocard¹⁾ ook gebruik van collodiumzakjes.

In den aanhef van zijn artikel wijst de schrijver op het verschil in cultuurkenmerken van de bacillen der zoogdier-tuberculose en die der vogels en dat het niet gelukt om op kippen de tuberculose der zoogdieren over te brengen; dat aan den anderen kant enkele zoogdieren weerstand bieden tegen den bacillus tuberculosis avium en dat, gaat een zoogdier al te gronde dan de laesies nog verschillen van die,

1) Sur les relations qui existent entre la tuberculose humaine et la tuberculose aviaire. M. Nocard. Annales de l'Institut Pasteur Sept. 1898,

welke de bacillus tuberculosis hominis opwekt. Hier-
 tegen kan men aanvoeren dat niettegenstaande het ver-
 schil van hun aspect de culturen eene identische tuber-
 culose geven, dat het soms gelukt de kippen tuberculeus
 te maken door ze te inoculeeren met bacillus tubercu-
 losis hominis, van de eene kip op de andere overen-
 tend; dat er zoogdieren zijn, die even gevoelig zijn
 voor den bac. tuberculosis avium als voor den bac.
 tuberculosis hominis en dat na weinige passages de
 pathologisch-anatomische laesies identisch zijn.

Het paard, hoe resistent ook tegen artificieele tuber-
 culose, wordt vaak in natuurlijke condities tuberculeus
 en wel in twee vormen, den pulmonalen en den intesti-
 nalen vorm, waarvan de eerste met het type humaine,
 de tweede met het aviaire identisch is. Tuberculeuse
 sputa bij eene cavia geïnjecteerd, deden pathologisch-
 anatomische veranderingen optreden, als van het type
 aviaire.

Overigens bestaan er een aantal goed geobserveerde
 feiten, dat kippen tuberculeus werden, maanden nadat men
 ze had laten rondloopen op terreinen, waar ook phtisici
 verkeerden; de conclusie scheen onvermijdelijk dat de
 vogels geïnfecteerd waren door het opeten van tuber-
 culouse sputa. Hetzelfde werd geconstateerd bij kippen,
 die tuberculeus vleesch op abattoirs gegeten hadden.

Doch, zegt de schrijver, al moge het paard, de koe,
 het konijn enz., ook krijgen de tuberculosis avium evenals

de tuberculosis hominis, dit bewijst nog niet dat deze identiek zijn. Daarvoor is noodig den bacillus tuberculosis hominis, om te zetten in den bacillus tuberculosis avium. Dat dit kan geschieden, toonde de schrijver aan, waarbij hij gebruik maakte van de collodiumzakjes.

De zakjes werden gevuld met eene dikke emulsie van jonge cultuur van bacillus tuberculosis hominis, bij voorkeur op glycerine-aardappel gekweekt. Er werd tegelijk bij vele kippen elk zulk een collodiumzakje ingebracht, daar zij licht braken tijdens het tamelijk langdurig verblijf in het abdomen. Bij het uitnemen was het zakje bijna leeg, wat strooperige vloeistof bevattend, gevormd door de bacillen van Koch.

Uitgezaaid op aardappel kwamen zij matig op en wel het aspect van den bacillus tuberculosis avium vertoonend. Van deze cultuur werd bij eene cavia iets onder de huid gebracht, er vormde zich een abcesje, dat zich opende en weer genas. Inspuiting in de peritoneaalholte echter deed de grootste helft der aldus behandelde dieren sterven.

Kippen daarentegen boden steeds weerstand, hoe ook ingespoten, hetzij subcutaan, hetzij intraperitoneaal, hetzij intraveneus.

Bij eene tweede proef, waarbij de zakjes tot zes maanden in het abdomen verbleven, verkreeg men dezelfde resultaten. Eerst bij de derde proef, toen de zakjes tot 8 maanden toe in het abdomen waren ge-

weest, kon men eene kip dooden, door van den inhoud in te spuiten in een vena of in de peritoneaalholte en vertoonden deze dieren dezelfde laesies als wanneer zij gestorven waren aan tuberculosis avium.

Uit deze proeven dan besluit de schrijver dat de twee bacillen, hoe verschillend ook in voorkomen, niet anders zijn dan twee variëteiten van dezelfde soort en dat men aan den bacillus tuberculosis hominis de biologische eigenschappen en virulentie kan verschaffen, als van den bacillus tuberculosis avium.

Met het doel om de toxiciteit van bacillus tetani te verhoogen, die, in symbiose gekweekt in vitro met bac. subtilis, reeds eenigen graad van virulentie verkregen had, volgde Debrand ¹⁾ ook de methode met collodiumzakjes.

Het filtraat van de gemengde cultuur, waarvan hij uitging, doodde bij eene hoeveelheid van $\frac{1}{200}$ cc. cultuur in ouden bouillon eene cavia van 460 gr. in 48 uur. Reeds na de 4^e passage was de toxiciteit verdubbeld. In een zakje werd de gemengde cultuur in het abdomen gebracht, en reeds den vierden dag er uit genomen, daar den vijfden dag reeds het dier aan abdominale tetanus te gronde ging. Na elke passage werd eene cultuur aangelegd en het volgende zakje

1) Sur un nouveau procédé de culture du bacille du tetanos par Debrand. Annales de l'Institut Pasteur Nov. 1900.

steeds geënt met eene cultuur van 24 uren. Na vier dezer passages dan was de toxiciteit verdubbeld.

In The Lancet (van 10 en 17 Aug. 1901) komt een voordracht voor van *Mazyck P. Ravenel* gehouden op het tuberculose-congres te Londen.

De schrijver vermeldt hierin, hoe hij een groot aantal reine culturen van tuberkelbacillen van menschelijke en dierlijke herkomst isoleerde en de morphologische en cultuureigenschappen dezer bacillen bestudeerde. Onder de methoden waarop hij dit laatste deed, vermeldt hij ook het gebruik maken van collodiumzakjes.

Bacillen van menschelijke herkomst werden in collodiumzakjes in de buikhölte van het rund gebracht en er 7 tot 11 maanden ingelaten. Daardoor verkreeg hij wel veranderingen in cultuur- en morphologische eigenschappen, maar trekt voor het overige nog geen conclusies, daar de proeven te kort zijn voortgezet.

Volledigheidshalve dienen ook hier vermeld te worden de proeven door *Pekelharing* genomen ¹⁾.

Hem was het daarom te doen zijne bacillen, (hij experimenteerde met miltvuurbacillen) in het subcutane celweefsel te brengen, zooveel mogelijk beschermd tegen de leucocyten, doch zoo, dat het voedingsvocht van het subcutane celweefsel er toe kon toetreden.

1) Zittingsverslag der Kon. Akad. van Wetensch. 29 Juni 1889,

Van een laagje vleeschwater-pepton-agar met cultuur werd een stukje genomen en in uitgekookt perkamentpapier gepakt, dit met zijden draden toegeknoopt en bij een konijn onder de huid van den rug gebracht.

Waren de bacillen zonder sporen, dan kon na 8 dagen het pakje er uitgenomen worden en onder de huid van eene cavia de ingesloten cultuur gebracht worden, zonder dat het dier aan miltvuur-infectie te gronde ging.

Waren er sporen in de cultuur dan was een verblijf van 14 à 20 dagen noodig om deze te dooden. Een contrôle-dier, dat een stukje van dezelfde voedingsgelei met cultuur onder de huid kreeg, stierf aan miltvuur binnen enkele dagen.

Hoewel de schrijver toegeeft dat enkele leucocyten bij het openen zijner pakjes daarin gevonden werden, was dit aantal zoo gering, dat hij aan dezen den dood der bacillen niet kan toeschrijven, maar wel den dood veroorzaakt acht door eene stof in het voedingsvocht van het subcutane celweefsel aanwezig.

Ook *Hamburger* heeft op deze wijze proeven genomen¹⁾.

Tegen de meening van *Pekelharing*, dat er in het voedingsvocht van het subcutane celweefsel eene stof voorkomt in staat de bacillen en sporen te dooden komt *Sanarelli*²⁾ op. Hij komt door zijne onder-

1) De invloed van veneuse stuwung op microben. Dr. H. J. Hamburger. Tijdschrift voor Geneeskunde 1898. 16 Juli.

2) La destruction du virus charbonneux sous la peau des animaux sensibles. Annales de l'Institut Pasteur 1893. 7.

zoekingen tot eene geheel tegenovergestelde conclusie en zegt, dat de lympe van het onderhuidsche celweefsel juist een uitnemende voedingsbodem is voor de sporen.

Bij deze proeven gebruikte hij collodiumzakjes, die, zegt hij, geen enkelen leucocyt doorlieten, wel drong langzamerhand de lympe door den wand naar binnen.

In zulk een zakje bracht hij sporen van miltvuurbacillen en bracht dit zakje gesloten in het subcutane celweefsel. De lympe, die naar binnen drong, bevochtigde de sporen en deed ze ontkiemen, en weldra was de inhoud eene rijke cultuur van bacillen zonder sporen en zeer virulent. Na enkele dagen echter zag hij de eerst zoo krachtige ontwikkeling ophouden en de bacillen degenereeren en sterven als in elken anderen voedingsbodem. Toch geeft hij toe het verschil dat er bestaat in de culturen gekweekt in en buiten de zakjes. Bij culturen niet in zakjes gekweekt gaan ook wel de bacillen te gronde, maar de gevormde sporen overleven en daardoor blijft de virulentie, in de zakjes echter vormt de bacillus geen sporen, zoodat de vegetatieve vormen sterven en gelijk hiermee de verzwaking en vernietiging van het virus voortschrijden. In goed permeabele zakjes kan het doodelijk virus gedurende 27 dagen ongeveer bewaard blijven, later is de inhoud niet meer virulent. Dit dan, zegt de schrijver,

toont aan dat de sporen niet gedood werden, maar hunne normale kiemkracht hebben bewaard.

In dit artikel worden Morpurgo en Tirelli ¹⁾ genoemd, wien het gelukte in zulke zakjes in het subcutane celweefsel de ontwikkeling te bewerken van den bacillus tuberculosis en den bacil van den kwaden droes.

1) Archivio per le scienze mediche, Juni 1892.

Techniek.

Van alle schrijvers, die hunne proeven, met collodiumzakjes genomen, meedeelen, vindt men slechts bij Sanarelli ¹⁾ eene beschrijving, hoe hij deze zakjes maakte. Slechts enkele opmerkingen, meer betrekking hebbende op de dikte van den wand, komen in de mededeeling van *Vincent* voor. Zoo wordt daarin gesproken op pag. 787: van la paroi *mince* de collodion; en op pag. 788: ²⁾ l'usage de sacs à parois assez *épaisses*, qui protègent mieux les bactéries contre l'action des humeurs et des sécrétions leucocytaires.

Sanarelli beschrijft zijne methode van fabricatie der zakjes, door hem gebezigd om zich steriele lympe uit het subcutane celweefsel te verschaffen, als volgt:

Ich verschaffte mir Glasstäbchen mit abgerundeten Enden von 5—6 mM. Dicke, sterilisirte sie in der Flamme oder in der heissen Kammer und tauchte sie dann zu wiederholten Malen (4—5 Mal) in eine fünfprozentige Pyroxylinlösung, so dass sie sich mit

1) Centralblatt für Bacteriologie und Parasitenkunde 1891 IX B No. 14.

2) Annales de l'Institut Pasteur Dec. 1898.

einer schwachen Schicht von Collodium überzogen, worauf ich sie langsam und kurze Zeit in der wärme trocknen liess. Auf diese Weise erhielt ich Säckchen von Collodium mit einer einzigen Oeffnung, derjenigen aus welcher das Glasstäbchen herausgezogen worden war, und diese schloss ich durch Drehung vermittelt einer sterilisirten Zange und sicherte den Verschluss durch Hinzufügung neuen Collodiums.

Mit Hülfe einiger Handfertigkeit, die man schnell erwirbt, kann man in kurzer Zeit eine grosse Zahl kleiner Cylinder von 3—4 cM. länge und 1—2 cM. Inhalt fabriziren.

Allereerst werd door mij gezocht naar eene methode om een zoo groot mogelijk zakje te maken, aangezien het veel voordeel had om de stof, waarvan men wilde onderzoeken, of zij door den wand diffundeerde, met zoo groot mogelijke oppervlakte van het zakje in aanraking te brengen. Dit leverde, dank zij de aanwijzingen van mijn promotor, niet de grootste moeilijkheid op.

Voor collodium werd gebruikt dat hetwelk in den handel verkrijgbaar is. Laat ik hierbij opmerken, dat alle zakjes door mij gebruikt, van een en denzelfden voorraad collodium gemaakt zijn.

In dit collodium nu, dompelde ik langzaam een goed aan de buitenzijde schoongemaakt reageerbuisje, met den bodem naar onderen gekeerd. Laat men er

dit langzaam inzakken en eveneens weer langzaam uit opstijgen, zoo vormt zich om het buisje een gelijkmatig verdeeld dun laagje collodium. Men plaatst nu het buisje met den bodem naar boven.

