Bijdrage tot de kennis van de rol van den bacteriophaag (d'Herelle) bij infectie en immuniteit

BIJDRAGE TOT DE KENNIS VAN DE ROL VAN DEN BACTERIOPHAAG (D' HERELLE) BIJ INFECTIE EN IMMUNITEIT

BIJDRAGE TOT DE KENNIS VAN DE ROL VAN DEN BACTERIOPHAAG (D' HERELLE) BIJ INFECTIE EN IMMUNITEIT

BIJDRAGE TOT DE KENNIS VAN DE ROL VAN DEN BACTERIOPHAAG (D'HERELLE) BIJ INFECTIE EN IMMUNITEIT

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE VEEARTSENIJKUNDE
AAN DE VEEARTSENIJKUNDIGE HOOGESCHOOL TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS **DR. J. H. HARTOG,** VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER VEEARTSENIJKUNDIGE HOOGESCHOOL, TE VERDEDIGEN TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DEN SENAAT OP **MAANDAG 29 JUNI 1925,** DES NAMIDDAGS TE 4 UUR,

DOOR

IJSBRAND MICHIEL KRAMER
DIERENARTS, GEBOREN 17 FEBR. 1902
TE OLDECLOOSTER, BIJ BOLSWARD

1925
DRUKKERIJ FIRMA SCHOTANUS & JENS, UTRECHT

Aan mijn Vader.
Aan mijn Verloofde.

Gaarne maak ik van deze gelegenheid, mij bij het voltooien van mijn proefschrift geboden, gebruik, om U, Hoogleeraren, Lectoren, Prosectoren en Assistenten, tijdens mijn verblijf aan de Veeartsenijkundige Hoogeschool, daaraan verbonden, mijn welgemeenden dank te betuigen voor het genoten onderwijs en de wetenschappelijke vorming.

Vooral U, hooggeachte Promotor, Professor DE BLIECK, zeg ik hierbij dank voor de gegeven gelegenheid tot het onderzoek mijner keuze, den steun daarbij verleend en vooral voor de groote belangstelling steeds voor mijn werk getoond.

Ook U, collegae TAP, HARP, MAJOEWSKI, KIRCH, WELLENSIEK en HOOGLAND, zeg ik bij dezen dank voor Uw medewerking in de praktijk.

Verder dank ik U, Dr. HEELSBERGEN en Dr. BAUDET voor de prettige samenwerking en het verkrijgen van de noodige gegevens. Met genoegen zal ik terugzien op den tijd aan het Instituut voor Parasitaire- en Infectieziekten doorgebracht.

Ook het technisch personeel van het Instituut zeg ik hierbij dank voor de hulp verleend bij de zeer groote hoeveelheid werk. Tenslotte mijn dank aan allen die verder hun steun verleend hebben tot het samenstellen van dit proefschrift.

INHOUD

INLEIDING

Het aantoonen van den bacteriophaag door *d' Herelle*, na het groote werk van *Pasteur* zeer zeker de belangrijkste ontdekking op bacteriologisch gebied, wekte onmiddellijk een groot aantal onderzoekers op, dit onderwerp in studie te nemen. Vooral het standpunt van *d' Herelle*, dat de bacteriophaag een levend microorganisme, parasiet der bacteriën zou zijn, gaf spoedig aanleiding tot een groot aantal onderzoekingen omtrent de eigenschappen der lytische stof.

Een groot aantal onderzoekers trok namelijk de levende natuur van den bacteriophaag in twijfel en door bestudeering van zijn eigenschappen wilde men de natuur van dit geheimzinnig verschijnsel doorgronden.

Hoewel door de bestudeering der eigenschappen van den bacteriophaag eenige zeer interessante feiten aan het licht zijn gekomen, tot een beslissend oordeel over de al of niet levende natuur van het lytische agens is men nog niet gekomen.

Toen *d' Herelle*, na de ontdekking van den bacteriophaag de rol daarvan, bij de bescherming van een organisme tegen bacteriëele infecties, heeft nagegaan en daarbij een curatieve en preventieve werking vond, welke aan het ongelooflijke grenst, mocht men verwachten, dat vooral om het practische belang van dit deel der ontdekking, een groot aantal onderzoekers zijn mededeelingen zou controleeren en bij bevestiging ervan, de bacteriophagentherapie ook bij andere ziekten zou gaan bestudeeren.

Toch is dit niet het geval geweest. Vermoedelijk zijn de ongunstige resultaten der eerste onderzoekers hiervan de reden.

Niet alleen van medische, vooral van veterinaire zijde had

men meer belangstelling voor deze practische zijde van het vraagstuk mogen verwachten. Van veterinaire zijde vooral, omdat men bij dieren de natuurlijke infectie kan vervolgen tot aan den dood van het dier, terwijl bij den mensch de ziekte altijd zooveel mogelijk moet worden bestreden.

Een tweede reden, waarom vooral van veterinaire zijde de preventieve en curatieve waarde moet worden nagegaan, is het feit, dat men bij dieren experimenteel ziekten kan opwekken en daarna op ieder gewenscht oogenblik den bacteriophaag kan inspuiten, enz.

Het practisch belang der bacteriophagentherapie, maar ook het feit, dat men door bestudeering der rol van den bacteriophaag in het dierlijk organisme, tot een juister inzicht zal komen, over het al of niet levend zijn van den bacteriophaag was voor mij de aanleiding tot de bestudeering daarvan.

Alvorens echter tot een bespreking der rol van den bacteriophaag in de immuniteit over te gaan, acht ik het gewenscht eerst een beschrijving der onderzoekingen van *d' Herelle* omtrent eigenschappen en wezen van den bacteriophaag te geven met een tamelijk volledig overzicht der litteratuur die daarover na het eerste werk van *d' Herelle* „Le bacteriophage, son role dans l'immunite" reeds is verschenen. Zonder een tamelijk uitgebreide kennis der eigenschappen van den bacteriophaag en der bacteriophagie is het niet goed mogelijk een oordeel over de rol daarvan in de immuniteit te verkrijgen.

Eerst na deze inleidende bespreking, volgt een overzicht over de rol van den bacteriophaag in de immuniteit, met enkele nieuwe begrippen door *d' Herelle* aangegeven in zijn tweede werk „Les defenses de l'organisme. Daarna volgen de resultaten door andere onderzoekers verkregen met de bacteriophagentherapie.

Tenslotte volgen mijn eigen onderzoekingen, vooral betreffende de Kleinsche ziekte en Pullorum infecties der kuikens en kippen en daarna een korte beschrijving der onderzoekingen omtrent vogelcholera, vlekziekte en paratyphus.

HOOFDSTUK I

BACTERIOPHAAG EN BACTERIOPHAGIE

A. Oorspronkelijke onderzoekingen van d'Herelle

a. Eigenschappen van den bacteriophaag

Het feit, dat in culturen van typhus- en dysenteriebacillen, afkomstig van reconvalescenten, af en toe eigenaardige ronde openingen voorkomen, was voor *d' Herelle* het uitgangspunt voor een reeks van onderzoekingen, die hebben geleid tot het vinden van een bacteriolytisch principe, door hem genoemd:

Bacteriophagum intestinale d' Herelle 1918

Deze bacteriolytische stof is volgens hem een zeer klein levend microorganisme, dat kaarsen van Chamberland, die bacteriën tegenhouden, passeert.

Anderen echter beschouwen het als een lytisch ferment, Welke meening de juiste is, is nog niet uitgemaakt, hoewel vele onderzoekers wel de meening van *d' Herelle* steunen.

Na de ontdekking van *d' Herelle* is door een groot aantal onderzoekers gezocht naar bacteriophaag. In faeces, urine, bloed, etter, maar ook in aarde en water is bacteriophaag gevonden.

Enkele algemeene eigenschappen geven eenig inzicht in de werking der lytische stof.

Een stof, die bacteriophaag bevat, wordt gefiltreerd door een Chamberlandkaars. Het filtraat, gedaan bij een suspensie

van jonge bacteriën, zal de groei der bacteriesuspensie tegenhouden, of zelfs de suspensie ophelderen, als de bacteriophaag actief is voor de gebruikte bacteriesoort. Is de suspensie opgehelderd, dan kan één druppel ervan, een nieuwe bacteriesuspensie weer oplossen. Zoo kan men een onbepaald aantal malen doorgaan. Deze z.g. „transmission en serie", is alleen te verklaren, als telkens nieuwe lytische stof gevormd wordt, of deze zich vermeerdert.

Ook door uitstrijken op agar kan de lytische stof aangetoond worden. Men strijkt daarvoor van een bacteriesuspensie, waarbij filtraat gedaan is, iets uit op agar. Was er veel bacteriophaag en werkte deze sterk, dan zal op de agar niets groeien. De bacteriophaag houdt alle groei tegen. Minder actieve bacteriophaag, of een geringere hoeveelheid, geeft aanleiding tot de vorming van kleine open plekjes, ronde gaatjes in de uitstrijkcultuur.

Dit zijn de z.g. plaques of plages.

d' Herelle verklaart deze verschijnselen, door een ultravisibel virus aan te nemen, dat parasiteert op bacteriën.

Om de bacteriophaag voor een bepaalde bacteriesoort te vinden, gaat *d' Herelle* als volgt te werk. De stof, waarin de bacteriophaag zou zitten, moet worden gefiltreerd door een Chamberlandkaars. Alvorens daartoe over te gaan, is het dikwijls noodig, troebele vloestoffen, eerst van de grove verontreinigingen te ontdoen. Faeces zet men tevens eenige uren in bouillon in de broedstoof. Dan filtreert men door filtreerpapier, dat met fijne porceleinaarde (z.g. infusorienaarde) minder doorlaatbaar is gemaakt. Het filtraat is dan geschikt, om door de bacteriekaars te worden gezogen.

Wil men b.v. een bacteriophaag voor dysenteriebacillen aantoonen, dan ent men daags te voren een agarbuis met die bacillen. Van deze versche cultuur ent men op den dag, dat men het onderzoek verricht, 4 buizen bouillon. Bij de eerste buis doet men 1 druppel filtraat, bij de tweede 10 druppels en bij de derde 2 cc. De vierde dient voor contrôle, hij bevat alleen cultuur. Deze 4 buizen zet men bij

37° C. Na 12—18 uren kan men verschillende resultaten zien, n.l. 4, 3, 2 buizen of slechts 1 buis is troebel en de rest helder.

1e. Alle buizen troebel. Hieruit mag men niet besluiten, dat dat er geen bacteriophaag aanwezig was, want hij kan niet actief genoeg zijn, om op de groote massa bacteriën, in de bouillon macroscopisch invloed uit te oefenen, terwijl hij door uitstrijken uit de drie buizen op agar, nog is aan te toonen, door de vorming van plages, die als er veel zijn, den indruk geven, alsof de cultuur aangevreten is.

2e. Alleen de contrôle is troebel. Dit wijst op de aanwezigheid van een bacteriophaag van hooge activiteit. Die kan men verder aantoonen, door in 3 buizen bouillon een suspensie van jonge bacteriën te brengen tot licht troebel en bij ieder een druppel filtraat te doen, even te schudden en dan direct uit iedere buis uit te strijken op agar. Dan ziet men daar na 24 uur de openingen.

3e. Naast de contrôle zijn 1 of 2 buizen troebel geworden. Dit wijst op bacteriophaag van gemiddelde of hooge activiteit. Door bij bacteriesuspensies een druppel uit de helder gebleven buis te doen en op agar uit te strijken, kan men ook hier den bacteriophaag aantoonen.

Zooals uit het vorige reeds blijkt, is er een sterk werkende bacteriophaag en een zwak werkende. Daartusschen zijn dan allerlei overgangen. Men kan hier met recht spreken van virulentie, dat is de eigenschap, om zich te vermenigvuldigen ten koste van het geparasiteerde organisme. De sterk werkende bacteriophaag vernietigt snel de bacteriën, terwijl hij zichzelf vermeerdert, de zwak werkende minder snel.

Practisch zal men dikwijls een weinig virulenten bacteriophaag vinden. Evenals bij bacteriën, kan men die virulentie verhoogen, door passage door gevoelige organismen, dat zijn voor den bacteriophaag jonge levende bacillen. Het weinig actieve filtraat doet men bij een suspensie van 24 uur oude bacillen en zet dit bij 37°. Na 24 uur is de suspensie troebel.

Dan filtreert men weer door een bacteriekaars en doet het filtraat bij een nieuwe bacteriesuspensie, enz. Tenslotte bereikt men een maximumvirulentie, waarbij lysis van de suspensie optreedt, soms zelfs blijvend.

Door uitstrijken op agar, kan men nagaan, of de virulentie toeneemt. Dan krijgt men hoe langer hoe grooter en hoe langer hoe meer openingen, aangevreten culturen en ten slotte slechts enkele gesïoleerde kolonies. Hoe virulenter bacteriophaag, des te grooter plages op de agar.

Vooral jonge culturen moet men gebruiken voor het aantoonen en het activeeren van den bacteriophaag. Oude bacteriën worden niet meer opgelost. Een 24 uur oude bouilloncultuur is na inwerking van den bacteriophaag nog vrij troebel, terwijl een even dikke suspensie van bacillen van een 24 uur oude agarcultuur, volkomen opheldert. Daarom gebruikt men steeds bacteriesuspensies van jonge agarculturen.

Het mechanisme der lysis is door *d' Herelle* nagegaan, door uit een suspensie, waarbij bacteriophaag gedaan was, iedere 15 minuten op agar uit te strijken. Zoodoende is het mogelijk, door tellen van het aantal plages het aantal bacteriophagen te berekenen. Na ± 90 minuten bleek het aantal bacteriophagen plotseling 15 à 30 maal grooter te zijn geworden. Door te centrifugeeren, 30 minuten na het inzetten der proef, bleek, dat de eerste 15 á 30 minuten de bacteriophaag zich aan de bacteriën vasthecht en ongeveer een uur later eruit te voorschijn komt, na zich in de bacterie te hebben vermenigvuldigd. Tijdens die vermenigvuldiging, zou de bacterie worden opgelost.

Dat voor de vermenigvuldiging van den bacteriophaag, bacteriën noodig zijn, blijkt uit het feit, dat in geen enkel ander milieu vermeerdering plaats vindt, ook niet in het filtraat van bouillon, waarin langen tijd bacteriën gegroeid zijn, dus waar veel producten der bacteriegroei aanwezig zijn.

Met het ultramicroscoop is deze opvatting te controleeren. Men ziet de bacteriën opzwellen, ze worden rond en plotseling ziet men ze uit elkaar springen, waarbij slechts een

geringe troebeling overblijft. De granula, die men daarbij eerst in de bacteriecel en later in de geringe troebeling ziet, zouden de ultramicroben zijn. Hoe actiever de bacteriophaag, deste sneller de vermeerdering ervan in de bacterie, dus deste sneller lysis.

De hoeveelheid filtraat, dus het aantal bacteriophagen, is alleen van belang voor de tijd, waarop macroscopisch lysis optreedt. Veel filtraat bij een suspensie, dan worden alle bacteriën direct aangevallen en de suspensie wordt in vrij korten tijd helder. Weinig filtraat bij eenzelfde suspensie, dan worden eerst enkele bacteriën aangetast, de rest vermenigvuldigt zich echter normaal verder. De bacteriophaag vermenigvuldigt zich echter sneller, zoodat na eenige uren toch alle bacteriën worden opgelost. In dit geval wordt de bouillon dus eerst troebel en na eenige uren begint de opheldering.

Als parasiet van de bacteriën, is het medium van geen invloed, als de bacterie in het medium maar goed groeit. Alleen de zuurgraad is van belang, in zure media vermenigvuldigt de bacteriophaag zich niet.

Als parasiet van de bacteriën, moet de bacteriophaag zeer klein zijn. Met de ultramicroscoop ziet men in een medium waarin de bacteriophaag aanwezig is, zeer kleine heldere puntjes. Dat zouden de ultramicroben zijn.

Na lang staan, of na centrifugeeren, kan men door uitstrijken en tellen van het aantal plages, aantoonen dat in het onderste doel der vloeistof meer ultramicroben zijn, dan in het bovenste doel. Dus de bacteriophaag heeft een zekere massa. De grootte van den bacteriophaag zou overeenkomen met die van een eiwitmolecule. Wanneer dit n.l. een collodiummembraan passeert, passeert ook de bacteriophaag. Wordt het echter tegengehouden, dan is ook de bacteriophaag aan den anderen kant der membraan niet aan te toonen.

De activiteit van den bacteriophaag, dat is haar vermogen, zich ten koste van bacteriën te vermeerderen, is erg uiteenloopend. Zeer actieve bacteriophaag lost een suspensie in korten tijd op, minder actieve doet er langer over en weinig

actieve veroorzaakt slechts gedeeltelijke opheldering. Hoe sneller vermeerdering, deste sneller uitbreiding der bacteriophagenkolonie, dus op agar deste grooter plages. Dit is dus ook een maatstaf voor de virulentie.

Meestal is een bacteriophaag in staat, verschillende bacteriesoorten op te lossen, wanneer hij geïsoleerd wordt. Na een groot aantal passages, ten koste van een enkele bacteriesoort, blijft toch de werkzaamheid tegenover andere soorten bestaan. Dit wijst op één enkele bacteriophaag, die virulent kan worden voor allerlei bacteriesoorten.

Een tweede argument voor deze opvatting, bestaat hierin, dat bacteriophaag tegen verschillende bacteriën, met serum van een dier, ingespoten met een bepaalden bacteriophaag een positieve complementbinding geeft.

Door het verschil in graad der virulentie en het verschil in de aangetaste bacteriesoorten, van een niet lang geleden geïsoleerde bacteriophaag, erg virulent voor de eene soort, weinig voor een andere, met alle overgangen daartusschen, is een oneindig aantal combinaties mogelijk, zoodat twee volkomen gelijke bacteriophagenstammen niet bestaan.

Op grond van deze opvatting moest men den bacteriophaag virulent kunnen maken, voor alle bacteriesoorten. Dit gaat echter niet. Voor de normale darmbacteriën kan men een groot aantal stammen, door herhaalde passage over jonge bacteriën, virulent maken al was er in het begin absoluut geen werking aan te toonen. Voor de andere bacteriesoorten gaat het echter niet. De bacteriophaag is voor de darmbacteriën een normale parasiet, maar voor de andere bacteriesoorten een toevallige. Voor het verkrijgen van virulentie voor deze laatste zijn factoren noodig, die in vivo voorkomen, maar in vitro nog onbekend zijn.

Bij sommige bacteriesoorten is de bacteriophaag virulent voor alle bacteriestammen, bij andere echter slechts voor 1 of voor enkele. De eerste zijn de homogene bacteriesoorten, de tweede, de heterogene (b.v. typhus en coli).

De bacteriophaag tast de bacteriën aan door middel van

stoffen, die de bacteriën oplossen, z.g. lysinen. *d' Herelle* verkreeg die lysinen, door in een opgehelderde supensie den bacteriophaag te dooden, door middel van alcohol. Met de producten van den bacteriophaag, die dan overbleven, kon hij de groei der bacteriën tegenhouden, maar de z.g. „transmission en serie", was niet meer mogelijk.