Is deze laag collodium nu gedroogd, dan kan men nogmaals hetzelfde buisje in het collodium laten zakken en uithalen en op deze wijze de dikte van het zakje regelen naar men zelf wil. De lengte van het zakje regelt men, zooals van zelf spreekt, door het min of meer dieper in laten zakken van het buisje. Door mij werden zakjes gebruikt van 1 laag collodium dikte.

Was het collodium om het reageerbuisje goed droog, gwl. na een half uur, dan werd met een mes het vliesje aan den bovenrand wat losgeschraapt van den glaswand. Gedurende een uur werd het dan in absoluten alcohol geplaatst, daarna in een groot vat water ook gedurende een uur. Neemt men dan het buisje in de volle hand dan kan men door eene lichte draaiende beweging van het reageerbuisje, dit uit de laag collodium halen. Meermalen echter scheurde bij deze laatste behandeling het zakje.

Door eene kleine wijziging echter kon ik dit voorkomen. In de reageerbuisjes werd in den bodem in elk een klein gaatje gemaakt ongeveer 1 à 2 mM. in diameter. Dompelt men nu om te beginnen even den bodem van het buisje in het collodium, zoo vormt zich hierop een dun vliesje, dat het gaatje afsluit. Om dit

vliesje iets te versterken kan men dit nog eens herhalen. Men gaat nu verder te werk als boven beschreven. Bij het plaatsen in alcohol en water, vult men echter ook het buisje met alcohol en daarna met water. Is dit geschied dan kan men door aan de open zijde van het reageerbuisje te blazen, het zakje daarvan doen afglijden. Het is voldoende dit nu aan de lucht te drogen om een helder, doorschijnend zakje te verkrijgen.

Voor mijne diffusie-proeven, blies ik het zakje niet geheel van het reageerbuisje af, maar slechts voor ongeveer twee derden. Liet ik nu dit zoo aan de lucht drogen, dan sloot het overige van het zakje zich zoo vast aan het reageerbuisje aan, dat hierdoor niets heen kon.

Elk zakje werd voor het gebruik onderzocht, of er wellicht een lekje in was. Daarvoor werd het tot aan den bovenrand gebracht in water en krachtig geblazen in de opening van het reageerbuisje. Zag ik nu nergens een luchtbelletje van uit het zakje in het water opstijgen, dan nam ik aan dat het zakje ook niet lek was, en beschouwde het als geschikt voor de proeven.

Meer moeite leverde het maken van zakjes op, geschikt om te gebruiken voor proeven in het dierlijk organisme. Niet zoozeer in het maken van het zakje bestond deze, maar wel daarin, hoe het zakje volmaakt te sluiten?

Allereerst werd beproefd de opening van een zakje, afgeblazen van een reageerbuisje, door een draad zijde

dicht te knoopen. Hierbij scheurde echter zoo vaak het opeengedrongen collodiumvliesje in, dat deze methode als onbruikbaar moest worden beschouwd.

Eene tweede methode bestond hierin, dat door eene klem de ronde opening werd dichtgeknepen tot eene spleet. Deze werd dan bestreken met eene oplossing van alcohol en aether van dezelfde samenstelling als bij het bereiden van het collodium wordt gebruikt, waardoor de wand tot een geheel versmolt. Ook deze sluiting bleek mij bij onderzoek onvoldoende.

Ik onderzocht dit op de volgende manier.

Van een zakje aan een reageerbuisje bevestigd voor diffusieproeven, werd de bodem afgeknipt en daarna de opening op boven beschreven wijze dicht gesmolten. Het geheel werd gesteriliseerd, met sterielen bouillon het zakje voor twee derden gevuld en hierin door het gaatje in de glazen buis b. pyocyaneus geënt, vervolgens dit zakje zoo in sterielen bouillon geplaatst, dat de bevestigingsplaats van het zakje aan de glazen buis daar boven uitstak.

In twee van de vier proeven ontwikkelde zich na één dag in den omringenden bouillon bac. pyocyaneus, wat ik toeschreef aan onvolkomen sluiting van den dicht gesmolten bodem. Het zakje, waarvan ik uitging, was nl. van te voren door de blaasproef op dichtheid, onderzocht. De methode van sluiting door Sana-relli aangegeven en vermeld in den aanhef van dit

hoofdstuk, werd niet geprobeerd, daar ik dit artikel eerst gelezen heb, toen deze proeven reeds geschied waren.

Ik sloeg daarom voor de bereiding dezer zakjes een geheel anderen weg in en ging uit van gelatine-capsules, zooals zij in den handel verkocht worden en gebruikt worden in de geneeskunde voor het innemen van sommige medicamenten. Allereerst werd de capsule, door de vlakke waar de twee helften over elkaar schuiven, met collodium te bestrijken en vervolgens de capsule dicht te doen, tot één geheel gemaakt. Door de twee helften meer of minder ver over elkaar te schuiven, verkreeg men een kleiner of grooter geheel. In den bodem van deze saamgekleefde capsule werd met eene naald een gaatje geprikt en vlak daarnaast de capsule op eene naald gestoken om er daardoor gemakkelijk mee te kunnen manipuleeren. Dompelde men nu deze capsule in collodium onder, zoo zag men uit de opening een luchtbelletje omhoog stijgen, haalde men dan voorzichtig de capsule uit het collodium, zoo was het eerstgenoemde gaatje gesloten. Het gaatje werd in de capsule geprikt, daar anders de er in opgesloten lucht niet kon ontwijken en dan wanneer het zakje reeds uit het collodium was, nog ontweek op de plaats, waar de twee helften aaneen verkleefd waren, en dus hier eene opening in het collodium-vliesje achterliet. Nadat het collodium gedroogd was,

werd het geheel van de naald genomen en het gaatje, waarin de naald gestoken had, iets vergroot. Door deze opening werd het met een pipet met water gevuld, slechts eene kleine luchtbel er in overlatende. Daarop werd het met de opening naar omlaag in een bekersglas met water geplaatst, de luchtbel stijgt dan omhoog en doet de capsule aan de oppervlakte drijven. Dit water werd verwarmd en de gelatine van de oorspronkelijke capsule loopt dan als eene dikke strooperige massa uit de opening. Was alle gelatine op deze wijze verwijderd, dan liet men het collodiumzakje aan de lucht drogen. Deze zakjes waren gemakkelijk door middel van een injectiespuitje te vullen en het sluiten leverde geen bezwaar op, daar een enkele druppel collodium met een penseel op de opening gebracht, deze volkomen afsloot. Dit bleek door een gesteriliseerd zakje met pyocyaneus te enten en gesloten in sterielen bouillon in de broedstoof te plaatsen. In het zakje ontwikkelde zich eene cultuur, de omringende bouillon bleef steriel en helder.

Door meerdere onderzoekers reeds was er over geklaagd, dat de zakjes zoo licht braken, terwijl zij in het abdomen waren ingesloten. Dit ongerief trachtte ik te voorkomen, door de zakjes in étui ingesloten in te brengen, daarbij er steeds op lettende, dat de vochten door dit étui van alle kanten gemakkelijk het zakje konden bereiken.

Een étui van glas gemaakt voldeed niet door zijne grootte, een van eboniet, daardoor niet, dat het bij steriliseeren in stoom van hooge spanning sprong. Ik maakte daarom étui's, weer uitgaande van capsules, op de boven beschreven wijze, doch nu van 6 à 8 lagen collodium dik.

Nadat de gelatine er uit verwijderd was, werd deze dikke collodiumzak aan een zijner uiteinden, liefst het dunste, doorgeknipt, en door middel van eene fijne kurkenboor werden er dan vele gaatjes uitgeboord. Dit étui werd gesloten door een kort stukje van eenen anderen dikken collodiumzak, eveneens met gaatjes doorboord, dat er als het ware als een dekseltje werd overgeschoven. Steeds werd er voor gezorgd dat deze twee gedeelten zoo nauw mogelijk op elkaar pasten, opdat zij in het abdomen, goed op elkaar zouden blijven.

Geen enkele maal is een zakje, in zulk een étui in het abdomen ingebracht, gebroken, of had het invloed op de ontwikkeling van de cultuur in het zakje. Steeds werd naast een zakje in étui, een zonder étui ingebracht; dit laatste brak meermalen bij het inbrengen of uitnemen of ook wel tijdens het verblijf in het abdomen, doch bleef het ongeschonden, dan vertoonde de inhoud dezelfde eigenschappen als die van het zakje met étui.

Diffusie-proef in vivo.

Hiertoe werden bij een konijn 6 Mei drie zakjes gevuld met keukenzout-oplossing van 1% in de buikholte gebracht. Een dezer zakjes was in étui ingesloten. Het dier had den eersten dag iets temperatuursverhoging, maar at goed, binnen enkele dagen was de wond genezen. Den 3^{en} Juni werden de zakjes uitgenomen. Om zooveel mogelijk de zakjes te sparen, werd de wond groot gemaakt. Het zakje met étui zat met een der beide andere zakjes saam vergroeid in het omentum, het derde lag los tusschen de darmlissen. Beide zakjes zonder étui waren gebroken, de inhoud was voor het grootste gedeelte er uit en aan de binnenzijde van een zakje was een beslag, alsof het fibrine was. Het étui met zakje er in was gemakkelijk los te maken, doch rondom het étui bleef eene dikke laag fibrine, die ook door de mazen van het étui heengedrongen was en het zakje geheel omsloot. Dit alles werd er met pincet en schaar van verwijderd, nergens was de fibrine massa aan het zakje geadhaereerd. Het zakje, dat bij inbren-

gen eene luchtbel bevatte van ongeveer $\frac{1}{2}$ cM³ inhoud, was nu geheel gevuld, de wanden stonden strak gespannen, de inhoud was volmaakt helder. Bij zacht knijpen werd geen druppel vocht door den wand geperst. De geheele inhoud werd opgevangen in een niet-steriel buisje en bij kamertemperatuur neergezet.

De inhoud bleek alkalisch te zijn.

Bij 6 dr. van den inhoud werd 1 dr. NaOH van 15% gedaan, de reactie was goed alkalisch, daarna werd er aan toegevoegd één dr. kopersulfaat opl. sterk verdund. Er vertoonde zich eene duidelijk violette kleur (biureetreactie) en eenig praecipitaat blauw van kleur (ten gevolge van overmaat van het koperzout). Een weinig van de bewaarde oorspronkelijke keukenzoutoplossing, beproefd op dezelfde wijze, gaf eene blauwgroene verkleuring en meer praecipitaat, donkerder van kleur.

Bij het uitnemen der zakjes was wat ascites-vloeistof in het abdomen. Hiervan werd met eene pipet iets verzameld. Op dit serum werd ook de biureetreactie toegepast, de violette kleur was veel donkerder.

Bij eene verdunning van 1 op 20 kreeg men ongeveer dezelfde kleur als bij den inhoud van het zakje.

Daarna werd op een ander deel van den inhoud van het intact gebleven zakje de xanthoproteïne-reactie toegepast.

Een druppel salpeterzuur werd gebracht op 5 drop-pels inhoud zakje, bij schudding was er eenige troe-

beling, bij verwarmen werd het helder en bij toevoeging van 1 dr. ammonia liq. werd de kleur oranjegeel.

Hetzelfde geschiedde met de ascites-vloeistof 1 : 20 verdund, hoewel dit bij verwarmen met salpeterzuur reeds geel werd, werd de kleur nog sterker na toevoeging van 1 dr. ammonia liq.

De oorspronkelijke keukenzoutoplossing vertoonde dit niet. Van den inhoud van het zakje werd nu nog een weinig gebracht, op eene hoeveelheid salpeterzuur in een reageerbuisje; op de scheidingsvlakte trad duidelijk een witte ring op, die bij verwarming niet oploste.

In de vloeistof, waarop reeds biureetreactie was toegepast, werd nu op suiker onderzocht. De vloeistof werd afgeschonken boven de vlam verhit; daarbij trad eene geelroode verkleuring op, die bij toevoeging van ammonia liq. ontkleurd en bij staan aan de lucht in blauw overging. De serum-verdunningen, waarop de biureetreactie was toegepast, gaven dit niet. Wel ter contrôle eene oplossing van 1% glucose, hoewel in sterkere mate.

Den 6^{den} Juni vertoonde de overgebleven vloeistof in het buisje eene lichte troebeling, aan de oppervlakte was een dun wit vliesje.

Bij microscopisch onderzoek bleek dit te bevatten groote dikke staafjes met eigen beweging en conglomeraten van kleine coccen. De hoeveelheid eiwit door

den wand van het zakje gediffundeerd was dus voldoende om tot voedingsbodem voor micro-organismen te dienen.

Dat eiwit door het zakje diffundeerde, was ook gevonden door S. Monckton Copeman ¹⁾ en Nocard en Roux ²⁾.

1) Eene voorloopige mededeeling over het cultiveeren der microben van koepokken en variola door S. Monckton Copeman. British medical Journal 23 Febr. 1901.

2) Le microbe de la peripneumonie. Annales de l'Institut Pasteur Avril 1898.

Diffusie-proeven in vitro.

Deze proeven werden door mij steeds op dezelfde manier opgesteld.