Een voorname eigenschap der lysinen, bestaat hierin, dat zij de bacteriën zeer geschikt maken voor phagocytose. Wanneer men leucocyten en bacteriën bij elkaar brengt in een capillair en dan bij 37° zet en na 15 minuten uitstrijkt, vindt men enkele bacteriën in de leucocyten. Doet men er echter bacteriophaag bij, dan is het aantal bacteriën in de leucocyten veel grooter. De z.g. opsonische index is sterk verhoogd.

---

b. Bacteriophaag en bacterie

Zooals een hooger organisme zich verdedigt tegen bacteriën, zoo verdedigt ook de bacterie zich tegen den bacteriophaag. Bacteriesuspensies, die helder zijn geworden na toevoeging van bacteriophaag, ziet men na korteren of langeren tijd, veelal weer troebel worden. Toch is in de cultuur nog virulenten bacteriophaag aanwezig, want na filtreeren, kan men er weer suspensies mee ophelderen. Bacterie en bacteriophaag leven dus naast elkaar; de bacterie is immuun geworden voor de werking van den bacteriophaag. Enkele bacteriën in een suspensie worden immuum en deze vermeerderen zich.

Zulk een doorgegroeide cultuur, bestaande uit resistent geworden bacteriën, noemt men een secundaire cultuur. Een secundaire cultuur, geënt in een voedingsbodem, noemt men een gemengde cultuur, ook hierin zijn dus bacteriophaag en bacterie naast elkaar aanwezig.

Het evenwicht in de gemengde culturen, is meer of minder stabiel. Bacteriophaag van lage virulentie verdwijnt soms, als alle bacteriën resistent zijn geworden, in andere gevallen echter blijven bacteriophaag en bacterie naast elkander bestaan, ook na een groot aantal overentingen.

Zulke gemengde culturen vertoonen wel dikwijls abnormaliteiten in groei, af en toe ziet men gedeeltelijke opheldering en daarna weer troebel worden der bouillonculturen.

Hoe virulenter bacteriophaag, deste moeilijker is het voor de bacteriën, immuun te worden, dus deste minder secundaire culturen. Wanneer ze echter ontstaan, hebben ze dikwijls een karakteristiek aspect. Het medium is helder, maar op den bodem ontwikkelen de resistente bacteriën zich tot een ge-

aglutineerde massa. In het bovenste deel van het medium blijken geen bacteriën aanwezig te zijn, alleen zeer virulente bacteriophagen. Bij overenten blijven de subculturen dit aspect houden. Het evenwicht is stabiel geworden, bacterie en bacteriophaag leven in symbiose naast elkaar, want de bacteriophaag moet zich vermeerderen bij de overentingen en dit doet hij alleen ten koste van bacteriën.

Tusschen gemengde culturen met weinig virulenten en erg virulenten bacteriophaag zijn allerlei overgangen, van troebele culturen, lijkende op normale bacteriegroei, met erg onstabiel evenwicht, tot culturen in geaglutineerden vorm, met heldere bovenstaande vloeistof, met stabiel evenwicht. De culturen met stabiel evenwicht kan men een groot aantal malen overenten, het evenwicht tusschen bacteriophaag en bacterie blijft bestaan.

Zoo zal men in de standaardculturen op laboratoria wel dergelijke gemengde culturen vinden, die altijd voor rein zijn aangezien. Ze zijn echter niet „ultrarein".

Het uiterlijk der gemengde culturen in vloeibare media geeft dus eenig idee van de virulentie van den bacteriophaag en van de resistentie der bacteriën.

Ook op vaste voedingsbodems zijn de gemengde culturen meer of minder karakteristiek. Dikwijls blijft een schuingestolde agarbuis, die over de geheele oppervlakte geënt is, toch steriel. In andere gevallen echter krijgt men cultuur op de agar. Dit kan zijn:

1e. Een aaneengesloten laag op het dunne deel der schuingestolde agar. Van een smal randje bovenaan, tot $^3/_4$ der agaroppervlakte kan bedekt zijn met cultuur. Het onderste dikke deel is echter altijd steriel.

2e. Meer of minder geisoleerde koloniën, hoewel het geheele oppervlak geënt is. Het aspect dier koloniën kan verschillend zijn.

a. Normale koloniën, vooral als de cultuur is ontstaan door de werking van een bacteriophaag van lage virulentie.

b. Koloniën die, zooals *d'Herelle* het uitdrukt, meer convex en meer opaque zijn dan de normale. Ze be-

staan uit coccen. Na eenige malen overenten verdwijnt de coccenvorm en krijgt de bacterie zijn normale vorm terug.

c. Slijmige koloniën van verschillende grootte. Overgeënt op agar geven ze weer dezelfde koloniën, nooit een aaneengesloten laag cultuur. Ent men deze culturen in bouillon, dan krijgt men daarin een troebeling, die af en toe verandert, of een geaglutineerde massa, afhangende van de virulentie van den bacteriophaag en de resistentie der bacteriën.

Microscopisch zijn bacillen in de slijmige culturen, alsook in de geaglutineerde massa in bouillon, omgeven door een slijmige kapsel. Vermeerdering van resistentie zou coccenvorming geven. Moet de bacterie zich dan nog tegen zeer virulenten bacteriophaag verdedigen, dan zou hij omgeven worden door de slijmige kapsel, die de ultramicoben zou verhinderen in de bacterie binnen te dringen.

Met het verkrijgen van resistentie verdwijnt de geschiktheid voor aglutinatie. Zoodra de bacteriophaag verdwijnt, wordt ook de resistentie minder na een aantal overentingen en daarmee komt de aglutinabiliteit weer terug. Dit is een bekend feit op ieder laboratorium. Men isoleert af en toe culturen, die eerst na een aantal overentingen geschikt worden voor aglutinatie.

De bacterie verdedigt zich niet alleen door bovengenoemde immuniteit, maar ook door de pruductie van antilysinen, die de lysinen waarmee de bacteriophaag de bacteriën aantast, neutraliseeren en zoo, als ze in voldoende hoeveelheid aanwezig zijn, zelfs een zeer virulenten bacteriophaag verhinderen, een suspensie op te lossen. Vandaar dat als men bij een door den bacteriophaag opgehelderde suspensie telkens weer bacteriën doet, tenslotte de suspensie niet meer helder wordt. De gevormde antilysinen houden de werking der lysinen tegen.

Dus ook hier, zooals een hooger organisme zich verdedigt tegen de bacteriën, zoo verdedigen deze zich tegen den bacteriophaag.

B. Litteratuur na het verschijnen van „Le bacteriophage, son rôle dans l'immunité

Na de ontdekking van den bacteriophaag door *d' Herelle*, is door een groot aantal onderzoekers gezocht naar bacteriophaag. De daarbij gevolgde methode was meest die van *d' Herelle*, waarbij men dus aantoont, dat een filtraat al of niet in staat is, de groei der bacteriën in bouillon tegen te houden. Door uitstrijken op agar, toont men met zekerheid den bacteriophaag aan.

Wolff en *Janzen* vonden in faeces stoffen, die in vrij sterke verdunning remmend werkten op bacteriegroei, hoewel zij niets met den bacteriophaag te maken hadden. Zij meenen dan ook, dat men alleen op het zien van plages met zekerheid een bacteriophaag mag aannemen. De juistheid dezer meening blijkt wel hieruit, dat zoowel *Bail, Otto* en *Munster* en *Watanabe*, agar gebruiken voor het aantoonen van zwakke bacteriophagen. Vooral de zoogenaamde Auftropfmethode van *Wanatabe*, is zeer geschikt voor het aantoonen van zwakke bacteriophaag. Een suspensie van bacteriën wordt op een agarplaat uitgestreken en deze eenigen tijd gedroogd. Daarna druppelsgewijs het filtraat erbij. Iedere druppel, die bacteriophaag bevat, geeft dan aanleiding tot een plage.

In urine, bloed, etter, peritonitisch exudaat, vaginaalsecretum, maar ook in aarde, rivier- en zelfs zeewater is bacteriophaag gevonden. Hij komt dus eigenlijk overal voor, Het moet dan ook verwondering wekken, dat bij het groote aantal onderzoekingen op bacteriologisch gebied, de bacteriophaag zoolang tot het onbekende heeft behoord. Toch moet men met het aantoonen van bacteriophaag in een of ander

milieu voorzichtig zijn, daar zeer gemakkelijk vergissingen worden begaan.

Vooreerst is er gevaar, dat men tijdens het onderzoek, de te onderzoeken stof met bacteriophaag besmet.

Zijn resistentie, grooter dan die van bacteriën, maakt, dit in een laboratorium, waar met bacteriophaag gewerkt wordt, heel goed mogelijk. Een voorname bron van besmetting zijn Berkefeldbacteriekaarsen, zooals *Keller* aantoonde. Hierdoor kan men verschillende eigenaardige resultaten van sommige onderzoekers verklaren.

Hoewel *Keller* zijn kaarsen, na gebruik, eerst in stoom steriliseerde, dan reinigde, droogde, $^1/_2$ uur verhitte in een droogstoof tot 160°, daarna een uur op 100° en voor het gebruik weer in stoom steriliseerde, bleek toch bij filtratie van steriele bouillon, of NaCl-oplossing, in het filtraat bacteriophaag aanwezig te zijn. In plaats van de door hem gebruikte Berkefeldkaarsen, die door uitgloeien dikwijls breken en uit elkaar vallen, zijn beter de Chamberlandkaarsen, die men in een oventje tot gloeihitte kan brengen, waarbij de bacteriophaag zeker vernietigd is.

Blijkt uit dit alles, dat er groot gevaar is, dat men bacteriophaag vindt in stoffen, waarin hij oorspronkelijk niet aanwezig was, omgekeerd is het ook moeilijk met zekerheid te zeggen dat er in een of andere stof wel bacteriophaag aanwezig is.

Wolff, Janzen en *Hauduroy* wezen er n.l. op dat de bacteriophaag latent aanwezig kan zijn. Wil men dus met zekerheid bacteriophaag uitsluiten, dan moet men meerdere passages passages over gevoelige bacteriën verrichten.

Vooral over het verkrijgen van bacteriophaag uit bacterieculturen, bestaat reeds een groote litteratuur, mede in verband met de opvatting, dat bacteriophaag geen levend organisme zou zijn, maar uit de bacteriën zelf zou ontstaan.

Door middel van methylviolet *(Botez)*, sublimaat, immuunsera *(Otto—Munter—Winkler)*, physiologische NaCl-oplossing *(Weinberg* en *Otolesco)* en gedistileerd water *(Weinberg*

en *Azner)* en ten slotte zonder verdere bewerking *(Bail* en *Gildemeister)* isoleerde men de bacteriolytisch werkende stof uit oude bouillonculturen.

Ook met behulp van proteolytische fermenten, zooals trypsine en pancreatine, verkreeg men bacteriolysis *(Pico, Bachman* en *Aquino*).

d' Herelle, Beckerich en *Hauduroy, Flu* en *Pondman* verklaren deze resultaten, door aan te nemen, dat de bacteriophaag in die culturen latent voorkomt, zooals hij ook in andere omstandigheden in symbiose kan leven met bacteriën. Vooral sinds het *Flu* gelukt is, door wrijven met watervrije sulfas natricus, uit jonge bacteriën bacteriophaag te isoleeren, is deze verklaring zeer waarschijnlijk geworden. Ook *Pondman* komt tot dezelfde conclusie.

Keller komt tot dezelfde conclusie, wat betreft de proteolytische fermenten, n.l. dat deze niet identiek zijn aan het lytische principe en dat eventueele lytische werking berust op verontreiniging met het lytische agens.

Niet alleen over de vindplaats van den bacteriophaag, maar ook over zijn eigenschappen bestaat verschil van meening.

Door middel van de kennis der eigenschappen van den bacteriophaag, tracht men het wezen ervan te leeren kennen.

Vooreerst de grootte van den bacteriophaag. Na de publicatie van *d' Herelle*, dat de bacteriophaag collodiummembranen passeert, die ook eiwit doorlaten, heeft *Prausnitz* de grootte nauwkeurig bepaald, n.l. op 0.02 μ dat is 10 maal kleiner dan de kleinste microscopisch waarneembare microbe. Deze methode mag in de physica zeer goed zijn, in de biologie, waar men te doen heeft met levende wezens lijkt zij mij minder nauwkeurig. Evenals de witte bloedcel door openingen passeert, die veel kleiner zijn, dan hij zelf, zoo is het toch zeer goed mogelijk, dat ook de bacteriophaag, aangenomen dat hij een levend microorganisme is, dezelfde amoeboide beweging heeft, en in werkelijkheid veel grooter is dan uit de metingen van Prausnitz blijkt.

Flu vond dat bacteriophagen niet door agar passeerden en

grondt daarop zijn meening, dat de bacteriophaag iets corpusculairs moet zijn.

Het tellen van het aantal bateriophagen in een of ander medium geschiedt volgens *d' Herelle* door het tellen van het aantal plages, dat ontstaat door uitstrijken van b.v. 1 platinalus (ongeveer 0.01 cc.) van een suspensie waarbij de bacteriophaag is gedaan, op agar. Door berekening leert hij dan het aantal bacteriophagen kennen.

Appelmans meent, dat deze methode beïnvloed wordt door het aantal bacteriën in de suspensie. Hij bepaalt daarom de grootst mogelijke verdunning, waarin de bacteriophaag nog werkt. *Beckerich* en *Hauduroy* vonden, dat de methode van *d' Herelle* het nauwkeurigst is voor zwakke bacteriophaag en de methode *Appelmans* het beste voor virulente bacteriophaag.

Vooral over de invloed van chemische stoffen op den bacteriophaag is veel onderzocht. *d' Herelle* vond reeds, dat de bacteriophaag over het algemeen minder gevoelig is voor schadelijke invloeden dan bacteriën, behalve voor zuren en alkaliën. *Eliava* en *Pozerski* hielden bacteriophaag intact tusschen P_h 2.5 en 8.4. Volgens *Otto* en *Munter* en *Watanabe* verdraagt hij echter wel een 10 % sodaopl. Suikerhoudende voedingsbodems geven aanleiding tot zuurvorming. Daarmede kan men dus de bacteriophaag verwijderen uit een gemengde cultuur. Het onderzoek der resistentie tegen chemicaliën wordt moeilijk door het feit, dat vele de bacteriën remmen in hun groei en daardoor dus de bacteriophaag zijn voedingsbodem ontnemen. Het is dus moeilijk uit te maken, wat beïnvloed wordt, de bacteriophaag zelf of de bacterie.

Chloroform, aether, aceton, xylol, toluol, cafeine, morphine, strychnine hebben weinig invloed op den bacteriophaag, zooals *de Poorter* en *Maisin* aantoonden. Antiformine vernietigt de bacteriophaag *(Seifert)*. Vooral de werking van glycerine is onderzocht. Glycerine 50 % is absoluut niet schadelijk voor den bacteriophaag en men kan hem zelfs nog aan hooger

concentraties wennen, door langzaam indampen. Ook de werking van natriumfluoride is door *d' Herelle* nauwkeurig nagegaan. Een 1 % oplossing van NaFl schaadt den bacteriophaag zeer weinig maar ook bacteriën kan men wennen aan NaFl. Het feit dat de bacteriophaag evenals bacteriën kan wennen aan bepaalde stoffen zou volgens *d' Herelle* pleiten voor zijn levende natuur.

Een ander feit, waardoor lysis dikwijls wordt tegengehouden, is de absorptie. Een aantal colloiden zooals agar, gelatine, saleb, tragacanth, arabische gom en stoffen in colloidale oplossing, zooals electrargol en aluminiumhydroxyde, absorbeeren den bacteriophaag, en verhinderen zoo zijn werkzaamheid. De vermeerdering zou volgens *Nakamura* niet zoozeer worden beïnvloed. Ook normaal serum zou remmend werken op den bacteriophaag *(Gratia* en *Jaumain, De Necker, Doerr* en *Berger). d' Herelle* en *Bruynoghe* en *Maisin* ontkennen dit echter. *Bolle* komt tot de conclusie, dat gelatine en eiwitten in het algemeen, door hun grootere viscositeit, den bacteriophaag, die op zichzelf geen eigen beweging heeft, minder dikwijls in contact zullen brengen met de bacteriën. De meeste bacteriën kunnen zich dus ongehinderd ontwikkelen en op het groote aantal, dat daardoor ontstaat, heeft den bacteriophaag geen macroscopisch waarneembaren invloed meer. Hierdoor wordt dus de remmende werking teruggebracht tot een physisch verschijnsel. Bij de immuniteit komt deze kwestie weer ter sprake.

Wolff en *Janzen* hebben geprobeerd, door toevoeging van chemicaliën aan bacterieculturen, een eventueel daarin aanwezigen bacteriophaag te verwijderen en zoo de culturen ultrarein te maken. Zij vonden echter, dat een geringe hoeveelheid antisepticum den bacteriophaag juist in zijn werking versterkt en dat een grootere hoeveelheid de bacteriophaag remt en hem latent doet worden, waardoor hij resistenter wordt tegen desinficientia, dan bacteriën, waarvan de latente vormen ook zooveel beter bestand zijn tegen desinficientia, dan de bacteriën zelf.

Hoewel *d' Herelle* en *Prausnitz* uit de kennis van den invloed van chemicaliën besluiten, dat de bacteriophaag een levend organisme is, meenen *De Poorter* en *Maisin*, dat de werkzaamheid van een aantal stoffen wijst op het fermentachtige karakter van den bacteriophaag.

Ook over den invloed der temperatuur zijn onderzoekingen verricht. De bacteriophaag werkt het sterkst tusschen 37° en 41° C. Bij lagere temperatuur is de lysis vertraagd *(Doerr, Grüninger, Otto* en *Munter). Gildemeister* en *Herzberg* werkten met een z.g. lysogene colistam, dat is een colistam, die bij elke overenting het lytisch principe vormt en door *d' Herelle* beschouwd wordt als een symbiose van bacterie en bacteriophaag. Zij vonden, dat bij 10.5° C. nog een geringe vermeerdering van bacteriophaag plaats vindt. Bij 7.5—9° C. daarentegen houdt alle vermeerdering op, hoewel de bacteriën zich nog wel langzaam vermeerderen. Door de cultuur bij 8° C. te laten groeien, meenen zij den bacteriophaag te kunnen elimineeren. Deze feiten zijn echter nog niet bevestigd. Ook bij hooger temperatuur is de werking van den bacteriophaag geringer. De temperatuur, waarbij de bacteriophaag gedood wordt, werd zeer verschillend gevonden. *d' Herelle* meent 65° C. voor Shigabacteriophaag.

Marcuse daarentegen deelt mede dat hij zelfs kookhitte verdraagt. Vooral de resultaten van *Hauduroy* zijn in dit opzicht van belang. Deze meent n.l. dat bij een bepaalde temperatuur, de bacteriophaag ophoudt werkzaam te zijn, dus latent aanwezig blijft, terwijl hij eerst bij hooger temperatuur afsterft. Deze afstervingstemperatuur zou in een vochtig milieu 100—102° C. zijn, in droge omgeving ± 135° C. en voor alle bacteriophaagstammen hetzelfde. De temperatuur waarbij de werkzaamheid ophoudt, zou echter varieeren en samenhangen met de virulentie van den bacteriophaag voor een bepaalde bacteriesoort en liggen tusschen 70° en 80° C., dus hooger dan de afstervingstemperatuur der niet sporevormende bacteriën.