Een collodiumzakje bevestigd aan een reageerbuisje, zooals in het hoofdstuk over de techniek is beschreven, werd door de opening in het reageerbuisje door middel van eene pipet met de te onderzoeken vloeistof gevuld, zoodat het zakje voor twee derden gevuld was. Dit werd dan in eene iets wijdere reageerbuis geplaatst, waarin de vloeistof was, waarin men wilde laten diffundeeren en wel zoo dat het niveau van beide vloeistoffen even hoog stond. Door een ring van kurk nauwsluitend om de buis, waaraan het zakje bevestigd was, te doen en dezen ring te laten rusten op de opening der buitenste buis kan men dit zeer gemakkelijk verkrijgen, daar men het binnenste buisje nu hoger of lager kan plaatsen in den ring.

1. Anorganische stoffen.

Natrium-carbonaat van 5⁰/₀ werd in het zakje gedaan, als omringende vloeistof werd gedestilleerd water

gebruikt en het geheel in de broedstoof bij 37° geplaatst. (Bij alle diffusieproeven werden de buisjes om de lichaams-temperatuur zoo na mogelijk te komen, in de broedstoof bij 37° geplaatst). Na 8 dagen was met phenolphtaleïne geen spoor alkali aan te toonen.

Een proef met NaOH van $\frac{1}{2}\%$ eveneens in gedestilleerd water geplaatst mislukte, daar na eenige dagen het zakje ten deele verteerd bleek te zijn en de beide vloeistoffen met elkaar vermengd waren.

Eene volgende proef werd aldus genomen.

In het zakje eene oplossing van natriumcarbonaat van $\frac{1}{2}\%$, er om heen eene keukenzout oplossing van 1% , de opening tusschen beide buisjes met watten afgesloten en geparaffineerd en ook de buis met zakje met watten gesloten en geparaffineerd. Na 3 weken was in de omringende vloeistof alkali aan te toonen met phenolphtaleïne.

Chloor Natrium. In het zakje werd 3 cM^3 van 1% keukenzout opl. gedaan, er om heen gedestilleerd water. Reeds na één dag was in het water chloor aan te toonen met zilvernitraat. Na 2 dagen bedroeg de inhoud van het zakje $4\frac{1}{2}\text{ cM}^3$. en was dus aanmerkelijk toegenomen.

Eene herhaalde proef met een ander zakje gaf hetzelfde resultaat.

Zoutzuur. In het zakje werd verdund zoutzuur gebracht, er om heen aqua destillata, waarin een reepje

blauw lakmoes-papier; na 1 uur reeds was het papiertje iets verkleurd, na 2 uur duidelijk rood gekleurd.

Eene herhaalde proef met een ander zakje gaf hetzelfde resultaat.

Koolzuur. In het zakje werd spuitwater gebracht, er om heen eene slappe oplossing van natrium-carbonaat, zwak rood gekleurd door phenolphthaleïne in alcohol. De opening tusschen beide buisjes werd weer met watten afgesloten en geparaffineerd en dito de binnenste buis; het geheel weer in de broedstoof bij 37° geplaatst. Na 2 uur was de roode kleur door het gediffundeerde koolzuur verdwenen.

Tegelijk met eene herhaling van de proef op dezelfde manier, welke hetzelfde resultaat gaf, werd een gewoon reageerbuisje in een ander reageerbuisje met de roode vloeistof geplaatst, weer op dezelfde manier met watten alles afgesloten en geparaffineerd en in de broedstoof geplaatst. Na 2 weken was de roode kleur nog niets verminderd. Door deze proef is dus bewezen, dat de werking van koolzuur uit de omringende lucht bij mijne diffusie-proef uitgesloten was.

Zuurstof. Was het niet moeielijk aan te toonen, dat koolzuur door den wand van een collodiumzakje diffundeerde, meerdere bezwaren leverde dit op voor zuurstof.

De eerste proef werd genomen als volgt:

Een paar droppels versch en steriel opgevangen konijnenbloed werden met steriel water verdund, en

in een zakje gebracht. Met het spectroscop waren de oxyhaemoglobine-strepen duidelijk te zien; na toevoeging van een paar droppels zwavelammonium traden de gereduceerde haemoglobine-strepen op. Het buisje werd nu zonder dat er lucht in bleef met eene kurk afgesloten en geparaffineerd. Het zakje daarna in gedistilleerd water geplaatst. Den volgenden dag waren de oxyhaemoglobine-strepen weer te zien, maar de inhoud verspreidde zoo duidelijk de lucht van zwavelammonium, dat ik niet meende op deze proef te moeten vertrouwen.

Er van gebruik makende dat een stukje phosphor bij eene geringe hoeveelheid zuurstof nog licht, werd in eene buis, waaraan een zakje bevestigd was, een stukje phosphor opgehangen, door eene kurk de buis afgesloten, geparaffineerd en in de broedstoof geplaatst. Hetzelfde werd gedaan in een gewoon reageerbuisje. Na een halven dag hield bij beide het lichten op en is niet weer gekomen.

Eene derde proef werd op de volgende wijze opgesteld.

Een collodiumzakje aan een glazen buis bevestigd werd met verdund bloed voor twee derden gevuld. De glazen buis werd afgesloten met dubbel doorboorde kurk, hierdoor staken twee rechthoekig omgebogen glazen buisjes, een ervan reikte tot bijna op den bodem van het zakje en diende voor aanvoerbuisje, het andere kwam even onder de kurk uit en diende voor afvoerbuis.

Alle afsluitingen werden goed geparaffineerd. Op dezelfde wijze werd ook een reageerbuisje met wat verdund bloed gevuld, met een kurk, voorzien van aan- en afvoerbuisje, gesloten, en eveneens geparaffineerd. In beide buisjes waren de oxyhaemoglobine-strepen duidelijk te zien. Beide buisjes werden naast elkaar in een zakje met parallelle wanden, gevuld met water, geplaatst. Hierdoor verkreeg men een duidelijker spectrum van het collodiumzakje bij opstellen van het spectroscop voor het glazen bakje, daar anders door den oneffen wand van het collodiumzakje men een ongelijkmatig verlicht spectrum verkreeg.

Door beide buisjes werd nu gelijktijdig waterstof doorgevoerd, dit kon gemakkelijk geschieden door in de aanvoerbuis van de waterstof een T vormige buis in te lasschen, waardoor de waterstofstroom in tweeën gesplitst en door elk der twee buisjes gevoerd werd.

Na enkele uren doorvoeren van de waterstof waren de strepen al verflauwd, hetgeen langzamerhand toenam. Gedurende zeven uren achtereen werd de waterstof doorgevoerd, de strepen waren nog goed te zien, aan- en afvoerbuis werden door klemmen afgesloten. Den volgende dag werd de waterstof weer zeven uur doorgevoerd, en toen de rechthoekig omgebogen glazen buisjes op eene van te voren uitgetrokken plaats afgesmolten.

In het zakje waren toen de strepen van oxyhaemoglobine zeer flauw te zien, duidelijker waren zij

in het reageerbuisje, hoewel weinig te zien, hetgeen hierdoor verklaard kon worden, dat de vloeistof kolom in het reageerbuisje iets dikker was, dan die in het zakje. Na doorvoeren gedurende veertien uren dus, was de waterstof niet in staat de zuurstof uit het bloed geheel te verdrijven en dat niettegenstaande met de waterstof geen spoor zuurstof werd aangevoerd, daar zij eerst door pyrogallol + KOH geleid werd. Na één dag was nog geen verschil te zien. Eerst na drie dagen was het voor meerdere personen duidelijk, dat de strepen van het zakje aanvankelijk de zwakste, nu de sterkste waren. Ik meen hier dus uit te mogen besluiten dat, gaat er al zuurstof door den wand van het zakje, dit toch zeer weinig is en uiterst langzaam geschiedt.

2. Organische stoffen.

a. Kristalloide.

Pikrinezuur. Eene zeer sterk geel gekleurde oplossing van pikrinezuur in water, werd in een zakje gedaan en dit in keukenzoutoplossing van 1% geplaatst; na 8 dagen was de keukenzoutoplossing duidelijk geel gekleurd.

Aniline-kleurstoffen.

Methyleenblauw- en fuchsine-oplossing in water werden in zakjes geplaatst in keukenzoutoplossing. Na veertien dagen was geen spoor kleurstof door den wand van het zakje gediffundeerd.

Glycose, melksuiker, rietsuiker.

Van elk dezer drie stoffen werd eene oplossing van 1 % sterkte gedaan in een zakje en dit in keukenzoutoplossing geplaatst bij 37°. Reeds na vijf dagen was voor de eerste twee door de Trommer'sche proef suiker in de keukenzout-solutie aan te toonen.

Bij de omringende vloeistof, waarin het zakje met rietsuiker had gestaan, werd eerst wat zoutzuur gevoegd en gekookt, waarna door toepassing der Trommer'sche proef suiker kon worden aangetoond.

Indol.

Een glazen buis met collodiumzakje, gevuld met bouillon, geplaatst in een buis met bouillon, werd gedurende een uur bij 160° gesteriliseerd. Daarna werd in den bouillon van het zakje *bact. coli* geënt en bij 37° geplaatst. De cultuur ontwikkelde zich goed; de bouillon in het zakje werd troebel, de omringende bouillon bleef helder.

Na 14 dagen werd op den omringenden bouillon de indolproef met zwavelzuur en nitriet toegepast, echter zonder resultaat; de bouillon in het zakje vertoonde de indolreactie duidelijk.

b. Colloïde stoffen.

Serumeiwit. Dit spreekt positief uit de proef in Vivo.

Eene oplossing van 1 % pepton „Witte” werd in een zakje gebracht en geplaatst in eene keukenzout-

oplossing bij 37°. Na acht dagen werd op de omringende vloeistof de biureetreactie toegepast en de xanthoproteïne-reactie, echter beide zonder positief resultaat.

Fermenten bij natuurlijke reactie.

Speeksel.

In een zakje werd speeksel gebracht en dit geplaatst in water, door carbonas natricus alkalisch gemaakt, tot het een lakmoespapiertje ongeveer even sterk verkleurde als speeksel.

Na acht dagen werd de omringende vloeistof op ptyaline onderzocht, echter zonder resultaat.

Maagsap, pepsine.

Door de welwillendheid van Prof. Pekelharing kreeg ik wat maagsap, versch. opgevangen van een Pawlow'schen hond. Dit werd in een zakje gedaan en geplaatst in 0,25% zoutzuur, waarbij een vlokje karmijnfibrine gevoegd was, hetwelk bij aanwezigheid van een spoor pepsine reeds moest oplossen en de roode kleur afgeven.

Na acht dagen was er, voor zoover te zien, niets van het vlokje opgelost. Door middel van NaCl werd in de omringende vloeistof het acidalbumine neerslagen en door de biureetreactie op pepton onderzocht. Echter zonder resultaat.

Proteolytisch bacterie-enzym.

Een zakje met bouillon gevuld wordt in een buisje met bouillon geplaatst, en dit geheel gesteriliseerd in de autoclave, daarna wordt in den bouillon van het

zakje bac. pyocyaneus geënt. Er ontwikkelt zich eene cultuur, die den bouillon sterk groen kleurt, de omringende bouillon blijft helder. Na 8 dagen wordt deze op een buisje gelatine gegoten en bij 18° geplaatst. Op de scheidingsvlakte ontwikkelt zich een witte ring, maar van vervloeiing der gelatine geen sprake.

Door bac. pyocyaneus sterk groen gekleurde bouillon werd gefiltreerd door een Chamberland-bougie. Een weinig van dit filtraat op gelatine uitgegoten, doet deze vervloeien. Dit filtraat gesteriliseerd onder hooge spanning en daarna op bouillon uitgegoten geeft ook slechts eenen witten ring op de scheidingsvlakte.

Diastatisch ferment.

In een zakje gesteriliseerd en gevuld met sterielen bouillon wordt bac. megatherium geënt en dit geplaatst in een dun stijfselpapje. Na 8 dagen wordt deze stijfselpap op suiker onderzocht, doch kan er niet in aangetoond worden.

Lebferment.

Bij 10 cM³ gesteriliseerde melk werden drie drop-pels leb gedaan, na een verblijf van 1 uur in de broedstoof bij 37° was de melk reeds gestold.

In een zakje nu werd leb van denzelfden voorraad gebracht en dit geplaatst in gesteriliseerde melk en in de broedstoof bij 37° geplaatst.

Na 8 dagen was de omringende melk nog niet gestold.

Toxine van Diphtherie.

Door de welwillendheid van Prof. Spronck verkreeg ik een fleschje diphtherie-toxine voor bederf gevrijwaard door eene $\frac{1}{2}\%$ tricresoloplossing. Van deze toxine was $\frac{1}{2}$ cM³ subcutaan bij eene cavia van 500 gr. ingespoten, reeds voldoende om het dier na 24 uur te dooden. Daarvan werden in drie zakjes elk 3 cM³ gedaan en geplaatst in eene keukenzoutoplossing van 1% eveneens met $\frac{1}{2}\%$ van dezelfde tricresol. Dit werd gedaan om mogelijk gediffundeerde toxine voor bederf te vrijwaren.

De ruimte tusschen de twee buizen werd weer met watten opgevuld en geparaffineerd en de buis met zakje door een wattenprop gesloten en ook geparaffineerd. Het geheel werd in eenen koker van papier geplaatst om het tegen licht te beschermen. Eene buis werd bij 37° geplaatst, een bij 20° en de derde in eene koele kamer; dit werd gedaan, omdat de hooge temperatuur wellicht voor de toxine schadelijk is.

Na 20 dagen werden de omringende vloeistoffen bij caviae van 400, 425 en 440 gram ingespoten. Bij de eerste cavia, die de vloeistof kreeg, welke bij 37° gestaan had, was de volgende dagen niets bijzonders waar te nemen. Het dier was tierig, at goed en vertoonde den eersten dag eene temperatuursverheffing van slechts $\frac{1}{2}^{\circ}$. Na dien tijd was de temperatuur als te voren.

De 2^e cavia ontving de vloeistof, die bij 22° ge-

staan had. Den eersten dag zat het dier bol in zijn hok, at niet en vertoonde eene temperatuursverheffing van 1.5° . Den volgenden dag was deze slechts nog $\frac{1}{2}^{\circ}$ en na dien tijd was de temperatuur als voor de injectie. Het dier at toen weer en was weer tierig.

De 3^e cavia ontving de dosis vloeistof, die in de koele kamer had gestaan. Ook dit dier zat den eersten dag bol, at niet en had eene temperatuursverheffing van 1.5° . Reeds den volgenden dag was deze weer tot de norm teruggekeerd, het dier at weer goed en was als te voren.

In geen der drie vloeistoffen was dus voldoende toxine gediffundeerd om het dier te dooden, en konden alleen de beide vloeistoffen, die op koeler plaats gestaan hadden, eene voorbijgaande afwijking van de norm opwekken.

Om de kracht der toxine zooveel mogelijk te sparen, wordt deze ook steeds op eene koele plaats bewaard, beschut tegen daglicht.

Geen der drie wondjes, gemaakt voor de subcutane injecties, vertoonde eenige ontsteking, alle drie genazen in zeer korten tijd.

Hieruit blijkt dus, dat in een verloop van 20 dagen nog niet zooveel toxine gediffundeerd was door den wand van het zakje, in staat om dezelfde verschijnselen op te wekken als $\frac{1}{2}$ cM³ van de oorspronkelijke toxine, en spreekt ook duidelijk uit deze proeven, dat

de lichaamstemperatuur niet de meest gewenschte temperatuur voor deze diffusieproeven in vitro is. Een besluit hier uit te trekken, dat de toxine niet door den wand diffundeert, meen ik niet te mogen doen, daar de lichaamstemperatuur van de caviae, die de omringende vloeistoffen der proeven bij 22° en bij kamertemperatuur ontvingen, wel degelijk afwijkingen van de norm vertoonde. Doch in elk geval is een tijdsverloop van 20 dagen te kort om eene hoeveelheid toxine te doen diffundeeren, in staat eene cavia te dooden.

Navolging der proeven van Vincent met

B. Megatherium.

Allereerst werden door mij de proeven van Vincent nagevolgd en wel met den bac. megatherium.

Hiervoor werd genomen de bac. megatherium uit den voorraad van het Hygiënisch Laboratorium. Allereerst werd deze microscopisch en op cultuur-eigenschappen onderzocht.

In den hangenden droppel waren het staafjes met afgeronde uiteinden, ongeveer 3 maal langer dan breed en met duidelijke eigenbeweging. In het gekleurde praeparaat dezelfde vorm en middenstandige sporen van langwerpigen 0 vorm.

B. Megatherium in Cibils-bouillon bij 37°.

Den eersten dag na het enten vertoonde zich aan de oppervlakte van den bouillon een dikke, witte ring langs den wand van het glas. Bij geringe schudding zonk deze op den bodem. De bouillon was helder. De volgende dagen vertoonde zich telkens aan de oppervlakte weer een nieuwe witte ring, die eveneens bij schudden zonk. In den bouillon kwamen ver-

verspreid voor na eenige dagen enkele witte vlokjes, ook vormde zich weder aan den glaswand aan de oppervlakte een witte ring, die aan het glas verkleefd bleef zitten.

In cavia-bouillon (zie hieronder) gekweekt, vertoonde de bac. megatherium dezelfde cultuureigenschappen.

Op glycerine-agar werd eene strijkcultuur aangelegd; na één dag vertoonde zich eene witte glanzende breede streep, verheven op den voedingsbodem liggende, met enkele ronde verheven plekjes aan de zijden. De volgende dagen verspreidde deze streep zich meer en meer over den voedingsbodem en werd geelachtig getint en had een drooger aspect. Het dunste gedeelte der schuin gestolde glycerine-agar werd bruin getint.

Op bouillon-agar zonder glycerine vertoonde de cultuur hetzelfde.

In gelatine werd eene steekcultuur aangelegd en deze bij 18° geplaatst. Den eersten dag was de gelatine aan de bovenzijde iets vloeibaar, den 2^{en} dag was zij reeds halverwege vervloeid en vertoonde zich aan de scheidingsvlakte een witte ring, in het vloeibare gedeelte waren enkele kleine witte vlokjes. Den 3^{en} dag was de gelatine geheel vervloeid, op den bodem waren enkele vlokjes en in de vloeistof hier en daar verspreid ook enkele kleinere vlokjes; het geheel was helder, niet troebel.

Voegt men hier nu bij, dat van pathogeniteit geen sprake was, zooals blijkt uit de proef vermeld op bladz. 57, dan meen ik te mogen besluiten, zoowel uit genoemde morphologische cultuur-eigenschappen, als mede uit het ontbreken van pathogeniteit, dat deze bacil beantwoordt aan de kenmerken in de literatuur aangegeven voor bac. megatherium.

Voor mijne proeven maakte ik gebruik van reeds genoemden cavia-bouillon. Deze werd uit cavia-vleesch bereid, volgens het gewone voorschrift voor het bereiden van voedings-bouillon. Van cavia-bouillon werd daarom gebruik gemaakt, omdat de proeven steeds met caviae genomen werden en ik dus den bacil ook zoo veel mogelijk wilde brengen in een milieu van stoffen bij caviae voorkomend.

Een zakje, zooals in het hoofdstuk over de techniek is beschreven, werd door middel van eene injectiespuit met dezen bouillon gevuld, en met de opening naar onderen in een buisje ten deele met cavia-bouillon gevuld, gedaan en dit met wattenprop gesloten. Gedurende 1 uur op twee achtereenvolgende dagen werd dit in de autoclave onder hooge spanning gesteriliseerd. Meerdere dezer buisjes in de broedstoof bij 37° geplaatst bleven steriel. Steriliseerde men de zakjes drie of viermaal zoo waren zij bij aanraken hard en sprongen bij den minsten druk stuk.

Een aldus gesteriliseerd zakje werd in steriele handen

door omkeeren van het buisje opgevangen en door schudden werd de bouillon er uit gedaan. Vervolgens werd het in een steriel glazen buisje van geringe lengte geplaatst, zoodat ongeveer $\frac{1}{3}$ van het zakje er buiten uitstak. Door middel van eene steriele injectiespuit werd het nu, zoo vol men wilde, gevuld met eene cultuur van den bacil in cavia-bouillon, bij 37° gedurende 2 dagen gekweekt. Daarna werd de opening door middel van eenen droppel collodium gesloten. Na sluiting werd het zakje met de gesloten opening naar omlaag in de hand genomen en er zacht in geknepen om te zien of er ergens vloeistof werd uitgeperst. Gebeurde dit niet, dan werd het of in reeds gemelde étui of zonder, bij eene cavia in de buikholte gebracht. Bij het uitnemen der zakjes werden deze wederom in de steriele buisjes geplaatst. Met een gesteriliseerde schaar werd nu het bovenste gedeelte van het zakje afgeknipt, waarna men gemakkelijk met de platina-lis van den inhoud kon nemen om over te enten. Tijdens het vullen en ook bij deze bewerking werden de zakjes onder eene gesteriliseerde glazen stolp bewaard, welke alleen opgelicht werd, wanneer men bij het zakje moest wezen.

De cavia werd voor het inbrengen der zakjes met den rug op een plankje aan de pooten vastgebonden, het haar werd van den buik geknipt en daarna deze geschoren en met sublimaat afgewasschen. In de huid

werd dan een snede gemaakt in de linea alba van ongeveer vier cM., daarna werd evenwijdig daaraan de spierlaag doorsneden over ongeveer twee cM. lengte. De zakjes werden ingebracht en daarna spieren en huid afzonderlijk door hechtingen vereenigd. Over de huidwond werd wat jodoform-collodium gestreken om infectie tegen te gaan.

Gedurende deze bewerking werd het dier in lichte chloroform-narcose gehouden. Zoo veel mogelijk werd voor asepsis bij het opereeren gezorgd, eene infectie kwam bij al de proeven dan ook slechts een enkele maal voor.

Vooraf werd onderzocht de werking van bac. megatherium subcutaan ingespoten. Daartoe werden bij een cavia, van 445 gr. (temp. 39.5°) 2 cM³ van eene cultuur van bac. megatherium in cavia-bouillon, welke 2 dagen oud was en bij 37° gekweekt was, subcutaan op den rug ingespoten.

Den volgenden dag zat het dier wat in elkaar, at geen haver doch alleen wat groen, het steekwondje was niet ontstoken en blijkbaar bij druk niet pijnlijk. Temperatuur op denzelfden tijd van den dag 39.5° . Daags daarna was het diertje tierig, plaats van injectie niet pijnlijk, temp. 39° . Na 4 dagen was het wondje genezen; het diertje was tierig, at goed en was 15 gram aangekomen; de temp. was 39° . Na dien tijd bleef het dier gezond.

15 Aug. werden bij eene cavia 2 zakjes, een in étui en een zonder, ingebracht, de wond genas per primam, het dier was tierig. 21 Aug. werden deze zakjes er uitgenomen. De bouillon, die bij het inbrengen helder was met slechts enkele vlokjes erin, scheen nu troebel, wanneer men door het zakje zag; aan de binnenzijde echter van het zakje vertoonde zich een zeer dun wit vliesje, waardoor de troebelheid van den bouillon grootendeels schijnbaar was, daar hij bij overschenken in een reageerbuisje lang zoo troebel niet was, hoewel iets meer dan bij het inbrengen. Hiervan werd in cavia-bouillon geënt en bij 37° gezet; de cultuur vertoonde hetzelfde aspect als van den oorspronkelijken bac. megatherium. Na 2 dagen werden van deze cultuur weer nieuwe zakjes gevuld en ingebracht, welke steeds den 7^{en} dag weer werden uitgenomen, de inhoud opnieuw in cavia-bouillon geënt en 2 dagen in de stoof geplaatst om daarna weer voor eene nieuwe passage in zakjes te worden gedaan. Na de 4^e passage werd op pathogeniteit beproefd. Bij eene cavia werden subcutaan 2 cM³ van den inhoud van een zakje ingespoten, het dier vertoonde alleen de volgende dagen wat temperatuursverheffing, doch na 4 dagen was het dier weer normaal. Na de 5^e passage werd van den inhoud van een zakje, waarbij evenveel cavia-bouillon gedaan was, 1½ cM³ subcutaan bij eene witte muis ingespoten. Twee dagen later werd het diertje 's mor-

gens dood in zijne kooi gevonden. Uit het bloed uit het cor genomen, werden op agar culturen van bac. megatherium gekweekt. Bij eene cavia werden 2 cM³ van dezen bouillon subcutaan ingespoten, doch dit gaf alleen eene voorbijgaande temperatuursverheffing. Na de 6^e passage was de pathogeniteit niets sterker, waarom besloten werd tot eene 7^e en 8^e passage. Doch ook na de 8^e passage was het eenige resultaat, wat men verkreeg na *subcutane* injectie van 3 cM³ van den inhoud van het zakje, slechts eene temperatuursverheffing in de eerste dagen, en bleef de cavia ook na *intraperitoneale* injectie eveneens van 3 cM³ van den inhoud van het zakje, in het leven.

Hoewel ik meen de proeven van Vincent zoo nauwkeurig mogelijk te hebben nagevolgd, is het mij niet gelukt van den bac. megatherium eenen pathogenen bacil te kweeken. Wel werden ook door mij verschillen, evenals Vincent ¹⁾ beschrijft, in de cultuureigenschappen waargenomen.

De macroscopische kenmerken van de culturen op agar leverden weinig verschil op. De culturen uit latere passages verkregen, op agar aangelegd, kwamen steeds wat minder rijk op en veranderden een weinig de gele kleur in eene grauwwitte, terwijl het aspect niet zoo droog was, doch wat slijmeriger, en ook bij

1) Annales de l'Institut Pasteur. Dec. 1898 pag. 789.

het overenten zich zoo vertoonde. Van de culturen op agar der eerste passages kon men met de platina-lis een droog stukje afnemen, bij latere passages daarentegen nam men wat slijmerige massa er af.

Ook de culturen in cavia-bouillon leverden eenig verschil op. Was na de eerste passages steeds den volgenden dag een dikke ring aan de oppervlakte gevormd en de overige bouillon helder, reeds na de 3^e passage kwam hierin verandering, de bouillon was dan den volgenden dag licht troebel en slechts een dun vliesje kwam aan de oppervlakte, doch tot zelfs na de 8^e passage vertoonde zich dit vliesje, al was dit dan zeer dun en was de overige bouillon troebeler dan bij voorgaande passages.