Pondman wijst in dit verband op de analogie met de spore-

vormende bacteriën, waar de vegetatieve vormen bij een bepaalde temperatuur afsterven, terwijl de sporen een veel hooger temperatuur verdragen. *Flu* kon de resultaten van *Hauduroy* niet vestigen. Na verhitting op 100° C. kon hij door reactiveeren geen bacteriophaag meer aantoonen en hij verklaart de resultaten van *Hauduroy* door fouten in de techniek, waardoor op een of andere wijze niet alle bacteriophaag op 100° verhit zou zijn, of er na de verhitting besmetting met den bacteriophaag plaats zou hebben gehad.

d' Herelle meent dat de lysis een gevolg is van de werking van door den bacteriophaag gevormde lysinen, die hij door middel van alcohol zou kunnen isoleeren. Het alkoholisch praecipitaat dat daarbij ontstaat zou nog in staat zijn bacteriegroei te remmen. *Hauduroy* schrijft die remming toe aan de aanwezigheid der alcohol.

Ten slotte nog een belangrijke eigenschap van den bacteriophaag, n.l. zijn virulentie. Meestal is de bacteriophaag werkzaam tegen meerdere bacteriesoorten. *d' Herelle* geeft de methode aan om de virulentie te doen stijgen, n.l. door herhaalde passage door de bacteriesoort, waarvoor men hem virulent wil maken. Op grond van deze opvatting, moest men wanneer men eenmaal een bepaalde bacteriophagenstam had, die virulent kunnen maken voor iedere bacteriesoort.

Seiffert, Bruyoghe en *Maisin* slaagden hierin voor verschillende darmbacteriën, als typhus, dysenterie, coli en partyphus. Pogingen om ook ander bacteriën als streptococcen en staphylococcen, diphtheriebacillen enz. tot oplossing te brengen, door middel van bacteriophagenstammen die virulent zijn voor darmbacteriën, zijn tot nu toe nog niet gelukt. Ook omgekeerd nog niet. *d' Herelle* schrijft dit toe aan het feit dat de bacteriophaag een normale parasiet is voor de darmbacteriën en voor de andere een toevallige. *Gratia* slaagde er in de werkzaamheid van een staphylococcenbacteriophaag ook over andere staphylococcen uit te breiden.

Vooral bij coccen schijnt het versterken moeilijk te gaan, zooals *d' Herelle* zelf en ook *Eliave* ondervonden. De laatste had 4 maanden noodig om een bacteriophaag voor coccen vrij virulent te krijgen. Een aantal onderzoekers o.a. *Wolff* en *Janzen*, *Maisin* en *Appelmans* deelen mede, dat wanneer een bacteriophaag, virulent voor meerdere bacteriesoorten, herhaaldelijk passeert over een bepaalde bacteriesoort, de virulentie voor de andere soorten verloren gaat. *d' Herelle* daarentegen vond, dat na ongeveer 1000 passages door dysenteriebacillen de daarvoor gebruikte bacteriophaag toch nog typhus en colibacillen aantastte.

Reeds voor een groot aantal bacteriesoorten is bacteriophaag gevonden, n.l. voor Coli, typhus, paratyphus, dysenterie, Kleinsche ziekte, diphtherie, vlekziekte en pestbacillen, bacillen der haemoorrhagische sceptichaemi, streptococcen en staphylococcen, miltvuurbacillen en bacillus pyocyaneus. Ten slotte meent men ook tegen het virus der veepest en het mond- en klauwzeer een bacteriophaag te hebben gevonden.

Naar een cholerabacteriophaag is door *d' Herelle* te vergeefs gezocht. *Flu* is erin geslaagd uit reinculturen van choleravibrionen de cholerabacteriophaag te isoleeren.

Door *Lisch* wordt bij bacillus pyocyaneus naast de echte bacteriophaag een pseudobacteriophaag beschreven. In agarculturen van sommige pyocyaneusstammen, speciaal sterk kleurstof vormende, vond hij „Einsenkungen" die met een zilverkleurig laagje bedekt waren en die bij overenting telkens weer terug kwamen. Opheldering van suspensies van bacillus pyocyaneus in bouillon gelukte niet met filtraat dezer culturen en ook een stijging der virulentie van het filtraat kon niet worden verkregen.

Naast deze openingen, bedekt met een zilverkleurig laagje, kon hij uit sommige pyocyaneusculturen filtraten verkrijgen die typische plages veroorzaakten en waarvan de virulentie verhoogd kon worden.

Een overgang van het eene verschijnsel in het andere kon niet worden verkregen en *Lisch* beschouwt het eerste als

oplossing van oudere bacteriën, het tweede als een typische bacteriophagie.

Pesch vond in een miltvuurcultuur ronde scherp omschreven openingen van verschillende grootte. Door de plaatmethode kreeg hij geisoleerde koloniën die te onderscheiden waren in twee groepen, heldere mooi gelokte miltvuurkoloniën en ondoorzichtige kroeskopachtige koloniën. Door langer verblijf bij 37° traden in culturen van de ondoorzichtige koloniën weer heldere plekken op en ook omgekeerd.

Hij beschouwt beide vormen dan ook als varianten die in elkaar over kunnen gaan. Hij vraagt zich dan ook af, of de door *Bürgers* en *Bachmann* beschreven miltvuurbacteriophaag wel een echte bacteriophaag is geweest.

In ieder geval blijkt uit deze mededeelingen dat men voorzichtig moet zijn, openingen of heldere plekken in agarculturen te beschouwen als door bacteriophaag te zijn veroorzaakt.

Na een overzicht der eigenschappen van het lytische principe komt men tot de vraag, wat het is, een levend microorganisme, of een ferment. *d' Herelle* verklaart de bacteriolysis door een levend ultravisibel virus aan te nemen, dat een obligate endoparasiet der bacteriën zou zijn.

Kabeshima meende in 1920, dat de bacteriolysis zou ontstaan door een in den darm aanwezige katalysator of proferment, die de diastatische fermenten zou activeeren, waardoor lysis der bacteriën zou ontstaan. Hij grondt deze meening op de minimale hoeveelheid filtraat, die noodig is voor lysis en op de resistentie, die naar zijn meening grooter is, dan met de levende natuur overeenkomt.

Bordet en *Ciuca* verklaren de bacteriolysis evenals *Kabeshima* door een fermentwerking, het z.g. principe lytique. Dat ferment zou uit de bacteriën ontstaan door de inwerking der leucocyten. Door de inwerking daarvan zouden de bacteriën de erfelijke eigenschap krijgen, een bacteriolytisch ferment te vormen. Zij gronden deze meening op het feit, dat, wanneer ze bij een cavia eenige malen colibacillen intraperitoneaal

inspoten, het leucocytenrijke exsudaat in staat was, colisuspensies op te helderen en dat die opheldering een groot aantal malen kon worden herhaald.

Kuttner kon door extracten van een groot aantal weefsels bacteriolysis verkrijgen. Hij neemt dan ook, dat niet alleen de leucocyten, maar alle lichaamscellen de storing in de bacteriën teweeg kunnen brengen, waardoor deze een abnormaal lysine gaan vormen.

d' Herelle voert tegen de theorie van *Kabeshima* aan, dat een katalysator bij de „transmission en serie" zoo verdund zou worden, dat een zoo geringe concentratie ontstaat, dat de katalytische werking absoluut is uitgesloten.

Wat de theorie van Bordet en Ciuca betreft, de proef waarop hun opvatting berust, kan door de theorie van *d' Herelle* heel goed worden verklaard, n.l. tengevolge der injectie van colibacillen zou de in den darm aanwezige bacteriophaag in het peritoniaalvocht komen en zich daar ten koste der colibacillen vermeerderen. Maar in het isoleeren van het principe lytique slaagde *d' Herelle* en ook *Seiffert* lang niet altijd. *Otto, Munter* en *Winkler* verkregen op de manier van *Bordet* een bacteriophaag bij inspuiting van typhus en dysenteriebacillen, maar ook hier kan heel goed de bacteriophaag in den darm aanwezig geweest zijn.

Tegen de theorie van *d' Herelle* is door *Bordet* en *Ciuca* nog aangevoerd dat wanneer ze een sterk verdunde bacteriophagencultuur brachten bij een emulsie van bacteriën, de bacteriophaag zou verdwijnen. *d' Herelle* toonde echter aan dat de bacteriophaag niet verdwenen was, maar na 48 uur bij 37° geweest te zijn, door uitstrijken duidelijk was aan te toonen. Lysis der bacillen trad echter niet op, omdat de weinige bacteriophagen zich niet zoo snel konden vermenigvuldigen, om te beletten dat een groot aantal bacteriën te oud werden om nog opgelost te worden en afstierven.

Een ander argument tegen de levende natuur van den bacteriophaag is volgens *Bordet* het feit dat in een mengsel van bacteriophaag en antibacteriophagenserum de bacterio-

phaag zou verdwijnen. *d' Herelle* en *Eliava* vonden echter dat de bacteriophaag niet verdwenen was, en dat de lytische werking na langer verblijf bij 37° weer terugkwam. *Bruynoghe* en *Maisin* wezen erop, dat alleen de lysinen van den bacteriophaag geneutraliseerd zouden zijn en dat door verwarming op 56° C. lysinen en antilysinen weer gescheiden konden worden. De bacteriophaag zelf wordt echter niet vernietigd. Vooral de later aangetoonde antiantilysinen, die de lysis doen terugkeeren, door de antilysinen te neutraliseeren, pleiten voor deze verklaring.

Bruynoghe wijst op het feit, dat wanneer de bacteriophaag een product der bacteriën was, hij specifiek zou moeten zijn voor elke bacteriesoort en die specificiteit ontbreekt juist.

Niet alleen het abnormaal autolysine van *Bordet* en *Ciuca* maar ook normaal autolysine wordt beschouwd als de oorzaak der lysis. Door alle mogelijke bewerkingen is men er in geslaagd uit bacterieculturen het lytisch principe te isoleeren. Vooreerst gelukt dit lang niet altijd en *d' Herelle* verklaart de gevallen waarin het wel gelukt, door het feit, dat de culturen heel goed met bacteriophaag, die overal in de natuur voorkomt, besmet kunnen zijn en vooral na de onderzoekingen van *Flu* die uit jonge bacterieculturen, door fijnwrijven met watervrije Sulfas Natricus bacteriophaag isoleerde, is symbiose van bacterie en bacteriophaag wel bewezen.

Ogata kon uit 8 dysenterie (Shiga) stammen, die gevoelig waren voor bacteriophaag door uitdrogen de lytische stof isoleeren. Uit 2 resistente culturen daarentegen gelukte het niet. In luchtdicht gesloten buizen bouilloncultuur, die hij even lang bij 37° bewaarde kon hij echter geen lytische stof aantoonen. Ook na snel opdrogen der culturen niet. Hij meent dat tijd en vermoedelijk ook zuurstof een rol spelen bij het ontstaan van de lytische stof uit de bacteriën.

Gildemeister elimineerde door kweeken bij 8.5° C. de bacteriophaag uit een bacteriecultuur. Na filtreeren of verhitten op 58° is dan door de methode *d'Herelle* om stijging der virulentie te krijgen, door passage over gevoelige bac-

teriën bij 37° geen bacteriophaag meer aan te toonen. Brengt hij echter direct zulk een z.g. bacteriophaagvrije 8.5° cultuur, bij 37°, dan wordt direct weer bacteriophaag gevormd. Op grond hiervan meent hij dat het producten der bacteriën zijn, z.g. „spontan lysinen".

Borchardt meent ook dat de lysis berust op fermentwerking. Door voedering van konijnen met dysenteriebacillen, nadat het maagzuur geneutraliseerd was door natronloog, kon hij na 24 uur in de faeces dysenteriebacteriophaag aantoonen, hoewel in speeksel en maagsap geen bacteriophaag aanwezig was. Door het aanleggen van een fistel verkreeg hij duodenaalsap. Dit werkte sterk lytisch. De twee componenten, darmsap en pancreasvocht, ieder afzonderlijk niet. Het trypsinogeen uit het pancreas zou door de enterokinase uit het darmsap omgezet worden in actief trypsine. Eerst meende hij dat de bacteriophaag in den darm ontstond. Toen echter bleek, dat het filtraat wel lytisch werkte op een aantal bacteriën, terwijl geen echte bacteriophaag aanwezig bleek te zijn, vermoedde hij dat het trypsine uit de bacteriën een tryptisch ferment „herausschält".

Flu kon, hoe nauwkeurig hij de proeven van *Borchardt* ook herhaalde, zijn resultaten niet bevestigen. Hij wijst er op, dat een aantal onderzoekers *(Mouton, Fermi, Kruse, Jochmann* en *Kantorowics)* vonden dat trypsine geen levende bacteriën aantast en dat deze het zelfs als voedsel gebruiken en zich ondanks de aanwezigheid van trypsine gewoon vermeerderen. Terwijl de bacteriophaag zich juist ten koste van levende bacteriën vermeerdert en niet ten koste van doode, lost trypsine juist doode bacteriën op.

Ook *Keller* komt tot de conclusie, dat in darmsap, verkregen door een duodenaalfistel, geen overeenkomst bestaat tusschen het gehalte aan lysinen en trypsine. Hoewel hij met geactiveerd pancreassap sterk tryptische werking kreeg, gelukte het toch niet daarmee lysis van bacteriën te krijgen. Hij meent dan ook dat lysinen al in het duodenaalsap aanwezig zijn.

Ook met handelspraeparaten, als pancreatinum, kreeg men lysis en dit werd aangevoerd als bewijs, dat de fermenten in die praeparaten aanwezig, de oorzaak zouden zijn der lysis. Zooals reeds bij de bespreking der vindplaats van den bacteriophaag is gezegd, meent *Keller* dat die werking berust op verontreiniging der praeparaten met bacteriophaag.

Bail heeft een andere hypothese opgesteld, die in zooverre met die van *d' Herelle* overeenkomt, dat ook hij als oorzaak der lysis iets corpusculairs aanneemt. Hij meent, dat onder invloed van het lichaam, levenskrachtige, zich deelende bacteriën uiteenvallen in kleine stukjes die hij „splitter" noemt en welke bacteriekaarsen zouden passeeren. Door inwerking op andere bacteriën zouden ook die in „splitter" uiteenvallen. Onder bepaalde omstandigheden zouden de „splitter" uit kunnen groeien tot bacteriën, die dan resistent zouden zijn. Met deze opvatting klopt echter niet het door *d' Herelle* gevonden verschijnsel dat de bacteriophaag niet specifiek is en dat alle bacteriophagen aanleiding geven tot de vorming van eenzelfde antilichaam.

Hoewel *d' Herelle* alle feiten met zijn theorie zeer goed kan verklaren en tegen de andere theoriën een aantal bezwaren heeft, worden nog steeds een aantal argumenten voor en tegen de verschillende theoriën aangevoerd. Feiten die de een voor de levende natuur van den bacteriophaag aanvoert, pleiten volgens anderen voor zijn fermentachtige natuur.

De strijd over het wezen van den bacteriophaag is dan ook nog niet beslist. De tegenwoordige stand van het vraagstuk wordt duidelijk uiteengezet door *Hugo von Preisz,* die in zijn monographie zegt: „Ich möchte meine meinung über die Natur des Phagen damit zusammenfassen, dasz sich sämtliche Erscheinungen, die ich als in den Bereich der Phagenwirkung gehörend erkannt habe, vom Standpunkte der parasitairen Theorie des Phagen sich restlos erklären und verstehen lassen".

„Wie leicht und wiedersprechlos sich auch alle Erscheinungen der Bacteriophagie vom Standpunkt der Belebtheit des Bacteriophagenprinzips erklären lassen, so sind doch auch

andere Auffassungen so lange berechtigt als es nicht gelungen ist für die belebte Natur des Agens zwingende Beweise zu bringen. Uberhaupt drehen sich die Bestrebungen, die Beschaffenheit des Bacteriophagen Agens zu erkennen, um die Frage ob letzteres sich vermehrt, oder ob es vermehrt wird; im ersteren Fall wäre es ein Lebewesen, im letzteren ein Erzeugnis der Bakterienzelle. Keine der beiden Möglichkeiten hat derzeit stichhaltende Beweise für sich.

HOOFDSTUK II

LITTERATUUR OVER DE ROL VAN DEN BACTERIOPHAAG IN DE IMMUNITEIT

A. Onderzoekingen van d' Herelle

Zooals er in vitro een strijd is tusschen bacterie en bacteriophaag, waarbij nu eens de bacterie, dan weer de bacteriophaag overwint, is dit ook het geval in het dierlijk organisme.

Het verloop en het resultaat der strijd weerspiegelt zich in den toestand van het individu, waarin de strijd plaats vindt. Zoodra een patiënt, lijdende aan een infectie, verbetert, kan men uit een zijner excreta, meestal de faeces een bacteriophaag isoleeren, die in staat is de bacteriestam die de ziekte veroorzaakt, op te lossen.

Dikwijls heeft die bacteriestam een zekere resistentie, waardoor de bacteriophaag vrij virulent moet zijn om hem op te kunnen lossen. Voor dien tijd is deze dan al virulent genoeg, om lysis te veroorzaken van een stam van dezelfde bacteriesoort, die eenigen tijd gekweekt is en daardoor zijn resistentie meer of minder heeft verloren.

Ook schommelingen in het verloop der ziekte vindt men terug in de virulentie van den bacteriophaag t.o.v. de uit de patiënt geisoleerde bacteriestam. Bij vooruitgang stijging der virulentie, bij achteruitgang daling. Blijvende genezing treedt in, zoodra de bacteriophaag voorgoed de bacteriën heeft overwonnen. Verkeert het individu in een besmette streek, zoodat geregeld bacteriën worden opgenomen, dan blijft de bacteriophaag lang

zijn virulentie behouden. Is dit niet het geval, dan neemt de virulentie spoedig af.

De oorzaak van een letaal einde is in de meeste gevallen, dat de bacteriophaag niet virulent wordt voor de infectie-oorzaak, ook niet voor den stam dier bacteriesoort, die door kweeken zijn resistentie heeft verloren.

Soms is er echter wel virulente bacteriophaag en toch gaat de patiënt steeds achteruit, tot ten slotte de dood intreedt. In die gevallen is de bacteriestam resistent geworden; de bacterie heeft overwonnen in den strijd. De bacteriophaag is wel virulent voor niet resistente en weinig resistente stammen.

Hierin ligt ook de verklaring voor het feit, dat de normale darmbacteriën af en toe toch ziekteoorzaak kunnen worden, n.l. wanneer ze door een of andere oorzaak resistent worden voor den bacteriophaag. Die vermeerderde resistentie gaat gepaard met een sterker vermogen der bacteriën, om zich ten koste van een hooger organisme te ontwikkelen, dus met een vermeerdering der virulentie.

Wanneer de bacteriophaag niet virulent wordt, duurt de ziekte meestal slechts kort. De bacterie kan zich zonder strijd ontwikkelen. In het tweede geval is het verloop meestal chronisch. Er is voldoende tijd voor de bacteriestam om virulent te worden, hoewel de bacteriophaag ook in virulentie toeneemt, maar toch niet in die mate, dat hij den strijd kan winnen.

Uit de verhouding van bacterie en bacteriophaag is dus voor een groot deel de prognose af te leiden.

De reden waarom de virulentie van den bacteriophaag niet voldoende stijgt, kan vooreerst liggen in het medium. Dit is in de meeste gevallen de darminhoud, hoewel de bacteriophaag ook wel in het bloed overgaat, bij infecties, die niet tot den darm beperkt blijven. Bij de meeste infectieziekten komen echter de bacteriën altijd in den darm, zoodat daar vooral de bacteriophaag zijn virulentie verkrijgt. De sterke veranderingen in samenstelling en zuurgraad der darminhoud kunnen de bacteriophaag in zijn werking helpen of remmen.

Een tweede oorzaak is het binnendringen van erg resistente

bacteriën, die hun resistentie verkregen hebben in den strijd met de bacteriophaag bij andere patiënten. Op deze wijze is dus de toename van het aantal ernstige gevallen in het verloop eener infectieziekte te verklaren. De bacteriën, bij één of meer individuen resistent geworden, verspreiden zich en verhinderen in nieuwe geïnfecteerde personen of dieren den bacteriophaag in virulentie te stijgen, hij kan zich n.l. niet ten koste der resistente bacteriën vermenigvuldigen.

De bacteriophaag is ook van belang bij het verloop eener epizootie. Zoodra in een besmette streek een individu de ziekte doorstaat, dus de bacteriophaag overwonnen heeft en virulent is geworden voor de pathogene bacterie, houdt dikwijls plotseling kort daarna de ziekte op. De virulente bacteriophaag is met de faeces naar buiten gekomen en heeft zich verspreid, zoodat menschen en dieren er als het ware mee geïnfecteerd zijn. De virulente bacteriophaag behoedt vanaf dat oogenblik de nog niet aangetaste menschen en dieren voor de ziekte en in de reeds geïnfecteerde is de kans gunstig voor een overwinning van den bacteriophaag, zoodat genezing op zal treden, behalve in die gevallen, waarin de bacteriën resistent kunnen worden tegen den bacteriophaag, al is deze nog zoo virulent. De epizootie houdt dus op, niet door gebrek aan pathogene bacteriën, maar door de aanwezigheid van een virulente bacteriophaag.

In het algemeen vindt men in een besmette streek een bacteriophaag actief voor de ziekteveroorzakende bacterie. Die virulentie wordt onderhouden door telkens binnendringende bacteriën. Zoolang zal dus geen sterfte voorkomen. Gaat echter bij een bepaald individu de virulentie achteruit, door ongunstige veranderingen van het medium, dan zal het ziek worden. Een tweede zeer voornamen factor dat in zulk een besmette streek sterftegevallen voorkomen, is het resistent worden der bacteriën.

Het algemeen verloop eener epizootie hangt dus af van het verloop der strijd tusschen bacterie en bacteriophaag en zooals een ziek individu de ziekte verspreidt, zoo verspreidt een gezond individu de immuniteit tegen de ziekte.

De bacteriophaag is echter niet alleen werkzaam bij ziekten; ook bij gezonde individuen is hij aanwezig hoewel in een streek waar langen tijd een bepaalde ziekte niet is voorgekomen, geen virulentie bestaat voor de bacteriesoort, die die ziekte zou veroorzaken. In zulk een streek is hij alleen virulent voor die bacteriën, ten koste waarvan hij zich kan ontwikkelen, dat zijn de normale darmbacteriën. Komt echter bij een diersoort een ziekte voor, dan vindt men den bacteriophaag, virulent voor de bacterie, die de oorzaak der ziekte is, terug in de faeces van alle andere diersoorten in die streek, ook al zijn ze onvatbaar voor de ziekte.

Uit het voorafgaande blijkt dus dat de bacteriophaag een belangrijke rol speelt bij het behoeden van een organisme voor ziekten. Om dit nog beter aan te toonen, heeft *d' Herelle* dieren kunstmatig geïmmuniseerd en ze daarna aan infectie blootgesteld, of in besmette streken koppels kunstmatig met bacteriophaag behandeld. Dit laatste vooral bij Kleinsche ziekte.

In een aantal koppels kippen, waarin geregeld dieren stierven, spoot hij $^1/_2$ cc. bacteriophaag per stuk in. In alle behandelde gevallen hield daarna de ziekte plotseling op, zelfs zoo, dat een aantal dieren die ziek waren voor de inspuiting, daarna snel genazen.

Ter contrôle nam hij 6 kippen uit een niet besmette streek, waarbij hij in de faeces geen Kleinsche ziekte bacteriophaag kon aantoonen.

Kip No. 1 kreeg 1 cc. virulente bacteriophaag per os en daarna dagelijks 2 cc. Kleinsche ziekte bouilloncultuur. De bacteriophaag bleef al dien tijd virulent, tot 9 dagen nadat de laatste dosis cultuur gegeven was.

Kip No. 2 kreeg 2 cc. van denzelfden bacteriophaag subcutaan, maar geen cultuur. Reeds na 3 dagen was de virulentie van den bacteriophaag, die spoedig na de inspuiting in den darm was aan te toonen, voor Kleinsche ziekte bacillen weer verdwenen.

Kip No. 3 en 4 werden gebracht bij kip No. 1. Na 2 en

3 dagen was in hun faeces een virulente Kleinsche ziekte bacteriophaag aan te toonen. Daarna kregen ook deze 2 kippen dagelijks 2 cc. Kleinsche ziekte bouilloncultuur per os en de bacteriophaag bleef virulent tot 7 en 10 dagen nadat de laatste maal cultuur was gegeven.

Een maand na deze experimenten was bij geen der 4 kippen in de faeces een bacteriophaag, virulent voor Bacillus Gallinarum aan te toonen. Toen kreeg ieder dezer 4 kippen 2 cc. van een pas geïsoleerde Kleinsche ziekte bouilloncultuur per os.

In een tweede kooi. goed geïsoleerd van de vorige 4 kippen, teneinde besmetting met bacteriophaag te voorkomen, zaten kip No. 5 en 6, die geen aantoonbare Kleinsche ziekte bacteriophaag in hun faeces hadden en ook uit de onbesmette streek afkomstig waren. Ook deze kregen evenals de vorige 4 kippen 2 cc. van dezelfde Kleinsche ziekte bouilloncultuur per os.

Deze 2 contrôlekippen stierven resp. 2 en 3 dagen na de ingestie der cultuur terwijl de andere 4 kippen volkomen gezond bleven en in de faeses weer een virulente Kleinsche ziekte bacteriophaag kregen. De bacteriophaag was dus bij deze 4 dieren latent aanwezig gebleven.

Hier bleek dus zeer duidelijk, dat de bacteriophaag de kippen beschermt tegen binnendringende bacteriën en dat deze immiteit contagieus is.

Het sterkst blijkt de rol van den bacteriophaag in de immuniteit echter bij de proeven bij buffels met haemorrhagische sceptichaemie in Z.-O. Azië door *d' Herelle* verricht.

Spuit men een buffel in met bacteriophaag, dan is het dier de eerste 24 uur immuun tegen een 5 maal doodelijke dosis cultuur. De volgende dagen is er van immuniteit geen sprake, tot op een bepaald aantal dagen na de injectie van bacteriophaag, het dier plotseling weer immuun is. Dus er is een zekere incubatietijd. Het bleek dat deze afhangt van de hoeveelheid bacteriophaag die ingespoten is; hoe meer bacteriophaag, hoe langer incubatietijd. Na afloop der incubatietijd treedt de immuniteit zeer snel in. Schadelijke gevolgen ten-

gevolge van de injectie van den bacteriophaag zijn niet waargenomen. De leeftijd is van groot belang. Oude dieren worden niet meer in zulk een hoogen graad immum als jonge dieren. De laatsten kunnen na de incubatietijd een zeer groote dosis cultuur verdragen. Oude dieren zijn alleen immuun voor een kleinere dosis. De immuniteit blijft minstens een jaar bestaan.

Men krijgt dus eigenlijk twee soorten immuniteit:

1e. De z.g. heterologe immuniteit, een gevolg van de aanwezigheid van virulenten bacteriophaag in het organisme. Deze immuniteit duurt slechts zoolang er bacteriën aanwezig zijn, ten koste waarvan de bacteriophaag zich kan ontwikkelen, dus in een niet besmette streek maar zeer kort. Na 24 uur is dan de bacteriophaag al uit het bloed verdwenen. Kort na de inspuiting vindt men hem al in de faeces, maar ook daarin verdwijnt hij spoedig. In een niet besmette streek is dus de heterologe immuniteit van weinig belang. In een besmette streek daarentegen is het deze immuniteit die blijft bestaan zoolang pathogene bacteriën in het lichaam binnendringen, b.v. bij Kleinsche ziekte. Dan kan de bacteriophaag zich n.l. ten koste van die bacteriën ontwikkelen.

2e. De homogene of organische immuniteit, die eerst optreedt na een zekere incubatietijd. Deze ontstaat door een reactie van het organisme, dat ingespoten is met een bacteriophagencultuur. Het bloed van een dier met deze immuniteit, veroorzaakt, als het bij een ander dier wordt ingespoten, een passieve immuniteit.

Waardoor ontstaat nu deze homogene immuniteit? Wanneer men bacteriophaag inspuit, spuit men tevens de producten in, die in het medium aanwezig zijn, n.l. de opgeloste bacteriebestandeelen, de bacterietoxinen, de lysinen van den bacteriophaag, de antilysinen der bacteriën. Door middel van glycerine kan men den bacteriophaag dooden. Spuit men dan met de rest een dier in, dan treedt na een incubatietijd immuniteit op, even sterk als die volgende op een injectie van een gewone bacteriophagencultuur. Dus de bacteriophaag zelf is niet de

oorzaak der homogene immuniteit, maar de opgeloste stoffen in het medium, of de gedoode ultramicroben, spelen bij het ontstaan ervan een rol. Daar men door overspuiten de immuniteit kan overbrengen op een ander dier, moet er in het bloed iets zijn gevormd, dat de immuniteit veroorzaakt. Proeven met dysenterie, wijzen er op dat dit antilichaam een antitoxine is. Een door Shigabacteriophaag opgeloste cultuur is eenige dagen na de lysis nog erg toxisch, evenals ieder dysenteriecultuur levend of gedood. De afbraak schijnt echter door te gaan, want na een maand is alle toxiciteit verdwenen. Een cavia, ingespoten met een bacteriophagencultuur, die een maand oud is, sterft niet, doch verkrijgt immuniteit; na 6 dagen is hij ongevoelig voor een 2 maal doodelijke dosis gedoodde Shiga bacillen, die door hun toxische werking juist den dood der cavia veroorzaken.

d' Herelle meent dan ook dat de organische immuniteit berust op antitoxinen.

Tot nu toe nam men aan dat immuunserum door middel van verschillende antilichamen werkte. Vooreerst het antitoxine, dat de ectotoxinen der bacteriën zou neutraliseeren. De bacteriën zelf zouden echter op verschillende manieren worden bestreden, waarbij verschillende antilichamen een rol spelen, n.l. aglutininen, bacteriotropinen en opsoninen en tenslotte bacteriolysinen. Men zag n.l. dat serum van dieren, ingespoten met soortvreemde roode bloedcellen een thermostabiele stof, bevatte, die met behulp van een thermolabiele stof, in ieder normaal serum aanwezig, in staat was roode bloedcellen van dezelfde diersoort waarvan de ingespoten roode bloedcellen afkomstig waren, op te lossen. Dit verklaarde men door twee stoffen aan te nemen, de eene het z.g. complement = alexine, een thermolabiel ferment, in ieder normaalserum aanwezig, dat echter pas de roode bloedcellen op zou kunnen lossen bij aanwezigheid van een specifiek antilichaam, dat als ware de roode bloedcellen geschikter maakt voor de inwerking van het ferment. Vandaar de naam substance sensibilatrice = fixateur = amboceptor. Dit specifiek antilichaam is thermostabie

d.w.z. het kan tegen verhitting op 58° C. Door middel van de complementbindingsreactie toonde *Bordet* aan, dat wanneer een bepaalde bacteriesoort gebracht werd bij serum van een dier dat voorbehandeld was met die bacteriesoort, complement gebonden werd. Naar analogie van de lysis der roode bloedcellen door binding van complement nam men aan, dat wanneer complement aan bacteriën gebonden werd, deze ook opgelost zouden worden, hoewel men dat nooit gezien heeft. Integendeel serum van hooggeimuniseerde dieren bevat dikwijls bacteriën waartegen het juist sterk werkzaam zou moeten zijn (b.v. vlekziekteserum).

De nauwe samenhang tusschen de toestand van een patiënt lijdende aan een infectieziekte en de activiteit van den bacteriophaag tegenover de oorzaak der infectie, geeft *d'Herelle* aanleiding tot de meening, dat de bacteriophaag een rol speelt bij de verdediging van het lichaam tegen bacteriën, temeer waar hij in vitro zoo sterk bacteriolytisch werkt. De proeven bij Kleïnsche ziekte en bij haemorrhagische septichaemie bevestigen dit. Voor het verkrijgen van een organische immuniteit is een zekere incubatietijd noodig. Tijdens die incubatietijd bezit het lichaam dus geen verdedigingsmiddelen. De bacteriophaag zou die rol overnemen en de bacteriën vernietigen. De bij de oplossing der bacteriën overblijvende bacteriebestanddeelen zijn geschikt de lichaamscellen aan te zetten tot de vorming van antilichamen, die na afloop der incubatietijd het lichaam verdedigen.

De bacteriophaag oefent zijn werking uit door middel van lysinen. Deze bezitten een sterke opsonische werking. Ze maken de bacteriën geschikt voor phagocytose. Door middel van de methode van *Wright* blijkt n.l. dat bij 37° na een bepaalden tijd een zeker aantal bacteriën in de leucocyten teruggevonden wordt. Doet men er bacteriophagenculturen bij, dan is dat aantal veel grooter. Waren de bacteriën resistent, tegen den bacteriophaag, dan is het aantal bacteriën in de leucocyten niet verhoogd. Dus de resistente bacteriën worden ook niet gephagocyteerd.

De bacteriophaag bezorgt dus indirect het lichaam een verdedigingsmiddel door de lysinen n.l. de phagocytose. Zijn de bacteriën echter resistent geworden tegen de lysinen, dan is het lichaam dus ontdaan van ieder verdedigingsmiddel en de bacteriën kunnen zich vrij ontwikkelen, tenzij het reeds tijd heeft gehad een organische immuniteit te verkrijgen. Daardoor wordt de pathogene werking als het ware geneutraliseerd en de pathogene bacteriën zijn geworden tot saprophyten. Na herhaalde inspuiting van bacteriophagencultuur zijn dus in het bloed antilichamen ontstaan. Deze kunnen zijn gevormd tegen 1e. de opgeloste bacteriebestanddeelen; 2e. de bacterie-ectotoxinen; 3e. de bacteriophaag; 4e. de lysinen van den bacteriophaag; 5e. de antilysinen der bacteriën. Al deze bestanddeelen zijn in een bacteriophagencultuur aanwezig.

Spuit men bij een dier eenige malen een dosis bacteriophagencultuur in, dan bevat het serum van dat dier, het z.g. antibacteriophagenserum, meerdere antilichamen.

1e. Antilichamen tegen de bacteriën. Dit zijn de aglutininen en specifieke amboceptoren. Beide zijn in het antibacteriophagenserum aan te toonen; de laatste door de complementbindingsreactie van *Bordet*. Beide worden dus door het lichaam even goed gevormd tegen de bestanddeelen der bacteriën, als tegen de intacte bacteriën zelf.

2e. Antitoxinen. Deze moeten het toxine der bacteriën neutraliseeren, dus proefdieren ingespoten met een doodelijke dosis bacterietoxine, of gedoodde cultuur, moeten blijven leven, als men tevens antibacteriophagenserum inspuit. Dit is echter niet het geval. De proefdieren stervcn eerder dan de controles, dus het serum heeft ze gevoeliger gemaakt. Mochten antitoxinen bestaan, dan worden ze in het antibacteriophagenserum overheerscht door een sensibilisine.

3e. Antilichamen tegen den bacteriophaag. Aglutinatie van bacteriophagen is moeilijk absoluut te bewijzen, maar toch wel waarschijnlijk, daar men in een buis, waarin bacteriophagencultuur en antibacteriophagenserum gedaan

wordt, na eenigen tijd bij 37° te zijn geweest, door uit te strijken, op den bodem meer ultramicroben kan aantoonen, dan in het bovenste deel.

Het aantoonen van een specifieke amboceptor voor den bacteriophaag gaat met moeilijkheden gepaard. In het antibacteriophagenserum zit n.l. ook een amboceptor voor de bacteriën, dus bij een eventueele binding van complement weet men niet, aan welk antigeen dit is gebonden. Neemt men echter een andere bacteriephagenstam, virulent voor een andere bacteriesoort, dan is daarin geen antigeen, dat de amboceptor tegen de bacteriebestanddeelen der eerste bacteriophagencultuur kan binden. Is dan toch de complomentbinding positief, hetgeen *d' Herelle* heeft aangetoond, dan bewijst men daarmee het bestaan van een amboceptor voor den bacteriophaag en verder de eenheid van den bacteriophaag.

4e. Antilichamen tegen de lysinen van den bacteriophaag. Het bestaan hiervan is aan te toonen, door bij een suspensie van bacteriën, waarbij bacteriophagencultuur is gedaan tevens antibacteriophagenserum te brengen. Dan treedt geen lysis op, de bacteriën ontwikkelen zich normaal en men kan geen openingen aantoonen. De lysinen van den bacteriophaag zijn geneutraliseerd. Na eenige dagen echter treedt toch lysis op. Dat zijn alle antilysinen als het ware gebonden en de nieuw geproduceerde lysinen kunnen weer de bacteriën op gaan lossen.

Bij de immunisatie met een enkele injectie van bacteriophagencultuur, dus bij de homogene immuniteit vindt men enkele antilichamen terug. De antitoxinen zouden echter de dragers der homogene immuniteit zijn.

De opvatting van *d' Herelle* komt dus hierop neer, dat de bacteriophaag het organisme verdedigt in tijd, wanneer er nog geen immuniteit is, met behulp der phagocyten, die daarvoor echter de lysinen van den bacteriophaag noodig hebben. De producten die ontstaan bij het oplossen der bacteriën, zetten de lichaamscellen aan tot de vorming van immuun-

stoffen, waarschijnlijk antitoxinen, die dan verder het lichaam beschermen tegen binnendringende bacteriën.

In zijn tweede werk, „les defences de l' organisme" en de omwerking daarvan in „Immunity in natural infectious disaeses", onderwerpt *d' Herelle* de geheele immuniteit aan een nadere beschouwing.

Vooral van belang is de reactie van een organisme op parenteraal in het bloed gekomen eiwit en vooral bacterieeiwitten. Alle tot nu toe bekende antilichamen, door het organisme gevormd, beschouwt *d' Herelle* als indentiek. Praecipitine aglutinine, specifieke amboceptor en anaphylactische amboceptor zouden allen hetzelfde antilichaam zijn, n.l. het flocculine of sensitisine, dat gevormd zou worden door de endotheelcellen.

Daarnaast staat dan het complement, dat niet een substantie is, maar een eigenschap, een zekere evenwichtstoestand in het bloed.