Dat dit troebel worden van den bouillon moet toegeschreven worden, zooals Vincent zegt, aan het gewinnen van den bacil, door het kweeken in zakjes, om zonder zuurstof te leven, meen ik te moeten tegenspreken, daar de bac. megatherium zoowel met, als zonder zuurstof in staat is voort te leven. Dit werd meen ik, door mij als volgt bewezen. Zoowel van de oorspronkelijke cultuur als van die, verkregen na de 8^e passage, werd geënt op schuingestolde agar en door elk buisje gedurende 10 min. waterstof doorgevoerd, daarna luchtdicht afgesloten en in de broedstoof geplaatst. In beide buisjes had zich den volgenden dag eene flinke cultuur ontwikkeld en was spoorvorming.

Ook onder het microscoop gezien leverden de culturen op agar verschil op. Van elk der culturen op agar verkregen uit elk zakje van iedere passage, werd ten slotte nogmaals eene nieuwe cultuur op agar aangelegd en gedurende 24 uur bij 37° geplaatst. Hier van nu werden praeparaten gemaakt en alle op dezelfde wijze met methyleenblauw gekleurd. Waren in de praeparaten van de eerste passages de sporen in de meerderheid, uit praeparaten van latere passages bleek dat de spoorvorming vertraagd was, de sporen waren daarin in de minderheid. Gelijktijdig zag men ook dat zoowel de bacillen als de sporen kleiner werden, doch de sporen in sterker mate, waardoor hetgeen van den bacil overbleef naar verhouding grooter was en een ander microscopisch aspect vertoonde. Lagen in de eerste praeparaten de bacillen en die reeds sporen gevormd hadden in lange ketens aaneengesloten, ook dit zag men in latere praeparaten verminderen en in de laatste kwam een keten slechts bij uitzondering voor en lagen de bacillen meer dooreen.

Tot grootere volledigheid volgt hier eene meer gedetailleerde beschrijving der proeven.

15 Aug. werden 2 zakjes ingebracht, voor twee derden gevuld met cultuur in cavia-bouillon van 2 dagen oud, die gestaan had in de broedstoof bij 37°. Een was gesloten in een étui, de ander zonder. Het dier eet goed, is tierig en de wond is na 5 dagen genezen. 21 Aug. werden de zakjes uitgenomen.

Zakje met étui.

Dit was iets in het omentum door eene fibrine-massa ingesloten, doch liet gemakkelijk los. De inhoud was iets troebel, enkele witte vlokjes dreven in de vloeistof. Ook was de inhoud iets vermeerderd, hetgeen aan de luchtbel te zien was, die bij het uitnemen kleiner was dan bij het inbrengen. In hoofdzaak scheen de inhoud troebel, doordat aan de binnenzijde een uiterst dun wit vliesje was afgezet, dat met een platina-lis gemakkelijk was te verwijderen, doch ook de bouillon was iets troebeler dan oorspronkelijk. Onder het microscoop zag men onbeweeglijke bacillen. Op agar werd dun en dik geënt, d. w. z. een platina-oogje vol werd uit dezen bouillon genomen en over schuin gestolde agar uitgestreken, dit was de dikke cultuur, zonder nu weer het platina-oogje in te dompelen in den bouillon, werd het nogmaals over een ander agarbuisje gestreken, dit was de dunne cultuur. Beide culturen kwamen goed op, waren geelachtig getint en lagen verheven op de oppervlakte, enkele geïsoleerde kolonies op de dunne cultuur waren stervormig, in het midden iets ingezonken en geelachtig getint. 22 Aug. was er spoorvorming, de bacillen lagen in lange ketens, doch waren iets kleiner dan de oorspronkelijke.

In cavia-bouillon geënt, was den volgenden dag aan de oppervlakte langs den wand van het glas een ring als van aaneengeschakelde kolonies op agar. Bij schudden zonk deze ring, de bouillon was helder.

Zakje zonder étui.

Dit lag bij het openen van het dier los tusschen de ingewanden, doch was op eene plaats gescheurd, er waren slechts enkele droppels vloeistof in. Bij het overenten op agar kwamen enkele coccen-kolonies op.

2^e passage. 23 Aug. werden opnieuw twee zakjes gevuld met cultuur, verkregen van die uit zakje in étui, welke 2 dagen bij 37° gestaan had. Een werd weer in étui ingesloten, de ander zonder étui ingebracht.

30 Aug. werden de zakjes uitgenomen.

Weer was het zakje in étui opgesloten in eene fibrine-massa, waarvan enkele strengen door de gaatjes van het étui waren gedrongen, het werd echter gemakkelijk losgemaakt.

De inhoud, naar schatting aan de luchtbel, toe- noch afgenomen, was troebeler dan bij de eerste passage, hoewel ook weer een vliesje aan de binnenzijde was; ook dreven enkele witte vlokjes in de vloeistof. Evenals bij alle volgende passages ook geen spoorvorming en geen eigenbeweging.

Op agar werd dik en dun geënt.

De cultuur kwam goed op, geelachtig wit vochtig aanzien, met enkele donkere stippen, in het midden van geïsoleerde kolonies, waarom heen een iets verheven lichter gekleurde ring.

Cavia-bouillon. Na één dag een dun geel vliesje, dat bij lichte schudding zonk. De bacil was ongeveer even groot als de oorspronkelijke.

Zakje zonder étui. Dit lag vrij tusschen de darmen in, de inhoud was dezelfde als bij het inbrengen. Eveneens troebeler geworden, doch ook weer een vliesje aan de binnenzijde.

Dun en dik werd geënt. Het aspect der cultuur was dezelfde als die uit het zakje met étui.

De cultuur in cavia-bouillon kwam niet op.

3^e passage. 2 Sept. weer 2 zakjes ingebracht, gevuld met de cultuur in cavia-bouillon, verkregen door overenten uit de cultuur uit zakje in étui van de tweede passage.

4 Sept. stierf de cavia door onbekende oorzaak. Terstond na den dood werden de zakjes eruit genomen. Deze waren volmaakt intact en waren er slechts vlokjes in als bij het inbrengen. De zakjes werden terstond in een andere cavia gebracht.

9 Sept. werden zij hieruit genomen, bij het openknippen van het zakje uit étui was het alsof er eenige spanning in was, eenige druppels bouillon spatten er uit. De inhoud was niet troebel.

Bij enting dik en dun kwam bij geen der twee eene cultuur op, eveneens niet in cavia-bouillon.

Zakje zonder étui. De inhoud scheen niet zoo troebel als na de 1^e of 2^e passage. Op het buisje dat dun geënt was, kwamen na enkele dagen enkele kolonies van bac. megatherium op, niet zoo geelachtig getint als bij vorige passages.

In cavia-bouillon kwam niets op.

Van de kolonies werden enkele platen gegoten en hiervan weer eene cultuur in cavia-bouillon aangelegd.

4^e *passage*. Weer 2 zakjes ingebracht met de cultuur uit cavia-bouillon, den 16 Sept.

23 Sept. werden de zakjes uitgenomen.

Zakje met étui was troebel aan den wand hier en daar een vliesje.

Op agar geënt kwam de cultuur na 2 dagen bij dikke en dunne enting beide zeer goed op, aspect als bij vorige culturen.

In cavia-bouillon geënt, was deze iets opaak na één dag en ver- toonde aan de oppervlakte een dun grauwwit getint vliesje.

Van den inhoud van dit zakje met dezelfde hoeveelheid cavia-bouillon vermengd werden den 23 Sept. 2 c.M³. subcutaan bij eene cavia ingespoten. De temperatuur, die 36.5° was, liep de volgende dagen op tot 37.5°, 38° en den derden dag tot 38.5°. Het dier zat stil in zijn hok en at weinig. Den vierden dag was de temperatuur weer gedaald, het diertje was tierig, de volgende dagen was het diertje als gezond. 13 Oct. zat het beestje bol in zijn hok en at niet, 14 Oct. was de temp. 's morgens 30.5°, 's middags stierf het dier. In een praeparaat uit het bloed van het cor gemaakt, kwamen slechts enkele bacillen voor. De milt was niet vergroot, in een praeparaat, daarvan gemaakt, waren geen bacillen te vinden. Longen haemorrhagisch, wat haemorrhagisch-pleuritisch exsudaat.

Cultuur werd aangelegd van het bloed op agar, na 2 dagen kwamen enkele kolonies van bac. megatherium op, nogmaals op agar over- geënt kwamen zij niet meer op.

Zakje zonder étui.

Was ineengevouwen bij het uitnemen en bijna leeg. Hiervan werden dus geen culturen aangelegd.

5^e *passage*. 28 Sept. 2 zakjes ingebracht van de cultuur uit zakje met étui in cavia-bouillon. 4 Oct. werden de zakjes uitgenomen, het zakje zonder étui zat in eene fibrine-massa opgesloten en brak bij het uitnemen hieruit.

Zakje met étui, was troebel, veel bezinksel op den bodem. De culturen hiervan geënt, kwamen goed op, eveneens als bij de vorige passages zich vertoonend.

In cavia-bouillon geënt was ditmaal de bouillon licht troebel en vormde zich aan de oppervlakte slechts een dun wit vliesje.

Van den inhoud van het zakje, vermengd met dezelfde hoeveelheid cavia-bouillon, werd bij eene witte muis $1\frac{1}{2}$ cM³ subcutaan ingespoten. Het diertje was den volgenden dag nog tierig, den 2^{en} dag werd het 's morgens dood gevonden. In het bloed uit het cor genomen kwamen bacillen voor, die op agar uitgezaaid, goed opkwamen. De longen waren haemorrhagisch, de lever vertoonde enkele witte plekken, milt sterk vergroot en vele gele vlekken kwamen er in voor, die bij betasten niet hard waren. Cultuur van milt aangelegd, kwam niet op.

Bij eene cavia werden van hetzelfde mengsel als bij de muis 2 cM³ subcutaan ingespoten. Temp. was 38°, deze liep de volgende dagen een graad op, doch na 4 dagen was het steekwondje genezen en het dier normaal.

6^e passage. 8 Oct. werden twee zakjes ingebracht, gevuld met cultuur uit het zakje met étui van de 5^e passage. 15 Oct. werden deze zakjes er uit genomen. Zoowel zakje met als zonder étui waren troebel en leverden beide op agar culturen op, gelijkend op die der vorige. In cavia-bouillon was na 2 dagen een dun grauwwit vliesje en de bouillon wat opaak als zeer verdunde melk er uitziend.

Van den inhoud van de zakjes plus evenveel cavia-bouillon wordt ingespoten:

- I. Bij eene muis subcutaan 1 cM³; het beestje is den volgenden dag tierig, eet goed. Den daarop volgenden morgen was het uit het hokje ontsnapt.
- II. Bij eene muis werd 1 cM³ in het abdomen ingespoten, den volgenden dag was het diertje tierig en at goed; den volgenden dag was ook dit dier ontsnapt, doch werd in het lokaal teruggevonden. Het diertje bleef gezond.
- III. Bij eene cavia van 325 gr. werd 1 cM³ in de abdominaalholte

ingespoten. De eerste dagen was het diertje niet tierig en zat vooral den eersten dag bol in zijn hok. De temperatuur die bij het inbrengen 37° was, was toen 38.5° , doch daalde na 2 dagen weer tot de norm. Na 4 dagen was het dier weer als te voren.

IV. Bij eene cavia van 425 gr. werd $1\frac{1}{2}$ cM³ subcutaan ingespoten. De temperatuur was toen 38° . Den volgenden dag was deze 39.1° , het diertje was ziek en at niet. Na 2 dagen was de temp. 38.7° , het diertje at wat. Na 3 dagen was de temp. 38° en het diertje als gezond.

7^e passage. 22 Oct. werden twee zakjes ingebracht van de cultuur in cavia-bouillon afkomstig van het zakje in étui der 6^e passage.

29 Oct. werden deze er uitgenomen. De inhoud van beide zakjes was troebel; er lagen op den bodem na eenig staan vele witte vlokjes.

Culturen op agar aangelegd kwamen goed op en vertoonden hetzelfde aspect als bij voorgaande passages. De cavia-bouillon was opaak, met aan de oppervlakte een zeer dun vliesje van grauwwitte kleur.

Uit het zakje, dat in étui was ingesloten geweest, werd onverdund $1\frac{1}{2}$ cM³ bij eene cavia, wegende 380 gr., subcutaan ingespoten. Ook hierbij hetzelfde als bij de vorige caviae. De eerste dagen wat temperatuursverheffing en het diertje wat ziek, maar den vierden dag weer als normaal.

8^e passage. 31 Oct. werden twee zakjes ingebracht, met cultuur in cavia-bouillon uit zakje in étui van de 7^e passage.

7 Nov. werden deze er uit genomen.

De inhoud van beide zakjes vertoonde hetzelfde aspect als bij de 7^e passage, troebel en met vele vlokjes op den bodem na eenigen tijd staan.

In cavia-bouillon geënt werd deze weer licht troebel, doch nog steeds, al was het dan ook zeer dun, vormde zich een vliesje aan de oppervlakte.

De culturen op agar aangelegd kwamen goed op en vertoonden niets afwijkends van de vorige culturen.

Uit de zakjes werden 2 cM³ genomen en subcutaan bij eene cavia ingespoten van 445 gr. Den volgenden dag was de temperatuur

1 graad hooger, den daarop volgenden dag nog slechts een halve graad en na vier dagen was de temperatuur weer normaal.

Op muizen kon niet geëxperimenteerd worden, daar deze destijds niet verkrijgbaar waren.

Van het verkrijgen van virulentie, van eenige be- tekenis van bac. megatherium door deze proeven, kan na hetgeen hierboven is meegedeeld, moeilijk sprake zijn. Wel was de bacil na de passages in staat bij injectie, de temperatuur iets hooger te doen stijgen, dan de oorspronkelijke, en eene lichte algemeene stoornis op te wekken; maar pathogeen in die mate, dat hij, zooals Vincent zegt, den dood van eene witte muis of cavia kon veroorzaken, was hij niet geworden, niet- tegenstaande ik nog de passages heb voortgezet tot de achtste toe. Bij een zoo verschillend resultaat na deze proeven en die van Vincent zou eene vergelijking van beide zeer gewenscht zijn. Hiervan moet echter afge- zien worden, daar Vincent in zijne beschrijving zich alleen bepaalt tot het meedeelen van zijne resultaten en dit dan nog in korte trekken. Niettegenstaande dit, meen ik toch op enkele punten in zijne beschrijving te mogen wijzen.

Zoo het begin, waar hij meedeelt dat hij voor zijne proeven den bac. megatherium gebruikte, dien hij uit tuinaarde gekweekt had. Hier wordt er nergens op ge- wezen, dat hem uit de kenmerken der culturen, zooals die in de literatuur voor bac. megatherium worden

aangegeven, gebleken is, dat hij werkelijk met bac. megatherium te doen had. Wel vermeldt hij, dat zijn bacil niet pathogeen is, doch zooals hij zelf in hetzelfde artikel zegt, ¹⁾ doet een bacil zich bij opvolgende culturen in zakjes dan als pathogeen, dan als niet-pathogeen voor en kan hij dus van een pathogenen bacil uitgegaan zijn, die toen juist zijne virulentie verloren had.

Hoe hij zijne zakjes sloot, wordt niet vermeld. Of dit wel zóó geschiedde, dat geen andere stoffen daardoor binnengedrongen, tegelijk met den inhoud van het zakje bij een dier ingespoten; wellicht den dood veroorzaakten. Ook niet of wel steeds vóór het injiceeren werd onderzocht of men nog steeds met een reincultuur te doen had. Door het verblijf van een zakje in het abdomen, wordt toch licht de darmwand gelaedeerd en treedt eene ontsteking op waardoor dan, bij niet volkomen sluiten van een zakje, stoffen of microben binnendringen, die den dood veroorzaken in plaats van den bacil waarmee men experimenteert.

Het doen van enkele proeven met deze zakjes is toch voldoende om te doen zien, hoe gemakkelijk men eene bij-infectie verkrijgt, indien niet de grootste voorzorgen worden in acht genomen. Van het meeste gewicht acht ik het daarom, de zakjes in een étui,

1). Noot 2, bladz. 793, Annales de l'Institut Pasteur. Dec. 1898.

zooals in het hoofdstuk over de techniek werd beschreven, in te sluiten; want zelfs al is het zakje bij het inbrengen volkomen gesloten, door de bewegingen van het dier in zijn hok, de darmperistaltiek enz., kan de wand van het zakje worden ingedrukt en ontstaan er plaatsen van minder weerstand, waardoor naar binnen kan dringen, wat door den intacten collodiumwand niet zou kunnen diffundeeren.

Ook dat na de 4^e passage de bacil den bouillon geheel troebel deed worden en geen vliesje aan de oppervlakte meer vormde, doet het vermoeden rijzen, of wellicht toen eene toevallige verontreiniging de overhand had gekregen, daar zooals ik hierboven onder de kenmerken der cultuur heb beschreven, de verklaring, die Vincent aan dit verschijnsel geeft, niet juist is.

Contrôle-proeven worden ook niet vermeld; één mijner caviae stierf toch ook 3 weken na de injectie van den inhoud van een zakje van de 4^e passage, wat men wel niet aan de pathogeniteit van den bacil kan toeschrijven, en toch werden enkele gedegenereerde bacillen in het bloed gevonden.

Deze enkele punten, hoewel slechts verondersteld, dat zij niet onderzocht zijn, meen ik toch, dat in het tegenstelde geval wel degelijk in bevestigenden zin vermeld hadden behooren te worden, om de conclusie te wettigen, dat Vincent van den bac. megatherium eenen virulenten bacil had gekweekt.

Proeven met *Bac. fluorescens*.

Eene zelfde reeks van proeven als met *bac. megatherium* werd ook begonnen met *bac. fluorescens*.

Dat juist deze daarvoor werd uitgekozen, was hieraan toe te schrijven, dat tegelijk er aan gedacht werd of ook bij deze proeven eenige verwantschap zou blijken te bestaan met *bac. pyocyaneus* of dat de *bac. fluorescens* zich na de passages als *bac. pyocyaneus* zou voordoen.

Aan Ruzicka ¹⁾ was het gelukt aan te toonen dat de verschillen, die er bestaan in de cultuurkenmerken van *bac. fluorescens* en *bac. pyocyaneus* voor een groot deel afhankelijk zijn van de levenscondities, waarin de bacillen verkeerden. Na herhaalde vergeefsche pogingen slaagde hij er in den *bac. fluorescens* te kweeken bij 37°. Van beide bacillen nam hij drie reine culturen, elk van verschillenden oorsprong, voor zijne proeven en zag na de wederkeerige verandering der levenscondities, dat van elk dezer drie reine cultu-

1) Archiv für Hygiene, 34 en 37 Band. Vergleichende Studien über den *Bacillus pyocyaneus* und den *Bacillus fluorescens liquefaciens* van Dr. Stanislas Ruzicka.

ren er dan één was, die dezelfde morphologische eigenschappen vertoonde, als van den bacil in welker levensconditie hij gebracht was.

Ik ging uit van den bac. fluorescens liquefaciens, bij proeven over malaria toevallig uit de maag van de mug (*anopheles claviger*) verkregen en aanwezig in den voorraad van het Hygiënisch Laboratorium.

Allereerst werden weder de cultuur-eigenschappen en de pathogeniteit onderzocht.

Op agar overgeënt, werd een buisje bij 37° en een bij 22° geplaatst.

Bij 37° kwam niets op.

Bij 22° kwam in 24 uren de streep breed op, was groen glanzend en als eene slijmerige massa, den volgenden dag was de bovenzijde der agar groen fluoresceerend en den derden dag de geheele agar.

Op glycerine-agar geënt, hetzelfde resultaat bij 22°, bij 37° kwam niets op.

In cavia-bouillon bij 22°, was deze den volgenden dag troebel, aan de oppervlakte had zich een dun wit vliesje gevormd, dat bij schudden niet zonk, het kleefde aan den glaswand, den volgenden dag was de bouillon fluoresceerend, de troebelheid nam de volgende dagen nog toe. Bij 37° kwam niets op.

Eene steekcultuur in gelatine bij 18° geplaatst, vertoonde langzame vervloeiing, enkele witte vlokjes waren er in en fluoresceerden.

Om den bacil eerst te gewinnen bij 37° te groeien werd op agar en in bouillon eene cultuur aangelegd en geplaatst in een broedstoofje, geregeld op 25°. De culturen kwamen op als bij 22°.

Elken dag werd nu op nieuw overgeënt en de broedstoof 2° hooger geregeld. Op deze wijze gelukte het, den bac. fluorescens te kweeken, tot bij 30 à 31°, bij hoogere temperatuur kwam niets op.

Meenende, dat, wat in vitro niet gelukte, misschien in vivo wel kon geschieden, besloot ik van deze cultuur uit te gaan en de passages in collodiumzakjes bij caviae te beginnen.

Eene cultuur in cavia-bouillon, welke twee dagen bij 30° gestaan had, werd bij eene cavia subcutaan ingespoten en wel 2 cM³; de steekwond genas na enkele dagen en was gedurende dien tijd niet pijnlijk bij druk. Alleen één dag na de injectie vertoonde het dier een halven graad temperatuursverheffing, doch bleef tierig en at goed. Na dien tijd bleef het dier goed gezond. Deze bacillus beantwoordde dus aan de kenmerken der cultuureigenschappen en dat der ontbrekende pathogeniteit, in de literatuur aangegeven voor bac. fluorescens.

De proeven met de collodiumzakjes werden als volgt genomen.

12 Sept. werden voor het eerst 3 zakjes ingebracht, waarvan een in étui. Door onbekende oorzaak stierf het dier na vier dagen. De zakjes werden er uitgenomen

en waren alle intact. De inhoud der zakjes bij het inbrengen fluoresceerend, was nu witachtig troebel en fluoresceerde niet meer. Van den inhoud van elk der zakjes werden culturen op agar en in cavia-bouillon aangelegd en bij 37° en 22° geplaatst. Bij 37° kwam niets op, bij 22° kwamen na 2 dagen van het zakje in étui enkele kolonies op agar op en ééne kolonie van een zakje zonder étui. De bouillon bij 22° begon eerst na 3 dagen te fluoresceeren, hoewel den 2^{en} dag reeds een wit vliesje aan de oppervlakte was.

Onder het microscoop bezien, vertoonde deze bouillon hetzelfde beeld als die, waarmee de zakjes gevuld waren: korte staafjes lagen zonder regelmaat dooreen. Met dezen bouillon werden nieuwe zakjes gevuld en in de buikholte gebracht. Na acht dagen werden zij er weer uit genomen. De bouillon fluoresceerde niet meer, doch was minder troebel dan na de 1^e passage. Op agar geënt kwam eerst na twee dagen bij 22° een weinig fluoresceerend, dun streepje op. Eene cultuur in bouillon aangelegd bij 22° kwam niet op. Van de cultuur op agar werd in cavia-bouillon geënt en bij 22° en 37° geplaatst. Bij 22° ontwikkelde zich eene cultuur, die fluoresceerde.

Met dezen bouillon werden de zakjes voor de 3^e passage gevuld. Na een verblijf van acht dagen in het abdomen, werden zij er uit genomen en van den inhoud, die niet fluoresceerde, culturen aangelegd op

agar en in bouillon bij 37° en 22°. Op agar bij 22° kwam slechts weinig op, zwak fluoresceerend, ook in bouillon bij 22° kwam slechts eene zwak fluoresceerende cultuur op.

Met dezen bouillon werd eene vierde passage ondernomen, doch na afloop kwam van de aangelegde culturen van den inhoud dezer zakjes niets op; één zakje gaf eene cultuur, doch dit was eene verontreiniging. Een voor de 2^e en 3^e maal herhaalde passage, gaf telkens negatief resultaat. Hoewel de 3^e maal de zakjes slechts 4 dagen in het abdomen werden gelaten, bleek de bacil afgestorven en niet meer in staat bij uitzaaiing eene cultuur te geven, hetzij bij 22° of 37°. De proeven werden daarom gestaakt. Van de 3^e passage werd nog eene cultuur in cavia-bouillon bij 22° gekweekt en werden bij eene cavia subcutaan hiervan 2 cM³ ingespoten. Eene voorbijgaande temperatuursverheffing in de eerste dagen was het eenige resultaat.

Uitvoerige beschrijving der proeven met
b. fluorescens in zakjes.

12 Sept. werden 3 zakjes ingebracht, gevuld met bouilloncultuur van bac. fluorescens, welke twee dagen bij 30° gestaan had. Een dezer zakjes was in étui. 16 Sept was een der hechtingen van den buikwand gesprongen en hing een darmlis uit den buik. De zakjes werden er uitgenomen. Van geen der drie zakjes was de inhoud fluoresceerend zooals bij het inbrengen, wel was de inhoud troebeler dan bij het inbrengen. Vermeerderd was de inhoud niet. Van alle drie werden culturen aangelegd op agar en in cavia-bouillon en wel

een dubbel stel. Een stel werd geplaatst bij 37°, het andere bij 22°.

Bij 37° kwam in geen enkel buisje eene cultuur op.

Bij 22° kwamen van het zakje uit étui en een zonder na 2 dagen enkele kolonies op agar op. In den bouillon kwam na 2 dagen een vliesje aan de oppervlakte en begon na drie dagen fluorescentie op te treden. Hoewel de culturen een dag later opkwamen dan de oorspronkelijke, vertoonden zij geen ander verschil dan mindere fluorescentie. Onder het microscoop den inhoud van het zakje onderzoekende zag men slechts onbeweeglijke bacillen. Een gekleurd praeparaat van de aangelegde cultuur op agar vertoonde bacillen onregelmatig verspreid en iets kleiner dan de oorspronkelijke.

2^e *passage*. 20 Sept. werden 2 zakjes ingebracht, met goed fluoresceerenden bouillon gevuld, afkomstig van overenting uit het zakje in étui van de 1^e passage en gedurende 2 dagen bij 22° gekweekt.