Bij de antigeen-antilichaam reactie zouden Hionen vrijkomen, die door de in het lichaam aanwezige bufferstoffen zooveel als noodig en mogelijk is zouden worden opgenomen. Die vrijgekomen Hionen zouden dan de aanleiding zijn tot de coagulatie van eiwitten en wanneer dit in sterke mate gebeurt zouden deze de zenuwuiteinden prikkelen, waardoor een plotselinge vasodilatatie optreedt. Op deze plotselinge verwijding van het bloedvatsysteem zijn n.l. alle symptomen van shock terug te voeren. Het z.g. anaphylotoxine, dat men aanneemt als te onstaan bij een tweede inspuiting van eenzelfde soortvreemd eiwit en dat voor ieder eiwit toch hetzelfde is, zou volgens *d' Herelle* geen bepaalde stof zijn, doch de vrijgekomen en niet door de bufferstoffen opgenomen Hionen.

Het antilichaam dat ontstaat bij inspuiting van bacteriën, zou dan niet zijn een verdedigingsmiddel van het organisme tegen bacteriën, maar een reactie op het bacterieeiwit en dit zou voor het organisme niet beschermend werken, maar het juist erg gevoelig maken voor een volgende inspuiting van hetzelfde bacterieeiwit, n.l. door de optredende anaphylactische reactie.

Bij de verdediging tegen microorganismen moet het lichaam dus beschikken over andere middelen. Dit zijn vooreerst de exogene verweermiddelen als b.v. de zure maaginhoud, het door de slijmvliezen geproduceerde mucine, dat fermentwerking en inwerking van bacterieproducten remt, enz.

Wanneer eenmaal bacteriën zij binnengedrongen, kunnen deze al of niet toxisch zijn voor het lichaam. In het laatste geval is het lichaam ongevoelig en worden de bacteriën geëlimineerd door de phagocyten. In het eerste geval is het lichaam gevoelig voor de infectie en zijn sterkere verweermiddelen noodig. Dit zou dan de bacteriophaag zijn en met behulp van de lysinen van den bacteriophaag de phagocyten.

Is de bacterie echter toxisch, dan ontstaat in het lichaam een antitoxine en zoodoende een immuniteit van vrij langen duur. Ook hierbij speelt dus een bacteriophaag een rol, n.l. door de lysis der bacteriën brengt hij de bestanddeelen ervan in een staat, zeer geschikt om de vorming van antitoxinen te bewerken.

Tenslotte bespreekt *d' Herelle* de contagiositeit van een aantal infectieziekten, waarbij hij tot de conclusie komt, dat er 3 soorten van ziekten zijn:

1e. Ziekten, overgebracht door insecten.

2e. Ziekten, die erg contagieus zijn en schijnbaar veroorzaakt worden door bekende bacteriën, maar die, wanneer men ze experimenteel opwekt, door injectie of infectie van die bacteriën, niet contagieus zijn. Hier zou een onzichtbaar agens de dieren gevoelig maken en daarna zouden secundair de bacteriën binnendringen en de infectie veroorzaken.

3e. Ziekten, veroorzaakt door een onzichtbaar agens. Deze zijn in het algemeen erg contagieus en ook hier komen secundaire infecties voor. Het binnendringen van het virus veroorzaakt hier echter in tegenstelling met de vorige groep, op zichzelf reeds een ziekte. In deze groep zijn dan ook de experimenteele infecties contagieus.

Aan deze laatste ziektegroep, veroorzaakt door filtreerbare

virus, wijdt *d' Herelle* een groot hoofdstuk. Na een opsomming van een groot aantal verschillende virus, gaat hij de eigenschappen, de isolatie en het kweeken ervan na, om tenslotte te komen tot een classificatie waarbij hij voorstelt, deze groep van microorganismen, die onderaan zou staan in planten- en dierenrijk, te noemen: „protobios".

Als eerste noemt hij dan Protobios bacteriophagus, de parasiet der bacteriën. Dan volgt Protobios mozaicus, de parasiet der planten n.l. oorzaak der mozaikziekte der tabak en tenslotte een aantal soorten die parasiteeren bij mensch en dier, b.v. Protobios pestiavis, oorzaak der vogelpest, Protobios variolae, oorzaak van variolasoorten bij mensch en dier, Protobios lyssae, oorzaak der hondsdolheid, enz.

Daarna bespreekt hij de immuniteit bij de virusziekten. Vooral de cellen worden daarbij aangetast en daarin zou zich het virus vermenigvuldigen. Eerst daarna zou het in het bloed komen.

Juist de aangetaste cellen zouden ook de vormers der immuunstoffen zijn. Bij de virusziekten ontwikkelt zich n.l. een zeer sterke immuniteit. Bloed van immune menschen of dieren neutraliseert in vitro het virus. In het bloed zijn dus immuunstoffen ontstaan. *d' Herelle* noemt dit het antiviruline, dat door de aangetaste cellen zou worden gevormd.

In het geheel neemt hij dus drie antistoffen aan, het sensibilisine, het antitoxine en het antiviruline. Alle drie zouden echter hetzelfde proces veroorzaken, n.l. een flocculatie, een uitvlokking. Terwijl het antitoxine en het antiviruline het lichaam beschermen, zou het sensibilisine juist het omgekeerde doen, n.l. door de optredende anaphylaxie het leven in gevaar brengen.

Hoewel het tweede werk van *d' Herelle* meer algemeene immuniteitsbegrippen behandelt, heb ik toch gemeend, in verband met de groote rol die de bacteriophaag daarbij speelt, ook hiervan een kort overzicht te moeten geven.

Voor verdere bijzonderheden kan ik beide werken ten zeerste aanbevelen, vooral het laatste, dat door Smith genoemd wordt „A fresh, vigorous, presentation of new data".

B. Resultaten van andere onderzoekers

Na de ontdekking van den bacteriophaag is daarover reeds een groote litteratuur ontstaan. Waar uit expermenten van *d' Herelle* duidelijk de therapeutische waarde van den bacteriophaag bleek, is toch daaromtrent in verhouding tot het groote aantal onderzoekingen omtrent eigenschappen en in verband daarmede het wezen van den bacteriophaag, nog niet veel meer bekend dan reeds door *d'Herelle* gepubliceerde resultaten.

De experimenten van *d'Herelle* met sceptichaemia haemorhagica geven resultaten welke grenzen aan het ongelooflijke. Veertien maanden na een enkele injectie van 0.25 cc. van den bacteriophaag bleken 66 % der ingespoten buffels nog immuun voor een 500 maal doodelijke dosis ovale bacillen cultuur en van duizenden buffels onder leiding van Le Louet in Cochin China op deze wijze geimmuniseerd, is na 2 jaar nog geen enkele aan haemorrhagische sentichaemie gestorven.

Naast deze homogene of endogene immuniteit, welke eigenlijk berust op een soort vaccinwerking, staat de heterogene of exogene immuniteit, die gekenmerkt is door zijn snelle werking, zoo, dat enkele dagen na de inspuiting, de ziekte genezen is.

Heel duidelijk blijkt dit uit de resultaten van *d'Herelle* met Kleinsche ziekte bij kippen. Na inspuiting van $^1/_2$ cc. van den Kleinsche ziekte bacteriophaag of het ingeven daarvan, hield de ziekte direct op in 25 verschillende gevallen, samen 2000 dieren, terwijl in de omgeving in de niet behandelde koppels de ziekte gewoon doorging. Bij de behandeling van 100 zieke kippen bleek dat de dieren die het hoogtepunt der ziekte nog niet bereikt hadden, door toediening van den bac-

teriophaag per os of door subcutane injectie in ± 90 % der gevallen nog genezen konden worden.

Bij dysenterie van den mensch had *d' Herelle* door ingeving van bacteriophaag succes in 7 gevallen. 24 tot 36 uur na het ingeven van den bacteriophaag was de faeces niet meer bloederig en werden de patiënten reconvalescent.

Da Costa Cruz en *Mc Kinley* kregen dezelfde resultaten. Alleen in enkele gevallen was een tweede toediening van den bacteriophaag noodig. Aan verschillende instituten in Amerika worden dan ook reeds bacteriophagen culturen verstrekt voor gebruik in de practijk.

Otto, Munter, Winkler en *Davisson* kregen na intramusculaire injectie, of toediening per os of per anum van bacteriophaag daarentegen geen gunstig resultaat. *d' Herelle* schrijft dit toe aan het gebruik van te weinig virulente bacteriophaag.

Typhus van den mensch geeft voor behandeling met bacteriophaag moeilijkheden, omdat het ten opzichte van den bacteriophaag een heterogene bacteriestam is. *d' Herelle* deelt mede dat hij een bacteriophagenstam geïsoleerd heeft die voor 80 % bij typhusstammen virulent is en *Wolff* en *Janzen* gebruikten voor hun proeven een mengsel van 2 bacteriophagenstammen die samen alle typhusstammen oplosten.

Beckerich en *Hauduroy* hadden in 6 van 8 behandelde typhusgevallen een gunstig resultaat met ingestie of subcutane injectie van bacteriophaag waarbij een zweet- en temperatuurscrisis optrad.

Allessandrini en *Doria* kregen in 9 van de 18 behandelde gevallen snel genezing, in de andere 9 gevallen evenals *Beckerich* en *Hauduroy* in 2 gevallen, niet het minste effect. *Herderschee* en *Wolff* vonden procentsgewijze bij 105 patiënten die met typhusbacteriophaag 2 of 3 maal kort na elkaar waren ingespoten een iets geringer aantal sterfgevallen dan bij niet met bacteriophaag behandelde. Invloed op de temperatuurscurve, zooals *Beckerich* en *Hauduroy* beschrijven werd door

hen niet waargenomen. Van sneller genezing, dan niet met bacteriophaag behandelde patiënten was geen sprake en ook het aantal recidiven leverde geen verschil op, zoodat zij tot de conclusie komen dat de practiseerende geneesheer geen fout begaat, wanneer hij voor de behandeling van typhusgevallen geen gebruik maakt van bacteriophagentherapie.

In een aantal gevallen is er dus, zooals *d' Herelle* zelf reeds zegt, absoluut geen werking van den bacteriophaag te constateeren, zonder dat daar tot nog toe eenige verklaring voor gegeven is.

Appelmans behandelde typhusbacillendragers met bacteriophaag die in staat was de bacillen, uit de ontlasting der dragers geïsoleerd, op te lossen. Deze verdwenen daardoor echter niet uit de faeces, de behandelde personen bleven dragers.

Ook in enkele gevallen van paratyphusinfectie bij den mensch, werd genezing verkregen door behandeling met paratyphusbacteriophaag.

Paratyphus bij varkens kon door *Miessner* en *Baars* door subcutane injectie van virulenten paratyphusbacteriophaag in ieder geval niet snel genezen worden. Of er eenige werking was is door hen nog niet uitgemaakt.

Subcutane inspuiting van paratyphusbacteriophaag bij muizen voor of na de injectie eener doodelijke dosis paratyphuscultuur had niet het minste effect.

Ook door intraperitoniale injectie van bacteriophaag en cultuur kon *Appelmans* geen gunstig resultaat verkrijgen.

Ook in gevallen van coliïnfecties als pyelonephritis, pyelocystitis en cholecystitis werden door *d' Herelle*. *Hauduroy* en *Philibert* gunstige resultaten waargenomen na subcutane injectie van virulente colibacteriophaag. *d' Herelle* beschrijft een geval van colicystitis, waarbij subcutane injectie van bacteriophaag niet het minste resultaat gaf, maar 5 dagen na uitspoeling der blaas met sterk verdunde bacteriophaag was de urine steriel, dus de cystitis genezen. Hieruit blijkt de groote invloed van de wijze van toediening van den bacteriophaag.

De eerste onderzoekingen omtrent bacteriophagentherapie bij staphylococcenaandoeningen werden verricht door *Bruynoghe* en *Maisin*, maar later vooral door *Gratia*, die erin slaagde een polyvalenten bacteriophaag te isoleeren voor alle staphylococcenstammen, zoowel albus als aureus. In 15 gevallen van furunculosis, subcutane abcessen, folliculitis, spoot hij in de omgeving van het proces driemaal in 48 uur de staphylococcenbacteriophaag in, met gunstig resultaat. Op de injectieplaatsen ontstond roodheid en zwelling en het leek alsof het proces verergerde. Ook de pijn nam toe. Na 24 tot 36 uur nam deze echter snel af, de roodheid verdween, het aangetaste huiddeel werd zachter, enz. In een woord snelle genezing trad op. *Bruynoghe* en *Maisin*, *Hauduroy*, *Appelmans* en *d' Herelle* kregen dezelfde resultaten. *Bastin* had soms succes, in enkele gevallen echter niet.

Ook bij de behandeling van wonden, geïnfecteerd met staphylococcen kreeg *Mc. Kinley* gunstige resultaten. Nadat door openleggen en goede afvloeiïng geen genezing optrad en in groote hoeveelheden stinkende etter werd afgescheiden, werd korten tijd na elkaar in en om den wond driemaal staphylococcenbacteriophaag ingespoten. De afscheiding der etter hield op en daarna genas de wond spoedig.

Appelmans kon door subcutane injectie van staphylococcenbacteriophaag zelfs het optreden van abcessen ten gevolge van inspuiting van staphylococcen voorkomen.

Ook in enkele gevallen van streptococceninfecties werden gunstige resultaten verkregen met injecties van streptococcenbacteriophaag. *Piorkowski* beschrijft een streptococcenbacteriophaag die in staat was bouillonculturen op te helderen en die ook in vivo gunstige resultaten gaf. *Otto* en *Munter* slaagden er niet in, een streptococcenbacteriophaag te isoleeren en op grond daarvan en omdat de protocollen van *Piorkowski* niet gepubliceerd zijn, trekken *Miessner* en *Baars* zijn resultaten in twijfel, vooral ook omdat geen plages beschreven worden, als bewijs voor de aanwezigheid van den bacteriophaag.

Bij vlekziekte der varkens beschrijven *Miessner* en *Baars* proeven met den bacteriophaag. Bij muizen spoten ze subcutaan 0.5 cc. vlekziektebacteriophaag in en 1, 3, en 6 dagen daarna een doodelijke dosis vlekziektecultuur. Alle dieren stierven, evenals de contrôles en er was geen werking van den bacteriophaag te constateeren. Bij een tweede proef werden 6 muizen ingespoten met 1 cc., vlekziektebacteriophaag en 1, 2 en 13 weken daarna met een doodelijke dosis cultuur. Ook toen was er geen verschil met de contrôles.

2 muizen gelijktijdig met bacteriophaag en cultuur ingespoten stierven even spoedig als de contrôlemuizen. Dus geen heterogene en geen homogene immuniteit.

Verder vermelden zij nog, dat 2 muizen, die werden ingespoten met absoluut heldere bacteriophagencultuur, waarin door uitstrijken op agar geen bacteriën meer konden worden aangetoond, toch stierven aan vlekziekte, terwijl als de culturen eerst door een bacteriekaars waren gefiltreerd, dit niet het geval was.

Bij de beschrijving van eenige door mij herhaalde proeven kom ik nader op deze resultaten terug.

Tenslotte beschrijft *Meyer* proeven met filtraat van faeces van plotseling snel genezen koeien, die leden aan mond- en klauwzeer. Hij meent daarbij de werking van bacteriophagen aan te mogen nemen. In een overzicht der litteratuur meen ik daarom ook deze resultaten te moeten vermelden.

Hoewel *d' Herelle* bij de bespreking der virusimmuniteit deze toeschrijft aan een specifiek antilichaam, het antiviruline gevormd door de aangetaste lichaamscellen, lijkt het mij evenwel niet onmogelijk, dat dit niet het eenige verdedigingsmiddel van het organisme is. Evenals bij de bacteriën kan ook hier naast een endogene immuniteit een exogene immuniteit bestaan, toe te schrijven aan een bacteriophagenwerking.

In dit geval zou dus een virus opgelost worden door een ander virus, of men moet aannemen, dat het mond- en klauwzeervirus tot de bacteriën behoort, hetgeen *Frosch* en

Dahmen meenen te hebben aangetoond (Loeffleria Nevermanni).

De door *Meyer* aangevoerde feiten, dat tijdens een mond- en klauwzeer-epizootie dikwijls dieren opvallend snel genezen, dat de ziekte aan het einde eener epizootie steeds milder gaat verloopen, dat men dikwijls temidden van zieke koppels volkomen gezonde dieren vindt, dat de ziekte, wat de uitbreiding ervan betreft steeds zeer grillig verloopt, kunnen door het aannemen van een bacteriophaag zeer goed worden verklaard, wat echter andere verklaringen niet uitsluit.

Het somtijds plotseling optreden eener opvallende beterschap is mijns inziens het beste argument voor een bacteriophagenwerking.

Door uitpersen en filtreeren door een bacteriekaars van faeces van dieren die snel zijn genezen, verkrijgt *Meyer* het filtraat dat dan den bacteriophaag zou bevatten. Hoewel hij bij zijn proeven dit filtraat verwarmde tot 58° à 65° C. om daardoor het virus te dooden, meent hij dat dit bij verdere proeven niet noodig is. In tegenstelling daarmee acht ik juist verwarming van het filtraat van het grootste belang. Het feit n.l. dat bij andere ziekten zich herhaaldelijk gevallen voordoen, waarbij de bacteriën resistent worden tegen den bacteriophaag, zal zeer zeker ook bij het mond- en klauwzeer voorkomen. Dan zou men dus, wanneer men niet verwarmt, virus inspuiten, dat resistent is tegen den bacteriophaag en zoodoende het mond- en klauwzeer verspreiden. Al meent men dat plotseling beterschap optreedt bij een dier, lijdende aan mond- en klauwzeer, dan is het toch zeer goed mogelijk, dat een enkele maal de ziekte van het dier weer verergert, doordat het virus resistent wordt, of de virulentie van den bacteriophaag achteruit gaat. Vooral de sterk wisselende samenstelling der faeces, waarin behalve verschil in zuurgraad, zeer goede stoffen kunnen voorkomen die de werking van den bacteriophaag remmen, maken dit alles zeer goed mogelijk en zijn daardoor een tweede argument tegen het niet verwarmen. Al zal het misschien uitzondering zijn, de theoretische mogelijkheid van vermindering der virulentie van den bac-

teriophaag maar vooral de vorming van resistent virus, pleit mijns inziens sterk voor de noodzakelijkheid van verwarming van het filtraat, om zoodoende het mond- en klauwzeer virus te dooden en daarmee tenminste verspreiding van mond- en klauwzeer tengevolge van inspuiting van het filtraat tegen te gaan. Dit temeer daar men in het geval dat het virus resistent zou zijn geworden een zeer virulenten vorm van het mond- en klauwzeer zou verspreiden.

Bij bestudeering der beschreven gevallen moet men tot de conclusie komen, dat in een aantal gevallen na inspuiting van filtraat een opvallend snelle genezing optrad.

Verder zijn zeer zeker na inspuiting van het filtraat een vrij groot aantal dieren vrijgebleven van de ziekte. Uit ervaring weet ik hoe moeilijk het is, in de practijk voldoende gegevens te verkrijgen, maar vanwege het groote belang, waren hier meer bijzonderheden omtrent leeftijd en vooral omtrent de herkomst der dieren (of en wanneer deze vroeger mond- en klauwzeer hebben gehad) zeer gewenscht. Daarvan zal het n.l. afhangen of men het vrijblijven van een aantal dieren kan verklaren door een andere immuniteit, dan die welke een gevolg is van bacteriophagenwerking.