27 Sept. werden beide zakjes uitgenomen, de inhoud fluoresceerde niet, was troebel doch niet zoo sterk als bij de eerste passage. Van beide werden weer culturen aangelegd en geplaatst bij 22° en 37°. Slechts op één buisje agar bij 22° groeide de bacil, afkomstig uit zakje zonder étui, de fluorescentie was zeer matig, overgeënt op agar en in cavia-bouillon gaf dit eene flinke goed fluoresceerende cultuur.

Van dezen bouillon werden de zakjes gevuld voor de 3^e *passage* en 4 Oct. ingebracht.

11 Oct. werden deze zakjes uitgenomen. Het zakje in étui was wat troebel als bij de 2^e passage, doch fluoresceerde niet, het zakje zonder étui was gebroken.

Op agar en in bouillon gekweekt bij 22° en 37° kwam alleen bij 22° op agar eene cultuur op, na 2 dagen zeer zwak fluoresceerend. Ook in cavia-bouillon bij 22° kwam de cultuur op, echter zeer zwak fluoresceerend, doch met gewoon steriel buisje cavia-bouillon ter vergelijking er naast was de fluorescentie wel te zien.

15 Oct. werden met dezen bouillon weer nieuwe zakjes gevuld en ingebracht. 22 Oct. werden deze zakjes uitgenomen en op dezelfde wijze uitgezaaid bij 22° en 37°. Van een der zakjes kwam bij 22°

en 37° eene cultuur na 2 dagen op, doch dit was geen bac. fluorescens, het waren bacillen met eindstandige sporen, terwijl onze fluorescens geen sporen vormt. De proef werd daarom met den bacil, afkomstig van de 3^e passage en opnieuw gedurende 2 dagen in cavia-bouillon bij 22° gekweekt, herhaald en 30 Oct. ingebracht.

5 Nov., dus eenige dagen eerder dan gewoonlijk, werden de zakjes uitgenomen, weer kwam bij 22° en 37° eene cultuur van bacillen met eindstandige sporen op.

Van de cultuur afkomstig van de 3^e passage werden nu platen gegoten, doch dit leverde alleen bac. fluorescens op. Met deze reine cultuur in cavia-bouillon, gekweekt gedurende 2 dagen bij 22°, werden nu ten derde male de zakjes gevuld, ook werd hierbij ter contrôle een zakje met sterielen bouillon ingebracht. Vier dagen later werden deze er uitgenomen. De zakjes met cultuur er in waren troebel. Het zakje met sterielen bouillon helder; hiervan werden culturen aangelegd, doch dit leverde niets op; geen cultuur kwam op.

Ook uit het zakje, waarin de geënte bouillon was gebracht, konden geen culturen gekweekt worden bij 22° of 37°.

De bac. fluorescens schijnt in een collodiumzakje in de buikholte gebracht dus geen geschikte levenscondities te vinden. Reeds na de 1^e passage is de groei bij overenten vertraagd en zeer matig, hetgeen bij verdere passages nog meer toeneemt, tot na de 4^e passage de bacil niet meer in staat is eene cultuur te geven.

Duidelijk pathogeen was ook deze bac. fluorescens na de 3^e passage nog niet geworden. 2 cM³ van eene cultuur in cavia-bouillon, ingespoten subcutaan bij eene cavia, gaf slechts de eerste dagen wat temperatuursverheffing.

Ook na deze proeven dus, kan men van eene ver-

kregen virulentie van bac. fluorescens niet spreken. De bacillen in het zakje ingesloten sterven een langzamen dood, zoodat bij overenten slechts enkele tot eene cultuur uitgroeien, die wat morphologische kenmerken betreft, niet veel van de normale afwijkt, alleen is de bacil na enkele passages iets kleiner, terwijl hij kleurstoffen goed opneemt. Overigens is de groei vertraagd en de fluorescentie verminderd.



Proeven in cavia-bouillon met konijnenbloed.

Tegelijk met de boven beschreven proeven werden ook proeven genomen om te trachten langs anderen weg den bac. megatherium en bac. fluorescens tot pathogene microben te maken. De methode, die ik hiertoe volgde, was de volgende en had ten doel de bacillen in een voedingsbodem te doen leven, waaraan bij elke overenting eene klimmende hoeveelheid bloed werd toegevoegd, om de bacillen te gewennen aan de alexinen van het bloed.

Het bloed werd steriel opgevangen uit het oor van een konijn, in een buisje met gesteriliseerden cavia-bouillon. Het konijn werd daarvoor op een plank op den rug vastgebonden, het oor werd geschoren, daarna met een watje met sterke oplossing van natrium-hydroxyde ter dege afgewasschen en vervolgens er wat absolute alcóhol overgegoten; deze werd dan aangestoken, en zoodra hij ontvlamde werd de vlam uitgeblazen, nogmaals aangestoken en weer uitgeblazen. Het oor werd nu over de lengte dubbel gevouwen, en in de naar beneden gerichte plooi met steriele naald in een bloedvat

een gaatje geprikt. Droppelsgewijs liep nu het bloed uit deze wond en werd in den cavia-bouillon opgevangen. Deze kleurde zich al naar de hoeveelheid bloed van licht tot donkerrood. Dadelijk werd bij wijze van contrôle van den inhoud van het buisje eene cultuur op agar aangelegd en werden beide buisjes bij 37° geplaatst. Bleek nu den volgenden dag op de agar geene cultuur te zijn opgekomen, dan werd de voedingsbodem als steriel beschouwd en de bacil er in geënt. De bouillon was dan helder gebleven en geel, niet rood getint, op den bodem was een rood bezinksel. Was er, zooals voor de laatste proeven, eene groote hoeveelheid bloed bijgevoegd, dan hing aan de oppervlakte van den bouillon een bloed-thrombus, die bij gering schudden zonk. Op éene uitzondering na, gelukte het mij steeds op deze wijze het bloed steriel op te vangen; deze eene keer kwam op de agar eene cultuur op en was tevens de bouillon geheel troebel.

De bac. megatherium en bac. fluorescens nu, werden elk in een buisje, waaraan voor de eerste maal 2 droppels bloed waren toegevoegd, geënt en de eerste bij 37°, de tweede bij 22° in de broedstoof geplaatst, Na vier dagen werden culturen op agar aangelegd, bij 37° en 22° geplaatst en na twee dagen op inmiddels gereed gemaakte buisjes met grootere hoeveelheid bloed overgeënt. Dit werd elke vier dagen herhaald, bij steeds klimmende hoeveelheid bloed, tot zelfs bij de laatste

proeven de hoeveelheid bloed grooter was dan de hoeveelheid bouillon.

In het buisje met *bac. megatherium* zag men den volgenden dag reeds een dikken gelen ring aan de oppervlakte, de bouillon was ook licht rood gekleurd, wat de volgende dagen nog toenam (uittreding van bloedkleurstof uit het bezinksel op den bodem). Bij de buisjes met grootere hoeveelheid bloed werd deze kleur na enkele dagen van donkerrood tot bijna zwart toe. De culturen op agar vertoonden ook eenige afwijking in groei; was de eerste cultuur geelachtig getint, van wat vochtig aspect, en bij uitnemen met de platinalis min of meer droog, latere culturen werden wit getint, van vochtiger aspect en waren bij uitnemen van slijmerige consistentie. Ook het microscopisch beeld leverde eenige verandering op, in het slot van dit hoofdstuk vermeld.

De bouillon met bloed, waarin *bac. fluorescens* gekweekt was, vertoonde den volgenden dag aan de oppervlakte een wit vliesje, de bouillon fluoresceerde zwak en was niet rood gekleurd. Eerst na 2 dagen zag men van uit den rooden bloedkoek op den bodem den bouillon zich rood kleuren. Boven dezen bloedkoek zag men dan eerst eene lichte verkleuring, een bewijs dat de bloedkleurstof begon uit te treden; eerst na vier dagen was de bouillon rood gekleurd, meer of minder sterk, al naar mate de hoeveelheid bloed, die daarin was.

De culturen, die tusschen twee opeenvolgende culturen in bouillon + bloed op agar aangelegd werden, leverden alleen verschil in fluorescentie-vermogen op, dit werd zwakker.

Na $1\frac{1}{2}$ maand op deze wijze te zijn doorgegaan, werden van de beide laatste culturen bij een konijn van elk ongeveer $2\frac{1}{2}$ c.M³ subcutaan op den rug ingespoten.

Het konijn, waarbij de cultuur van bac. megatherium was ingespoten, was den volgenden dag ziek, de temperatuur, bij de inspuiting 38° , was nu 41.5° , het dier at niet en lag in zijn hok, den volgenden dag was de temperatuur 40° , het dier at nog niet en zat in elkaar gedoken. Den derden dag begon het dier te eten, de temperatuur was 39° , en den vierden dag was de temperatuur 38.5° en stond het dier bij voeding weer tegen de traliën van het hok op en gaf den indruk van een gezond dier. Het steekwondje genas per primam en was niet gevoelig geweest voor druk. Het dier bleef verder gezond.

Ook hier dus was het eenige resultaat, dat verkregen werd, een voorbijgaande temperatuursverheffing bij het dier, gepaard met lichte ziekteverschijnselen gedurende de eerste dagen.

Het konijn, bij hetwelk bac. fluorescens was ingespoten, was den volgenden dag ziek, zat in elkaar en at bijna niets. De temperatuur die bij inspuiten 38.5° was, steeg tot 40° . Den volgenden dag was het dier

zieker, de ooren hingen omlaag, het zat ineengedoken in het hok en at niets, de temperatuur was 41.5° ; den derden dag zat het dier nog steeds ineen, de temperatuur was 39° ; den vierden dag was de temperatuur ook nog 39° , doch het dier was tieriger, at groen en brood en zat niet meer ineen, den 5^{den} dag hoewel nog 39° temperatuur, stond het dier tegen de traliën op, at goed en was als normaal; het dier bleef verder gezond.

Ook hier dus, hoewel een verschil met bac. megatherium, slechts eene voorbijgaande temperatuursverheffing, gepaard met een lichten, voorbijgaanden ziekte-toestand van het dier.

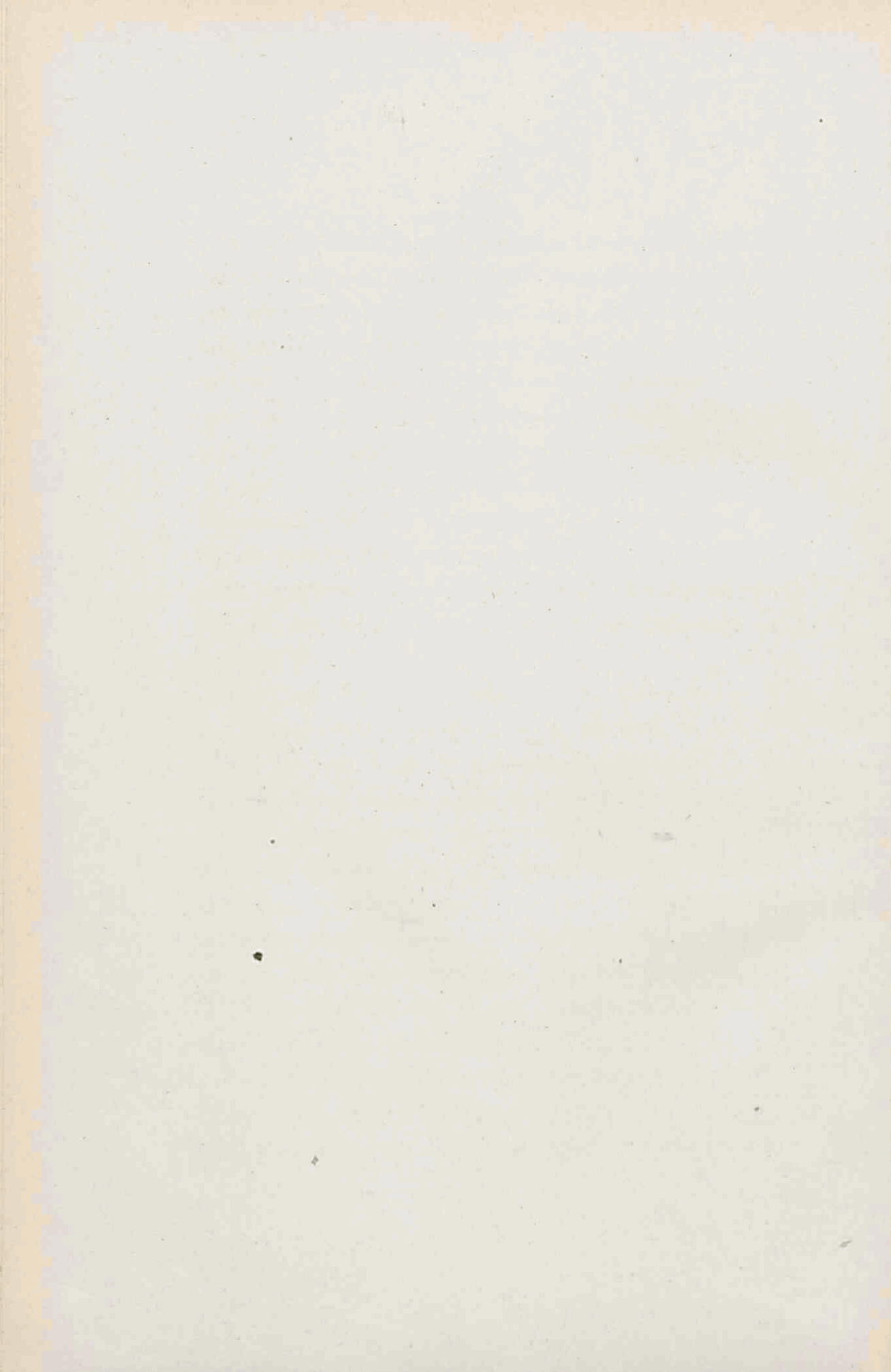
Van eene verkregen virulentie kan men dus in dit geval van beide bacillen moeilijk spreken, al dient erkend te worden dat de ziekteverschijnselen, die zij na deze bewerking in staat waren op te wekken van ingrijpende aard waren dan de oorspronkelijke bacillen vermogen op te wekken. Deze toch vermochten slechts ziekte en temperatuursverhooging te weeg te brengen gedurende een of twee dagen, terwijl die, welke in bouillon met bloed gekweekt waren, dit proces eenige dagen langer maakten, en wel bij bac. fluorescens nog enkele dagen langer dan bij bac. megatherium.

De morphologische kenmerken van bac. megatherium waren zoo veranderd, dat de oorspronkelijke cultuur op agar, geel getint en van droog aspect, langzamerhand

overging in eene witte, van slijmerige consistentie. Onder het microscoop bezien, leverde alleen de sporenvorming eenig verschil in aspect op. In de praeparaten van oudere kweekbuisjes zag men de meer gerekte open niet gekleurde plaatsen in de ketens der bacillen in meer ronde vormen overgaan; de grootte van den bacil bleef gelijk, ook de vorming van ketens bleef bestaan.

De macroscopische kenmerken van de culturen van bac. fluorescens op agar leverden geen ander verschil op, dan dat de fluorescentie steeds zwakker werd. Het microscopisch beeld leverde geen verschil op.





CONCLUSIES.

CONCLUSIES.

De permeabiliteit van den collodiumwand is voor verschillende in water opgeloste stoffen zeer uiteenlopend, zonder dat voor die verschillen eene bevredigende verklaring valt op te geven.

De grootte van het molecuul schijnt daarbij geen overwegende rol te spelen.

Terwijl van de gaspen zuurstof niet of nauwelijks doorgaat, diffundeert kooldioxyde zeer gemakkelijk.

Voor keukenzout en zoutzuur is de collodiumwand zeer goed permeabel, voor natrium-carbonaat daarentegen slechts in geringe mate.

Natriumhydroxyde tast den wand aan.

Van de organische stoffen passeeren enkelvoudige en samengestelde suikers gemakkelijk, pikrinezuur zeer langzaam, aniline-kleurstoffen (methyleenblauw, fuchsine) zelfs in het geheel niet of althans niet in aantoonbare mate. Daartegenover diffundeert serumeiwit, met een zooveel grooter molecule, vrij gemakkelijk, doch pepton weer niet, en terwijl diphtherie-toxine weder moei-

lijk diffundeert, gaan enzymen niet in merkbare mate door den wand van het collodiumzakje.

De methode van vervaardiging der collodiumzakjes door middel van capsules, acht ik, met het oog op de gemakkelijke en volledige sluiting, te verkiezen, boven de door Sanarelli aangegeven methode.

Het ingesloten zijn van een zakje in étui heeft geen storenden invloed op de uitwisseling van stoffen, doch is eene goede bescherming voor het zakje.

Door herhaalde passages van bac. megatherium en bac. fluorescens in collodiumzakjes door de peritoneaalholte van caviae kan men wel de morphologische eigenschappen dezer bacillen veranderen en ten deele de functioneele, doch eenen graad van virulentie, waardoor zij in staat zijn eene cavia te dooden, bereikt men niet.

STELLINGEN.

STELLINGEN.

I.

Dat Vincent van bac. megatherium eenen virulenten bacil gekweekt heeft, acht ik door hem niet bewezen.

II.

Bac. pyocyaneus en bac. fluorescens zijn waarschijnlijk slechts twee variëteiten van eenzelfde soort.

III.*

De methode om door doorvoeren van waterstof, de zuurstof uit eene verdunde bloedoplossing te verdrijven, is onvoldoende.

IV.

De stelling van Brügelman, dat prikkeling van het respiratie-centrum de conditio is voor het tot stand komen van asthma, is aannemelijk.

V.

Ten onrechte beschouwt Gegenbauer den overgang der vier musculi lumbricales in de dorsaalaponeurosis aan de radiale zijde van elk der vier vingers als den normalen.

VI.

Acute dacryocystitis kan ontstaan als gevolg van eene trachomateuse ontsteking van den traanzak.

VII.

Vetten worden uitsluitend in opgelosten vorm, als zeepen, door den darm geresorbeerd.

VIII.

De gal werkt niet alleen bij de oplossing, maar ook bij de resorptie van het opgeloste vet mee.

IX.

Bij primiparae, waarbij eklampsie in de openingsperiode optreedt, is dit doorgaans toe te schrijven aan compressie der ureteren.

X.

Phantom-oefeningen dienden zooveel mogelijk op het cadaver gegeven te worden.

XI.

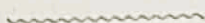
Zoo geen absolute contra-indicaties bestaan, rade men liever het zich laten opereeren van eene hernia aan, dan het dragen van een breukband.

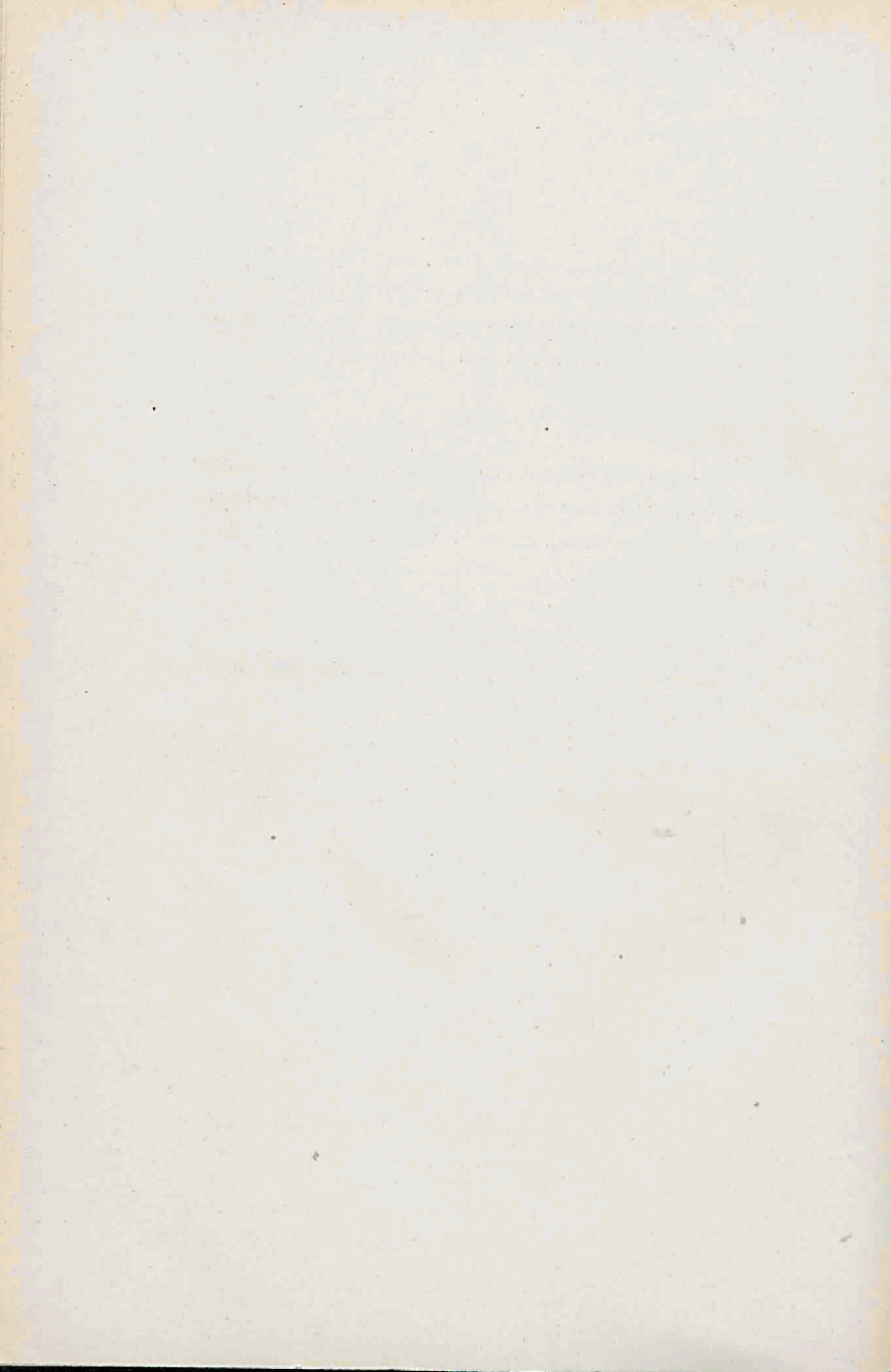
XII.

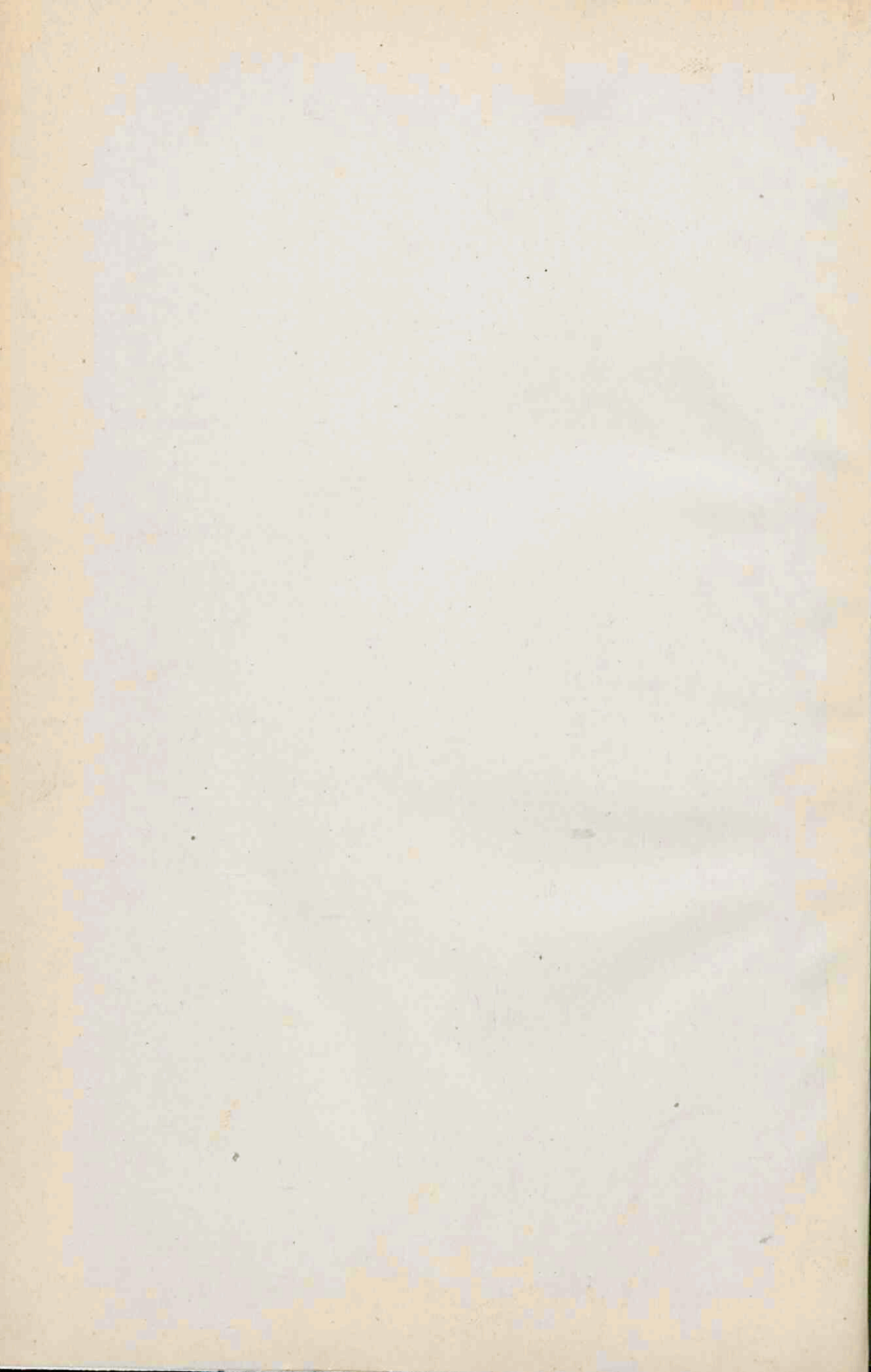
Het steriliseeren van een instrument door het eenige malen in alcohol te dompelen en dezen telkens daarna aan te steken, verdient de voorkeur boven het flambeeren.

XIII.

Lijders aan open tuberculose behooren niet in de scholen te worden toegelaten.







Diss