Tengevolge van het ontbreken van een methobe om het mond- en klauwzeervirus met zekerheid te kweeken, is een absoluut bewijs voor het bestaan van een mond- en klauwzeerbacteriophaag voorloopig niet te brengen en alleen door het bijeenbrengen en van een aantal argumenten, die wijzen op een bacteriophagenwerking, zal men een waarschijnlijksheidsbewijs kunnen leveren.

Een aantal onderzoekers heeft dus succes met de behandeling van infecties met bacteriophaag, anderen echter niet.

Zdansky meent dat het nog lang niet bewezen is, dat de bacteriophaag bij een eventueel succes, de oorzaak daarvan is. Hij wijst erop, dat zooals *d'Herelle* zelf de homogene immuniteit bij hæmorrhagische sceptichæmie bij buffels verklaart als zijnde een soort vaccinwerking, dit ook bij een aantal

andere ziekten het geval zou zijn. De directe snelle genezende werking van den bacteriophaag o. a. zeer duidelijk bij Kleinsche ziekte der kippen. is m. i. toch moeilijk als vaccinwerking op te vatten.

Zdansky meent dat aan een aantal voorwaarden, noodzakelijk voor de werking van den bacteriophaag in het warmbloedig organisme moeilijk kan worden voldaan.

Vooreerst de sterke verdunning. Volgens *Doerr* en *Grüninger* moeten om lysis van alle bacteriën te verkrijgen, een groot aantal lysinen, zooals zij de bacteriophagen noemen, aanwezig zijn en daarvoor is eerst een groot aantal bacteriën noodig. *Zdansky* meent dat bij de aanwezigheid van een dergelijk aantal bacteriën, het organisme reeds lang dood zou zijn.

Bordet en *Gratia* vonden dat bij aanwezigheid van een gering aantal bacteriophagen bij een groot aantal bacteriën, de ontwikkeling van resistente bacteriën in de hand wordt gewerkt. Reeds in vitro zijn er slechts weinig bacteriophagen waarbij zich geen resistentie bacteriën ontwikkelen en *Doerr* en *Grüninger* toonden aan, dat in het warmbloedig organisme dit nog gemakkelijker gebeurt. Zij brachten bij een konijn colibacillen in de galblaas en eenige dagen later spoten ze intraveneus een bacteriophaag in, die in staat was, die colistam absoluut op te lossen, zoodat zich geen secundaire cultuur ontwikkelde. Toch verdwenen de colibacillen niet uit de galblaas en het bleek dat een groot aantal ervan resistent was geworden.

Doerr en *Berger* toonden aan, dat colloiden de vermeerdering van den bacteriophaag niet remmen maar wel de lysis der bacteriën. *Zdansky* vond dat in serum de lysis langzamer verliep dan in een bouillonvoedingsbodem en dat wanneer zich in serum secundaire culturen ontwikkelen, dit in bouillon dikwijls uitbleef. De resistente bacteriën uit dit serum bleken echter in bouillon niet resistent te zijn. Hij meent dan ook de resistentie samenhangt met het milieu. Alleen in eiwitarme omgeving zou de bacteriophaag beschermend voor het organisme kunnen werken. Volgens *Bolle* zou de grootere viscositeit van het eiwitrijke serum hiervan de oorzaak zijn.

Ook *Miessner* meent op grond van zijn proeven met vlekziekte, dat colloiden in het lichaam de werking van den bacteriophaag remmen.

Om bij een overzicht der litteratuur over de rol van den bacteriophaag in de immuniteit volledig te zijn moet ik nog wijzen op enkele mededeelingen omtrent schadelijke gevolgen van inspuitingen van den bacteriophagencultuur.

d' Herelle vond, dat sommige opgeloste bacterieculturen kort na de lysis erg toxisch waren, maar een maand later al hun toxische eigenschappen verloren hadden. De lysis zou dus na de opheldering der culturen nog eenigen tijd doorgaan.

Bruynoghe en *Maisin* zagen na inspuiting van typhusbacteriophaag locale ontstekingsverschijnselen en koorts. *Appelmans* zag koorts en oedeem op de plaats van inspuiting. Na verhitting op 70° C. bleef de toxiciteit bestaan. *Gratia* en *Jaumain* schrijven het daarom toe aan de bacterieproducten.

Anderen echter zagen geen enkele reactie van de inspuiting van bacteriophaag.

HOOFDSTUK III

EIGEN ONDERZOEKINGEN

A. Kleinsche ziekte

a. Beschrijving der ziekte

Kleinsche ziekte, ongeveer 1890 door *Klein* het eerst onderkend, is pas in 1906 in ons land voor het eerst gediagnostiseerd en sindsdien van groot belang geworden voor de kippenfokkerij.

Werd in het begin onder den naam Kleinsche ziekte alleen verstaan een sterfte onder oude kippen, later werd vooral ook een veel voorkomende sterfte onder kuikens ertoe gerekend. Deze laatste is vooral in Amerika reeds lang bekend, waar als oorzaak beschreven werd de bacillus Pullorum. Daarnaast zou dan de bacillus Gallinarum de typische Kleinsche ziekte der oudere kippen veroorzaken.

Van Amerikaansche zijde wordt een cyclus beschreven, volgens welke onder kippen dragers van pullorumbacillen in het ovarium zouden voorkomen. Een gedeelte der eieren van dergelijke kippen zou besmet zijn en bij bebroeden daarvan, zou reeds een groot aantal niet uitkomen. De kuikens die wel uitkomen, zouden besmet ter wereld komen en op deze wijze zou onder de pas geboren kuikens sterfte optreden Een aantal zou in leven blijven en later de dragers worden.

Naast de bac. Gallinarum en de bac. Pullorum, welke laatste nog weer onderverdeeld wordt in twee verschillende soorten (Pul. A en B), worden van Amerikaansche zijde nog enkele andere soorten beschreven als oorzaak van diarrhee bij kippen

(bacillus Pfaffi, Rettgeri en Jeffersoni). Het geheel wordt echter samengevat als Kleinsche ziekte.

Hadley wijst op de overeenkomst met de tyhusachtige ziekten van den mensch, waar naast de echte typhusbacillen ook andere typhusachtige bacillen als oorzaak zijn aangetoond, die er alleen in zuur- en gasvorming van verschillen.

Ook de verschillende als oorzaak der Kleinsche ziekte beschreven bacillen zijn alle Gram negatieve staafjes, die op agar middelmatig groote scherp omschreven grijswitte koloniën vormen en alleen in zuur- en gasvorming verschillen.

De uit de kuikens geïsoleerde pullorumculturen zijn op agar meestal veel dunner gegroeid en de koloniën veel kleiner, zoo zelfs, dat ze af en toe gelijken op vogelcholeraculturen. De bacteriologische diagnose geschiedt vooral door aglutinatie met Kleinsche ziekte serum. Ook met paratyphus- en soms met typhusserum is in niet te sterke verdunningen de reactie dikwijls positief, hetgeen naast andere eigenschappen de verwantschap der Kleinsche ziekte bacteriën met de bacteriën der typhus-paratyphusgroep bewijst.

Wat de pathogeniteit der bacteriën betreft, deelen *Van Straaten* en *Ten Hennepe* mede, dat infectieproeven bij kippen zeer ongelijk verloopen. Door herhaalde passage door muizen verkregen ze een cultuur, waarvan een zeer kleine dosis constant muizen doodde.

Teneinde een stam te krijgen die geregeld muizen doodt, om zoodoende de preventieve of curatieve waarde van den bacteriophaag te bepalen heb ik een groot aantal malen Kleinsche ziekte culturen bij muizen ingespoten. Ik ben er echter niet in geslaagd, op welke wijze dan ook, een Kleinsche ziekte cultuur zoo virulent te krijgen, dat muizen geregeld stierven.

De ziekte komt gedurende het geheele jaar geregeld voor, hoewel door slechte voeding, de slechte hygiene der hokken, de ruitijd, in een woord door alle mogelijke verzwakkende omstandigheden de vatbaarheid verhoogd wordt. De ziekte komt vooral voor in de streken met intensieve kippenhouderij.

Zeer weinig, misschien in het geheel niet in Friesland en

Groningen. Men moet zoowel een acuut als een chronisch verloop onderscheiden. In het begin der ziekte is de sterfte meestal ongeveer 3 à 4 per dag. Langzamerhand neemt het getal sterfgevallen per dag af en de tijd dat de dieren ziek zijn wordt meestal langer. Dieren die eenmaal duidelijk ziek zijn genezen slechts zelden spontaan. Naast dit acuut verloop, dat langzamerhand chronisch wordt, komen ook gevallen voor, waarin de ziekte chronisch begint. Af en toe sterft een enkele kip en een enkele maal treedt een acute opflikkering op waarbij plotseling wat meer dieren sterven. Vermoedelijk betreft het hier de van een pulloruminfectie van kuikens overgebleven dragers, temeer daar de opflikkeringen in het chronisch verloop, waarbij dan meerdere kippen sterven, veelal samenvallen met de verzwakkende omstandigheden als ruitijd en begin der legtijd.

In het begin der ziekte zitten de dieren in elkaar en zijn ze traag en suf. Bij het voeren blijven ze op hun plaats, alleen drinken ze veel. Zoodra deze verschijnselen optreden is de faeces dun, groengeel en al spoedig zijn de veeren om de cloaca aaneengekleefd. Na ongeveer 2 dagen treedt de dood dan in. Als de ziekte eenigen tijd geheerscht heeft, wordt het geheele proces als het ware gerekt en krijgt men de subacute en chronisch gevallen.

De omvang der sterfte varieert, maar dikwijls blijven er van groote koppels op den duur maar weinig dieren over.

Bij de sectie is het meest typische de bronskleurige lever vooral als het cadaver eenigen tijd open is geweest. In een aantal gevallen ontbreekt dit symptoom echter, vooral bij de kuikensterfte. Een tweede vrij algemeen voorkomend verschijnsel is de catarrh van het darmslijmvlies en de slijmerige darminhoud over meer of minder groote uitgebreidheid. Vrij dikwijls moet men spreken van echte enteritis. Puntbloedingen in de darmmucosa en ook in hart en nieren komen voor. Meer echter een vrij sterke injectieroodheid der darm. Naast deze afwijkingen in acute en sub-acute gevallen vindt men in chronische gevallen witte haardjes in lever en hart en spieren,

vooral bij de kuikensterfte komen de haardjes in het hart dikwijls voor. Veelal is dat de eenige afwijking die macroscopisch bij de sectie gevonden wordt. Ook in de longen vindt men nog al eens dergelijke haardjes en ook echte pneumoniën.

Veranderingen van het ovarium vindt men alleen in chronische gevallen. Meer of minder groote dooiers met troebele inhoud, sommige getordeerd en daardoor verschrompeld en donker van kleur. Dikwijls is het ovarium geworden tot een groot conglomeraat. Hoe langer hoe meer krijg ik de overtuiging dat deze dieren, met de chronische veranderingen van het ovarium de van een kuikensterfte door pulloruminfectie overgebleven dragers zijn, vooral omdat ik erin geslaagd ben, uit eenige dezer veranderde ovaria een pullorum A cultuur te isoleeren, hetgeen mij in een acuut geval van Kleinsche ziekte nooit gelukt is.

May deelt mede dat bij kippen, ingespoten met pullorum A cultuur en na eenige dagen afgemaakt, de Pullorum A cultuur nog uit het ovarium is te isoleeren, en niet uit de andere organen, terwijl dit bij Pullorum B en Kleinsch ziekteculturen niet het geval is. Dus een sterke neiging van Pullorum A bacillen om naar het ovarium te gaan. Bij 2 kippen ingespoten met Pullorum A cultuur heb ik deze resultaten niet kunnen bevestigen, maar de ingespoten cultuur was reeds langen tijd geleden geïsoleerd en een groot aantal malen overgeënt op agar, zoodat de virulentie te gering was om hieruit eenige conclusie te trekken.

De bestrijding der ziekte geschiedt door vaccin, serum, hygiënische maatregelen en wat de Pulloruminfectie betreft, door het onderkennen der dragers.

In de practijk wordt alleen behandeling gevraagd in koppels waarin reeds ziekte heerscht. Dan worden de zieke dieren curatief en de dieren die nog niet ziek zijn, preventief met serum ingespoten. Dit serum wordt bereid bij paarden en in den laatsten tijd ook bij runderen, door herhaalde inspuitingen van stijgende doses Kleinsche ziekte cultuur. Daar bij die herhaalde injecties van cultuur vele dieren sterven, is de bereiding van het Kleinsche ziekte serum moeilijk.

Omtrent de curatieve waarde van het serum verschillen de meeningen. Na seruminspuitingen is echter meestal verbetering waar te nemen. Wordt echter verder in den koppel geen behandeling ingesteld, dan treedt veelal spoedig recidive op. Daarom wordt na de serumbehandeling aangeraden vaccin in te spuiten. Dit vaccin bestaat uit een gedoodde suspensie van bacillen, afgeschud van 18 uur oude agarculturen. Op deze wijze wordt veelal een gunstig resultaat verkregen. In den laatsten tijd wordt door dierenartsen zelfs serum en en vaccin gemengd ingespoten, ook met afwisselend gunstige resultaten.

Daarentegen zijn mij volgens mondelinge mededeelingen van Prof. de Blieck ook gevallen bekend, waar vaccineeren, zelfs tot driemaal toe, niet het minste resultaat gaf, zelfs autovaccinatie niet.

Wetenschappelijk goed gefundamenteerde gegevens, omtrent de bestrijding der Kleinsche ziekte zijn er echter zeer weinig.

Een voornaam middel ter bestrijding der kuikensterfte en daardoor van de chronische Pullorum ziekte met de veranderingen in het ovarium, is het bloed-onderzoek der kippen op de aanwezigheid van aglutininen. Eieren van dieren, waarvan het bloedserum een positieve aglitinatie geeft met Kleinsche ziekte cultuur, mogen niet voor broedeieren gebruikt worden. Wanneer men op deze wijze op een kippenhouderij 2 à 3 jaar achtereen de positief reageerende dieren uitschakelt van de fokkerij, zijn de broedeieren van de overgebleven kippen vrij van besmetting en zal geen kuikensterfte meer optreden. Deze laatste bestrijdingsmethode berust geheel op de van Amerikaansche zijde beschreven cyclus der infectie en de o.a. ook door bloedonderzoek, verricht aan het Instituut voor Parasitaire- en Infectie ziekten der Veeartsenijkundige Hoogeschool, verkregen gunstige resultaten bevestigen deze.

Bij een twintigtal kippen, waarvan het serum een positieve aglutinatie gaf, werd bij de sectie een meer of minder sterk veranderd ovarium gevonden hetgeen bovengenoemde opvatting ook bevestigt.

b. Werkwijze en isolatie van den bacteriophaag.

Zooals uit het overzicht der litteratuur is gebleken, meent *d' Herelle* dat het verloop der ziekte en der epizootie samenhangt met de verhouding van bacterie en bacteriophaag. Ten einde dit te onderzoeken, moet vooral de faeces onderzocht worden op de aanwezigheid van bacteriophaag. De methode door mij gevolgd om in faeces bacteriophaag aan te toonen, was die van *d'Herelle.*

De faeces werd gedurende een nacht bij 70° gezet. Den volgenden morgen eerst gefiltreerd door een papierfilter, daarna door een papierfilter dat door middel van uitgegloeide z.g. infusorienaarde minder doorlaatbaar was gemaakt en tenslotte door een bacteriekaars. Hiervoor werden gebruikt kaarsen van Chamberland L 3, die na gebruik uitgekookt werden, daarna in een oventje tot witgloeiend werden verhit en ten slotte, na gereed gemaakt te zijn voor het gebruik, nog eens gesteriliseerd in stoom.

Na deze bewerking is het mij nooit gelukt, in steriele bouillon die door de kaarsen gezogen was, een enkele bacteriophaag aan te toonen, hoe nauwkeurig daarbij ook te werk werd gegaan.

Wanneer op de bovenbeschreven wijze een bacteriënvrij filtraat was verkregen, werd de cultuur die voor het aantoonen van den bacteriophaag werd gebruikt, afgeschud met ongeveer 30 druppels steriele bouillon. Door middel van een groote öse werden met dit afschudsel der agarcultuur 4 buizen bouillon geënt, zoodat in iedere buis een kleine druppel cultuur kwam. Daarna kwamen bij de eerste aldus geënte buis 3 druppels van het te onderzoeken filtraat, bij de tweede 10 en bij de derde een dertigtal druppels. Bij de vierde buis werd geen

geen filtraat gedaan, deze diende als contrôlecultuur. Naast dezen 4 buizen werd altijd een vijfde genomen waarbij enkel filtraat werd gedaan. Deze zoogenaamde contrôle filtraat diende om aan te toonen dat het filtraat werkelijk bacterievrij was.

Wanneer een bacteriophaag aanwezig is, ziet men na korteren of langeren tijd een verschil in troebeling, 1, 2, of alle drie buizen waarbij filtraat is gedaan, is minder troebel dan de contrôlecultuur. Vooral als in het filtraat een bacteriophaag aanwezig is, die slechts weinig virulent is, ziet men dikwijls geen verschil in troebeling met de contrôlecultuur. Om een dergelijke bacteriophaag toch nog aan te toonen, raadt *d' Herelle* aan, uit die buizen, waarin macroscopisch geen bacteriophaagwerking is te zien, een weinig op een schuin gestolde agarbuis uit te strijken. Op agar zou die weinig virulente bacteriophaag dan nog in staat zijn enkele bacteriën meer direct aan te vallen, en zoodoende zouden nog kleine plages ontstaan. Mag dit bij dysenterie gelukken, bij het aantoonen van Kleinsche ziekte bacteriophaag ben ik er in geen enkel geval in geslaagd, op deze wijze op agar plages te krijgen.

In plaats van direct uit de bouillonculturen waarin de weinig virulente bacteriophaag aanwezig zou zijn, maar die geen verschil in troebeling geven met de contrôlecultuur, uit te strijken, filtreerde ik eerst die bouillonculturen weer en deed een weinig van het fitraat in verschillende verdunningen bij een suspensie van jonge bacillen en streek dan daaruit direct op agar uit. De suspensies verkreeg ik door van een afschudsel van een 24 uur oude agarcultuur zooveel bij een buis bouillon te doen, tot die even troebel was; $\pm$ $2^1/_2$ millioen bacteriën per cc. Deze dikte raadt ook *d' Herelle* aan. Op deze wijze hebben de bacteriën in geen geval gelegenheid, door aanwezigheid der weinig virulente bacteriophaag, resistent te worden. Op deze wijze, door uitstrijken, kon nog vrij dikwijls een weinig virulenten bacteriophaag worden aangetoond door het ontstaan van plages.

Ook al was in bouillon duidelijk te zien, dat de groei der bacteriën geremd werd, toch werd ook in die gevallen steeds

door middel van suspensies uitgestreken op agar om zoo de plages aan te toonen. In faeces komen namelijk volgens *Wolff* en *Janzen* en volgens *Eykman* dikwijls stoffen voor, die de normale bacteriegroei remmen en toch in geen verband staan met bacteriophaag. Daarom werd niet eerder de aanwezigheid van bacteriophaag aangenomen, dan nadat duidelijk plages waren aangetoond. Bij het onderzoeken van kippenfaeces is mij de aanwezigheid van dergelijke stoffen een enkele maal gebleken. Hoewel ik meende, in bouillon bacteriophagenwerking te zien kon ik geen plages aantoonen, en na filtratie der bouillonculturen en weer opnieuw onderzoeken van dit filtraat was de remmende werking verdwenen.

In een grooter aantal gevallen zag ik echter het omgekeerde. Bij het onderzoek van een groot aantal monsters kippenfaeces heb ik dikwijls opgemerkt, dat bij het eerste onderzoek absoluut geen bacteriophagenwerking was te constateeren in bouillon, terwijl tegelijkertijd daarbij gemaakte uitstrijken uit suspensies, waarbij hetzelfde filtraat was gedaan, duidelijk kleine plages vertoonden. Werden de bouillonculturen die geen verschil in troebeling vertoonden dan weer gefiltreerd en opnieuw onderzocht, dan bleek een vrij virulente bacteriophaag aanwezig te zijn. Het is dus, alsof in de faeces af en toe stoffen aanwezig zijn, die de bacteriophagenwerking remmen of de snelle ontwikkeling van resistente bacteriën begunstigen. Als een bron van fouten meen ik op dit feit te moeten wijzen.

Alvorens tot de aanwezigheid van bacteriophaag ten opzichte van een bepaalde cultuur te concludeeren, werd dus en in bouillon en op agar zijn werking nagegaan.

Alvorens de afwezigheid van een bacteriophaag ten opzichte van een bepaalde cultuur aan te nemen werd het filtraat 4 maal versterkt op de wijze die *d' Herelle* aangeeft. Wanneer namelijk in bouillon bij het eerste onderzoek op de bovenbeschreven wijze geen verschil in troebeling met de contrôlecultuur was waar te nemen, werden de bouillonculturen weer gefiltreerd en het filtraat op dezelfde wijze weer onderzocht.

Wanneer na 4 dergelijke versterkingen nog geen bacteriophaag was aan te toonen. noem ik hem *niet aantoonbaar.*

In een groot aantal gevallen isoleerde ik op bovenbeschreven wijze een bacteriophaag, werkzaam op alle Kleinsche ziekte en Pullorumstammen van het Instituut. Door enkele passages met een dezer culturen steeg de virulentie, hoewel in den aanvang dikwijls gering, steeds snel tot een zeker maximum, waarna op geen enkele wijze verdere verhooging kon worden verkregen.

Bij het begin mijner onderzoekingen waren door *Prof. de Blieck* twee bacteriophagenstammen geisoleerd, waarvan de eerste op alle Kleinsche ziekte en Pullorumstammen werkte, terwijl de tweede alleen Pullorum A stammen oploste. Ook deze Kleinsche ziekte bacteriophagen hadden een maximum virulentie, die niet verder verhoogd kon worden. In geen enkel geval gelukte het namelijk een zoodanige lysis van een cultuur of suspensie te verkrijgen, dat deze helder bleef. Steeds ontwikkelde zich na korteren of langeren tijd een secundaire cultuur. 3 druppels der virulentste bacteriophagenstammen losten een bacteriesuspensie, die iets troebel was in ± 3 uur op en na ± 15 uur begon zich weer een lichte troebeling te vertoonen, die dan snel in sterkte toenam.

Zooals *d' Herelle* beschrijft zijn de Kleinsche ziekte stammen homogeen, want de virulente bacteriophaag was in staat 40 verschillende Kleinsche ziekte en Pullorumstammen op te lossen, maar de tijd tusschen volkomen lysis en het zichtbaar worden der secundaire culturen, varieerde vrij sterk. Bij de standaardculturen van het Instituut was dit tijdverschil gering, maar bij culturen, direct uit een aan Kleinsche ziekte gestorven dier geisoleerd, trad de secundaire cultuur dikwijls reeds na 6 à 7 uur op. Over het algemeen dus bij pas geisoleerde culturen een grootere resistentie, dan bij culturen die reeds eenigen tijd op agar waren gekweekt.

Slechts in 1 geval was de werking van den bacteriophaag zwak, n.l. een suspensie van een cultuur, geisoleerd uit een aan het Instituut opgezonden kip werd niet geheel opgehelderd.

Kleine plages waren echter aan te toonen en na een zestal overentingen op agar was de werking van den bacteriophaag veel sterker. Hier had ik dus te doen met een vrij resistente cultuur, die echter door overenting op agar spoedig zijn resistente verloor. De koloniën verschilden in geen enkel opzicht van die van een normale Kleinsche ziekte cultuur.

Omgekeerd isoleerde ik af en toe uit aan Kleinsche ziekte of Pullorum gestorven dieren koloniën, die veel grooter en witter waren dan normale Kleinsche ziekte culturen, zelfs zoo dat men niet aan Kleinsche ziekte zou denken. Kleinsche ziekte serum gaf echter met bovengenoemde culturen een positieve aglutinatie en ook de bacteriophaag loste zeer duidelijk suspensies dezer culturen op. Het vermoeden, dat ik hier te doen had met resistente of gemengde culturen, was dus onjuist.

Typische resistente culturen, zooals *d' Herelle* deze beschrijft, met geaglutineerde groei in bouillon en slijmige koloniën op agar, heb ik echter nooit gezien.

Van Straaten en *Ten Hennepe* deelen in hun publicatie mede, dat een enkele maal mutaties voorkomen. Misschien hebben ze te doen gehad met gemengde culturen. Zij isoleerden n.l. uit muizen af en toe culturen bestaande uit koloniën met een doorschijnend centrum en een onregelmatige knobbelige rand, waarin bacillen voorkwamen, die kleiner en dunner waren dan normale Kleinsche ziektebacillen. Pathogeniteit en aglutinatie waren echter niet veranderd. Dit pleit weer tegen het aannemen van gemengde culturen.

---

c. Bereiding van het bacteriophagenvaccin voor de praktijk

In plaats van buizen bouillon worden voor dit doel kolven met 100 cc. Martinsche bouillon genomen, Deze werden geent met Kleinsche ziekte cultuur en daarna eenigen tijd bij 37° gezet, totdat ze iets troebel waren. Dan werd in iedere kolf 2 cc. van een hoogvirulenten bacteriophagenstam gedaan en het geheel bij 37° gezet, naast een contrôle filtraatbuis.

De bacteriesuspensies in de kolven bouillon groeiden steeds eenigen tijd door, maar werden dan snel opgelost door den bacteriophaag, zoodat de kolven geheel helder werden Na ± 10 uren begon zich de secundaire bacteriegroei te ontwikkelen. Op dat moment worden de kolven door een Chamberland L 3 kaars gefiltreerd in een z.g. „Abfüllapparat" van Uhlenhuth. Wanneer alle kolven waren gefiltreerd werd de inhoud van het Abfüllapparat steriel afgetapt in flesschen van 20—100 cc.

Het steriliseeren der „Abfüllapparaten" en het steriel aftappen der inhoud daarvan, gaat echter met groote moeilijkheden gepaard.

Daarom werd getracht, door middel van formaline 1 : 700 de in de kolven aanwezige secundaire bacteriegroei te dooden. Dit laatste ging zeer goed, maar door de formaline werd zelfs in deze verdunning den bacteriophaag vernietigd.

Ten slotte is nog getracht, door verhitten op 58° C. de secundaire bacteriegroei te vernietigen. Hoewel in vitro hierdoor de virulentie van den bacteriophaag niet verminderde, is in de practijk het op deze wijze bereidde bacteriophagenvaccin nog niet gebruikt.

---

d. De bacteriophaag in het verloop van de experimenteele infectie met bacillus gallinarum en bacillus pullorum

Om de rol van den bacteriophaag bij de bescherming van een organisme tegen een infectie na te gaan, heb ik bij een aantal kippen culturen ingespoten en bij latere experimenten per os gegeven en nagegaan wat er met den bacteriophaag gebeurde. Volgens *d' Herelle* moet de virulentie van den bacteriophaag samenhangen met de toestand van het geïnfecteerde dier. Dit was in het algemeen volkomen juist, zooals uit de volgende verslagen zal blijken.

Als maatstaf voor de virulentie, ter vergemakkeling der beschrijving, heb ik genomen:

1e. *Bacteriophaag niet aantoonbaar*, als na 4 versterkingen, volgens de methode van *d' Herelle*, nog geen verschil in troebeling optreedt en geen openingen zijn aan te toonen.

2e. *Bacteriophaag weinig virulent*, als na 2 of 3 versterkingen, een verschil in troebeling is waar te nemen.

3e. *Bacteriophaag tamelijk virulent*, als reeds bij eerste onderzoek een verschil in troebeling is waar te nemen.

4e. *Bacteriophaag virulent*, als bij eerste onderzoek het filtraat de geënte bouillon opheldert en 4—6 uur helder houdt.

5e. *Bacteriophaag hoogvirulent*, als bij eerste onderzoek volgens de methode van *d' Herelle*, het filtraat de geënte bouillon opheldert en eerst na ± 15 uur de secundaire cultuur zich begint te ontwikkelen.

6e. *Bacteriophaag zeer hoog virulent*, als zich geen secundaire cultuur ontwikkelt. Zooals reeds gezegd is, heb ik tot nu toe een bacteriophaag van deze virulentie niet kunnen verkrijgen.

Kip 903. Een tweejarige kip werd goed geïsoleerd en na eenige dagen de faeces verzameld en onderzocht op de aanwezigheid van bacteriophaag, werkzaam op een Pul. A. stam uit de standaardculturen van het Instituut. Bacteriophaag niet aantoonbaar. Op 26/9 werd de kip subcutaan ingespoten met 2 cc. bouilloncultuur der bovengenoemde Pul. A. stam. Op 28/9 was reeds een weinig virulenten bacteriophaag aanwezig en 30/9 was de bacteriophaag reeds tamelijk virulent voor de gebruikte Pullorumstam. De kip heeft nooit eenig teeken van ziekte vertoond en al spoedig nam de virulentie van den bacteriophaag weer af. Op 13/11 werd de kip voor andere doeleinden afgemaakt. De faeces bevatte toen nog een zeer weinig virulenten bacteriophaag, die eerst na 5 maal versterken volgens de methode van *d' Herelle*, een goed waarneembaar verschil in troebeling gaf.

Kip 904. Evenals de vorige 2 jaar oud. Faeces bevatte 23/9 geen aantoonbaren bacteriophaag voor een Pul. B stam uit de standaardculturen. Op 26/9 werd van deze stam 2 cc. eener bouilloncultuur subcutaan ingespoten. Op 28/9 was een weinig virulenten bacteriophaag in de faeces aan te toonen en op 30/9 was deze bacteriophaaag reeds tamelijk virulent. De kip heeft geen enkele verandering vertoond.

Kip 905. Een 2-jarige kip, waarvan de faeces geen aantoonbaren bacteriophaag bevatte voor een Kleinsche ziektestam uit de standaardculturen. Ook bij deze volgde op een subcutane injectie van 2 cc. der Kleinsche ziekte bouilloncultuur, de aanwezigheid van een tamelijk virulenten bacteriophaag in de faeces en de kip vertoonde geen enkel ziekteverschijnsel. Een maand na de injectie was nog een weinig virulenten bacteriophaag aanwezig.

Bij deze drie kippen volgde dus op een injectie van cultuur, een stijging der virulentie van den bacteriohaag, of een bacteriophagenstam, werkzaam op een andere bacteriesoort, werd virulent voor de gebruikte Kleinsche ziekte en Pullorumstammen.

Kip 906. Een 2-jarige kip, waarvan de faeces op 23/9 en 18/11 geen aantoonbaren bacteriophaag bevatte voor de Pul. A stam, waarmee kip 903 was ingespoten. Op 19/11 werd deze kip subc. ingespoten met 4 cc. der bovengenoemde Pul. A bouilloncultuur. Daags daarna had de kip diarrhee en ook toen was nog geen aantoonbaren bacteriophaag aanwezig. Op 22/11 diarrhee opgehouden en de kip klinisch volkomen normaal. Faeces van dien dag bevatte een virulenten bacteriophaag. Na dien tijd heeft de kip geen afwijkingen meer vertoond en 29/11 was de virulentie van den bacteriophaag reeds gedaald tot weinig virulent.

Met het ophouden der diarrhee ging dus gepaard de aanwezigheid van een virulenten bacteriophaag in de faeces.

Haan 899. Ongeveer een half jaar oud. In de faeces geen aantoonbare bacteriophaag voor een Kleinsche ziekte cultuur, die kort geleden uit een aan Kleinsche ziekte gestorven kip was geïsoleerd en ook niet voor een goed sensibele stam. 2 Dagen na de subc. injectie van 4 cc. Kleinsche ziekte bouilloncultuur had het dier diarrhee en 2 dagen later is het gestorven. Bij de sectie werd een bronskleurige lever en enteritis gevonden en culturen uit het cadaver geïsoleerd, gaven een positieve aglutinatie met Kleinsche ziekteserum. In de faeces was ook na de inspuiting der cultuur geen aantoonbaren bacteriophaag aanwezig. Ten gevolge van de afwezigheid van Kleinsche ziekte bacteriophaag, konden de bacteriën zich in dit geval dus ongestoord ontwikkelen en volgde de dood spoedig.

Haan 900. Evenals de vorige een half jaar oud en uit denzelfden koppel afkomstig. Op 29/10 ingespoten met 3 cc. Kleinsche ziekte bouillon cultuur, uit haan 899 geisoleerd. Voor de inspuiting was in de faeces geen aantoonbaren bacteriophaag, voor een dikwijls overgeënte Kleinsche ziektestam (H. 899) aanwezig. Op 2/11 was het dier erg suf; het zat in elkaar en had diarrhee. Op 5/11 was de haan weer veel beter en eenige dagen later genezen. Op 28/10, 30/10 en

2/11 geen aantoonbare bacteriophaag in de faeces. Op 4/11 was in de faeces een bacteriophaag aanwezig, die tamelijk virulent was voor een sensibele Kleinsche ziekte cultuur, maar nog weinig virulent, voor de gebruikte Kleinsche ziekte cultuur H. 899. Op 6/11 was in de faeces een virulenten bacteriophaag aanwezig voor de cultuur H. 899.

Met de genezing van deze kip ging dus gepaard een snelle stijging der virulentie van den bacteriophaag, die in de aanvang niet aantoonbaar was, of het verkrijgen van een nieuwe virulentie van den normaal in den darm aanwezigen bacteriophaag.

Kip 909. Bij een 2 jaar oude kip waarvan de faeces een weinig virulenten bacteriophaag bevatte, voor Kleinsche ziekte cultuur H. 899 werd van 3/12 tot 9/12 iederen dag 2 cc. bouilloncultuur van deze stam per os ingegeven. 6/12 had de kip diarrhee en 9/12 is ze gestorven. Sectie: bronskleurige lever en enteritis. Aglutinatie met Kleinsche ziekte serum positief. 4/12, 6/12 en 8/12 was in de faeces nog steeds een weinig virulenten bacteriophaag voor Kleinsche ziekte cultuur H. 899 aanwezig.

Hier is dus de virulentie van den bacteriophaag niet verhoogd door het voeren van culturen en de kip is spoedig gestorven.

Kip 907. Bij een 2 jaar oude kip waarvan de faeces een weinig virulenten bacteriophaag bevatte voor Kleinsche ziekte cultuur H. 899, werd van 15/12 tot 24/12 iederen dag 1 cc. van bovengenoemde Kleinsche ziekte bouilloncultuur per os ingegeven. Op 20/12 had het dier diarrhee maar reeds op 23/12 was de faeces weer normaal. Op 15/12 en 17/12 bevatte de faeces nog een weinig virulenten bacteriophaag, Op 20/12 was deze reeds tamelijk virulent en op 22/12 was de bacteriophaag virulent. De 27/12 was in de faeces nog een virulenten bacteriophaag aanwezig en daar de kip geen ziekteverschijnselen meer vertoonde werd verder geen faeces onderzocht.

Hier is weer zeer duidelijk door het ingeven van Kleinsche ziektecultuur de virulentie van den bacteriophaag gestegen en toen, nadat eenige dagen de cultuur gegeven was, de bacteriophaag nog niet voldoende virulent was, om een snelle lysis der bacteriën te bewerken, trad diarrhee op, die echter verdween, zoodra de virulentie van den bacteriophaag voldoende gestegen was.

Kip 263. Een 2-jarige kip kreeg 7/7 1924 1 cc. eener hoogvirulente Kleinsche ziekte bacteriophaag per os. Op 10/1 1925 bleek nog een tamelijke virulente bacteriophaag voor Kleinsche ziekte-cultuur K. 909 in de faeces aanwezig te zijn. Op 13/1, 14/1, 16/1 en 17/1 werd 1 cc. Kleinsche ziekte bouilloncultuur K. 909 per os ingegeven. 16/1 trad reeds diarrhee op en 20/1 is het dier gestoren. Bij de sectie werd enteritis en een sterk gezwollen bronskleurige lever gevonden en uit de organen geisoleerde culturen gaven met Kleinsche ziekte-serum een positieve aglutinatie.

De tijdens het ingeven der cultuur iederen dag verzamelde faeces bevatte steeds een tamelijk virulenten bacteriophaag, die volgens de methode van *d' Herelle* wel eenig verschil in troebeling gaf met de contrôle, maar geen volkomen lysis kon bewerken. Ook in de weinige dunne faeces die zich na den dood in den darm bevond, was tamelijk virulenten bacteriophaag voor de uit de gestorven kip geïsoleerde culturen aanwezig (eerst na 1 maal versterken volgde volkomen opheldering).

Tengevolge van het ingeven van cultuur had bij dit dier dus geen stijging der virulentie van den bacteriophaag plaats en het dier stierf spoedig.

Kip 696. Een oude kip die 7/7 1924 1 cc. hoogvirulente Kleinsche ziekte bacteriophaag per os kreeg. Op 10/1 1925 bleek in de faeces dezer kip nog een weinig virulenten bacteriophaag aanwezig te zijn, voor een Kleinsche ziekte-cultuur, uit kip 909 geïsoleerd. Evenals de vorige werd ook deze kip 13/1, 14/1, 16/1 en 17/1, 1 cc. Kleinsche ziekte bouilloncultuur uit kip 909 per os ingegeven. Daar het dier geen

diarrhee kreeg, werd 19/1 nog 1 cc. der bovengenoemde cultuur ingegeven en 21/1 tot 29/1, 2 cc. per dag. Op 24/1 had het dier hevige diarrhee. Deze is blijven bestaan tot aan den dood der kip op 29/1. Bij de sectie werd een tot het laatste deel der darm beperkte enteritis en een sterk gezwollen bronskleurige lever gevonden. Bij onderzoek der faeces bleek 17/1, 19/1 en 22/1, een virulenten bacteriophaag voor de ingegeven cultuur en voor de uit het gestorven dier geisoleerde cultuur, aanwezig te zijn. Faeces van 24/1, 26/1 en 28/1, bevatte bacteriophaag, die eerst na 1 maal versterken een verschil in troebeling gaf en faeces van 29/1 en de in den darm van het gestorven dier aanwezige dunne slijmige faeces bevatte een weinig virulenten bacteriophaag voor de ingegeven cultuur.

Dat de uit de gestorven kip geïsoleerde cultuur een zekere resistentie had, bleek wel hieruit, dat de in de faeces van 29/1 aanwezige bacteriophaag weinig virulent was voor de ingegeven cultuur dus pas na 3 versterkingen een verschil in troebeling gaf. Voor de uit het gestorven dier geïsoleerde cultuur waren echter 5 versterkingen noodig, om hetzelfde verschil te geven.

Hier had dus aanvankelijk een stijging der virulentie van den bacteriophaag plaats en het dier vertoonde geen ziekteverschijnselen. Later verminderde echter spoedig de virulentie van den bacteriophaag en het dier werd ziek en stierf.

Toen bleek dat de tot nu toe voor deze experimenten gebruikte kippen, uitgezonderd haan 899, alle tengevolge van het ingeven, of het inspuiten van cultuur, een virulenten bacteriophaag in de faeses kregen, heb ik om dit te vermijden, kippen genomen uit een streek, waar Kleinsche ziekte zeker de laatste jaren niet is voorgekomen, n.l. van een bepaalde boerderij in Friesland, dus evenals *d'Herelle* uit een onbesmette streek.

Bij onderzoek der faeces, vóórdat met de proef begonnen werd, kon daarin geen bacteriophaag worden aangetoond.

Zooals uit de volgende verslagen zal blijken, kregen de dieren, na het voeren van culturen echter toch bacteriophaag in de faeces.

Kip 72. Eenjarige kip afkomstig uit Friesland. In faeces geen aantoonbare bacteriophaag aanwezig. Van 22/1 tot 9/2 iederen dag 2 cc. Kleinsche ziekte bouillon-cultuur, afkomstig van kip 263 per os ingegeven. Op 26/1 was de faeces reeds dun en groengeel en de diarrhee is steeds erger geworden. 9/2 is het dier gestorven. Bij de sectie werd een iets gezwollen bronskleurige lever gevonden, maar vooral een heftige enteritis over bijna de geheele lengte van den darm. De uit het cadaver geïsoleerde reinculturen gaven met Kleinsche ziekteserum een positieve aglutinatie. Bij onderzoek der faeces die tijdens het ingeven der cultuur iedere twee dagen werd verzameld, bleek, dat van 22/1 tot 2/2 in de faeces geen aantoonbaren bacteriophaag aanwezig was. Eerst in de faeces, verzameld op 3/2, 5/2 en 7/2 was een virulenten bacteriophaag aanwezig, voor de ingegeven cultuur en voor de uit de gestorven kip geïsoleerde cultuur.

Eerst nadat het dier 11 dagen 2 cc. cultuur per os had gehad, trad een virulenten bacteriophaag in de faeces op. Voor dien tijd had het dier echter reeds een heftige diarrhee en de virulente bacteriophaag die de laatste acht dagen voor den dood in de faeces aanwezig was, was niet in staat genezing teweeg te brengen.

Kip 73. Evenals de vorige een 1-jarige kip uit Friesland afkomstig, waarvan de faeces geen aantoonbare bacteriophaag voor een sensibele Kleinsche ziektecultuur bevatte. Op 4/2 werd deze kipingespoten met $^1/_2$ cc. Kleinsche ziekte-bacteriophaag hoogvirulent voor een Kleinsche ziekte-cultuur uit kip 263 geïsoleerd en daarna gedurende een maand van 5/2 tot 5/3 iederen dag 2 cc. van bovengenoemde Kleinsche ziekte bouillon-cultuur per os ingegeven. De eerste week bleef de kip volkomen gezond, maar op 13/2 was de faeces dun en groen. Die

diarrhee bleef aanhouden en eerst op 23/2 was de faeces weer normaal. Behalve de diarrhee heeft de kip verder geen enkele verandering vertoond en na het verdwijnen der diarrhee is de consistentie der faeces steeds normaal gebleven. Eens in de drie dagen werd versche faeces verzameld en na afloop der proef onderzocht op aanwezigheid van Kleinsche ziekte-bacteriophaag. Daarbij bleek, dat in de faeces van 5/2, 8/2 en 11/2 een virulente bacteriophaag aanwezig was voor de ingegeven cultuur K. 263. In de faeces van 14/2, 17/2 en 20/2 was echter die virulentie plotseling sterk verminderd. Eerst na 2 maal versterken was de bacteriophaag aan te toonen. Van virulent was hij dus weinig virulent geworden. In de faeces van 24/2, 27/2 en 2/3 was weer een virulente bacteriophaag aanwezig voor de gebruikte cultuur K. 263.

Met de sterke vermindering van de virulentie van den bacteriophaag, voor de ingegeven cultuur, ging dus gepaard het optreden van diarrhee en nadat de bacteriophaag weer virulent was geworden, hield ook de diarrhee op.

Een maand nadat het ingeven der cultuur was gestaakt, is het dier afgemaakt en onderzocht op eventueele chronische veranderingen. Er werd echter niets abnormaals gevonden.

Kip 74. Evenals de vorige een 1-jarige kip, uit Friesland afkomstig, waarvan de faeces geen aantoonbare bacteriophaag voor een sensibele Kleinsche ziektecultuur bevatte. Ook deze kip werd 4/2 ingespoten met $^1/_2$ cc. hoogvirulente Kleinsche ziektebacteriophaag en daarna gedurende een maand van 5/2 tot 5/3 iederen dag 2 cc. Kleinsche ziektebouillon-cultuur afkomstig van kip 263 per os ingegeven. Op 8/2, 9/2 en 10/2 was de faeces dun, maar reeds op 11/2 was de consistentie weer ongeveer normaal. Van 19/2 tot 23/2 trad weer diarrhee op. 24/2 was de consistentie der faeces normaal en na dien tijd is de faeces normaal gebleven. Eens in de drie dagen werd versche faeces verzameld en na afloop de proef onderzocht op de aanwezigheid van Kleinsche ziekte-bacteriophaag. In de faeces van 6/2, 11/2, 14/2, 17/2, 24/2, 27/2 en

2/3 was virulente bacteriophaag voor de ingegeven cultuur K. 263 aanwezig. In de faeces van 9/2 en 20/2 daarentegen was de bacteriophaag pas aantoonbaar na 3 maal versterken, dus weinig virulent.

Beide keeren ging hier dus de diarrhee gepaard met een sterke verlaging der virulentie van den bacteriophaag.

Kip 75. Evenals de vorige een 1-jarige kip uit Friesland afkomstig, waarvan de faeces geen aantoonbare bacteriophaag bevatte, werd 4/2 inspoten met $^1/_2$ cc. hoogvirulente Kleinsche ziekte bacteriophaag en daarna gedurende een maand van 5/2 tot 5/3, iederen dag 2 cc. Kleinsche ziekte bouilloncultuur afkomstig van kip 263 per os ingegeven. Het dier heeft al dien tijd geen enkele afwijking vertoond en ook de faeces is steeds normaal gebleven. Eens in de drie dagen werd versche feaces verzameld en na afloop der proef onderzocht op de aanwezigheid der Kleinsche ziekte bacteriophaag. Daarbij bleek in alle faeces een virulenten bacteriophaag aanwezig te zijn voor de ingegeven Kleinsche ziekte cultuur.

De bacteriophaag heeft in dit dier dus zijn virulentie behouden en het dier is volkomen gezond gebleven.

Kip 76. Evenals de vorige een 1-jarige kip, uit Friesland afkomstig, waarvan de faeces geen aantoonbare bacteriophaag bevatte, werd van 5/2 tot 20/2 iederen dag 2 cc. Kleinsche ziekte-bouilloncultuur afkomstig van kip 263 per os ingegeven. Eenige dagen nadat met het ingeven der cultuur was begonuen, was de faeces reeds dunner en 10/2 was het dier erg suf en had het heftige diarrhee en een blauwe kam. De diarrhee is blijven bestaan tot 20/2, den dag waarop het dier gestorven is. Bij de sectie werd een heftige enteritis gevonden over de geheele lengte van den darm en in de bronskleurige lever waren enkele witte haardjes zichtbaar. Verder was het heele dier sterk vermagerd. Uit het cadaver geïsoleerde reinculturen gaven met Kleinsche ziekte-serum een positieve aglutinatie.

Eens in de drie dagen werd versche faeces verzameld en bij onderzoek na den dood van het dier, bleek in de faeces van 14/2,17/2 en 20/2 een virulenten bacteriophaag voor de ingegeven cultuur en voor de uit het gestorven dier geïsoleerde reinculturen aanwezig te zijn. De faeces van 7/2, 9/2 en 11/2 bevatte eerst na eenmaal versterken een aantoonbaren bacteriophaag.

Tengevolge van het ingeven der cultuur was dus al spoedig een bacteriophaag in de faeces aan te toonen maar nog weinig virulent. Het dier werd dan ook ziek en de later virulent geworden bacteriophaag kon de bij de sectie gevonden chronische veranderingen (haardjes in lever) niet meer tot genezing brengen.

Kip 77. Evenals de vorige 1-jarige kip uit Friesland afkomstig waarvan de faeces geen aantoonbare bacteriophaag bevatte, werd gedurende een maand, van 5/2 tot 5/3 iederen dag 2 cc. Kleinsche ziekte bouilloncultuur afkomstig van kip 263 per os ingegeven. 8/2 was het dier reeds suf en 10/2 had het diarrhee, hoewel niet hevig. Op 13/2 en 14/2 was het dier weer levendiger, hetgeen deed vermoeden dat genezing in zou treden, maar de diarrhee bleef aanhouden tot 21/2, toen de consistentie der faeces normaal was en ook gebleven is en het dier was 16/2 weer even suf. Met het verdwijnen der diarrhee verdween ook de sufheid. Bij onderzoek der versche faeces die eens in de drie dagen werd verzameld, bleek het volgende: Faeces van 7/2 bevatte een weinig virulenten bacteriophaag voor de ingegeven cultuur. Faeces van 9/2 en 11/2 een tamelijk virulenten bacteriophaag en faeces van 14/2 een virulenten bacteriophaag voor de ingegeven cultuur. In faeces van 17/2 was de virulentie echter plotseling weer gedaald tot weinig virulent. 20/2 was de bacteriophaag weer tamelijk virulent en de faeces van 24/2, 27/2 en 2/3 bevatte een virulenten bacteriophaag voor de ingegeven cultuur.

Ondanks het gecompliceerde verloop is hier toch duidelijk

samenhang tusschen de toestand der kip en de virulentie van den bacteriophaag voor de ingegeven cultuur. Tengevolge van het ingeven van cultuur werd het dier suf en trad diarrhee op. Gelijktijdig steeg echter de virulentie van den bacteriophaag, en 13/2 en 14/2 was de sufheid verdwenen en leek het alsof het dier zou genezen. Direct daarna verminderd echter de virulentie van den bacteriophaag en de sufheid kwam terug. De diarrhee bleef bestaan, de virulentie van den bacteriophaag was niet lang genoeg voldoende hoog geweest, om de diarrhee te doen ophouden. Spoedig echter steeg de virulentie en 21/2 was de diarrhee reeds bijna genezen en 24/2 was in de faeces een virulenten bacteriophaag aanwezig. Deze is virulent gebleven en het dier heeft verder geen afwijkingen meer vertoond.

SAMENVATTING

Nadat *d' Herelle* bij een aantal aan Kleinsche ziekte gestorven dieren geen virulenten bacteriophaag had kunnen aantoonen, terwijl hij in enkele gevallen waarin kippen genazen, direct uit de faeces een virulenten bacteriophaag kon isoleeren, nam hij voor controle-experimenten, kippen uit een niet besmette streek, „d'une region indemné", zooals hij zegt. De faeces der kippen bleek geen Kleinsche ziekte-bacteriophaag te bevatten. Een der kippen kreeg 1 cc. van een virulenten Kleinsche ziekte-bacteriophaag per os en daarna 25 dagen lang 2 cc. Kleinsche ziekte-cultuur eveneens per os. Het dier is steeds gezond gebleven, terwijl 2 kippen die als controle dienden en ook geen bacteriophaag in hun faeces hadden, 3 dagen nadat ze een enkele maal 2 cc. Kleinsche ziekte bouillon-cultuur op wat brood per os hadden gehad, stierven.

Uit deze proeven bleek dus zeer duidelijk, dat de bacteriophaag het eerste dier beschermde tegen een groote dosis cultuur, terwijl de 2 controledieren, die geen bacteriophaag in hun faeces hadden, door een enkele dosis van 2 cc. Kleinsche ziekte-cultuur te gronde gingen.

De meeste der door mij gedane onderzoekingen werden

eigenlijk begonnen, om deze resultaten van *d' Herelle* te bevestigen en zoodoende de rol van den bacteriophaag in de immuniteit te bewijzen. Slechts eenmaal ben ik erin geslaagd door een enkele dosis cultuur, groot 4 cc., die dan nog subcutaan werd ingespoten, een kip te dooden en in dat geval was ook geen enkele maal een Kleinsche ziekte-bacteriophaag in de faeces aan te toonen (Haan 899). In alle andere gevallen, waarin een enkele dosis cultuur per os of subcutaan werd gegeven, was reeds spoedig een vrij virulenten bacteriophaag in de faeces aan te toonen, hoewel die aanvankelijk geen aantoonbare bacteriophaag bevatte en alle voorzorgsmaatregelen waren genomen, om infectie met bacteriophaag te voorkomen. Een niet aantoonbare avirulente Kleinsche ziekte-bacteriophaag was dus virulent geworden, of een bacteriophaag virulent voor een andere darmbacteriesoort werd virulent voor Kleinsche ziekte-bacteriën. Deze nu virulente Kleinsche ziekte-bacteriophaag beschermde de geïnfecteerde dieren dus voor de infectie en vervulde dezelfde rol als de door *d' Herelle* ingegeven bacteriophaag. Hiermee is in overeenstemming, wat *Van Straaten* en *Ten Hennepe* meedeelen in hun publicatie n.l. dat infectieproeven met Kleinsche ziekte-culturen bij kippen zeer wisselvallig verloopen. Ik meen het dan ook aan het toeval toe te mogen schrijven, dat *d' Herelle* voor zijn controle-experimenten juist kippen heeft gehad, waarbij een reeds in den darm aanwezige, niet aantoonbare Kleinsche ziekte-bacteriophaag niet virulent werd, of een bacteriophaag, virulent voor een andere darmbacteriesoort, niet virulent werd voor de ingegeven Kleinsche ziekte-cultuur. Dit toeval vermindert echter de waarde zijner conclusies niet het minst.

Zooals reeds gezegd is, is het toeval mij slechts eenmaal dienstig geweest. Toen bleek, dat in de meerderheid der door mij onderzochte kippen, eenige dagen na het toedienen der cultuur zich in de faeces een virulenten bacteriophaag ontwikkelde, veranderde als het ware het doel der experimenten.

Na een enkele dosis van 1 cc. van een virulenten bacterio-

phaag, kon *d' Herrelle* 2 kippen, 25 dagen lang, 2 cc. Kleinsche ziekte-cultuur per os geven, zonder de minste schadelijke gevolgen. Al dien tijd bleef in den darm een virulenten bacteriophaag aanwezig. De virulente bacteriophaag die zich in de meeste gevallen in de faeces ontwikkelde, na injectie of ingestie van Kleinsche ziekte-cultuur, moest dezelfde beschermende werking hebben en daarom heb ik bij een aantal kippen meer of minder langen tijd Kleinsche ziekte-culturen per os gegeven.

Bij 2 kippen (kip 909 en 263) was in den aanvang reeds een bacteriophaag in de faeces aanwezig. Deze kon echter geen voldoende lysis der bacteriën teweegbrengen en de virulentie steeg niet, zoodat de dieren ziek werden en stierven.

Bij 1 kip (No. 696) trad spoedig een virulenten bacteriophaag in de faeces op. Eenigen tijd later nam echter de virulentie af, het dier werd ziek en stierf.

Bij 2 kippen (No. 72 en 76) trad pas eenige dagen voor den dood een virulenten bacteriophaag in de faeces op, die echter de reeds ernstig zieke dieren niet meer kon genezen.

Bij 2 kippen (No. 77 en 907) ontwikkelde zich in de faeces een virulenten bacteriophaag, die de dieren verder beschermde tegen de per os gegeven bacteriën, hoewel toen bij kip 77 plotseling de virulentie sterk afnam, dit dier ziek werd, maar genas, toen de virulentie van den bacteriophaag weer voldoende steeg.

3 kippen kregen, alvorens met het ingeven der cultuur werd begonnen 1 enkele dosis ($^1/_2$ cc.) virulente Kleinsche ziekte-bacteriophaag subcutaan. Twee ervan (No. 73 en 74) werden ziek toen de virulentie van den bacteriophaag afnam, maar genazen, zoodra die virulentie weer voldoende steeg.

Slechts 1 kip bleef na de subcutane injectie van bacteriophaag en het dagelijksch voeren van 2 cc. Kleinsche ziekte-bouilloncultuur, gedurende 30 dagen, volkomen normaal.

Dus ook hier kan ik de mededeeling van *d' Herelle*, dat virulente Kleinsche ziekte-bacteriophaag de kip beschermt tegen de binnendringende Kleinsche ziekte-bacteriën, volkomen bevestigen. Terwijl in mijn bovenbeschreven experimenten

de virulentie van den in de faeces aanwezigen bacteriophaag in de meeete gevallen plotseling afnam, om later al of niet weer te stijgen, bleef slechts in één geval de bacteriophaag voortdurend virulent en *d' Herelle* had voor zijn controle-experimenten juist 4 kippen, waarbij de bacteriophaag steeds virulent bleef, hoewel hij later wijst op de sterk wisselende samenstelling der darminhoud, die in vele gevallen de werking van den bacteriophaag zou beïnvloeden.

In 1 geval stierf dus een kip, na een enkele injectie van Kleinsche ziekte-cultuur en daarbij was steeds de bacteriophaag afwezig. In een ander geval bleef een kip waarbij virulente Kleinsche ziekte-bacteriophaag was ingespoten na toediening van 2 cc. eener Kleinsche ziekte-cultuur, gedurende 30 dagen, volkomen normaal.

In alle andere gevallen ging de toestand van het geïnfecteerde dier volkomen samen met de virulentie van den bacteriophaag ten opzichte van de infecteerende bacteriën. Tevens bleek zeer duidelijk, dat, wanneer de bacteriophaag niet tamelijk snel na de infectie virulent wordt, de in de geïnfecteerde dieren opgetreden veranderingen reeds zoodanig zijn, dat hij geen genezing meer teweeg kan brengen (kip 72 en 76).

Deze feiten bevestigen volkomen de meening van *d' Herelle*, dat de bacteriophaag bij de Kleinsche ziekte der kippen een belangrijke rol speelt bij de bescherming tegen binnendringende bacteriën.

---

e. Preventieve en curatieve waarde van den bacteriophaag bij experimenteele infecties bij kuikens met bacillus Pullorum

Toen bleek, dat bij een groot aantal kippen na toediening van Kleinsche ziekte-cultuur na korteren of langeren tijd een virulenten bacteriophaag in de faeces aanwezig was, heb ik getracht kuikens experimenteel te infecteeren, daarbij gebruik makende van de groote gevoeligheid van de jonge kuikens voor culturen van Pullorum, om op deze wijze de preventieve en curatieve waarde van den bacteriophaag te bestudeeren.

Groep A.

13 Patrijskleurige kuikens van 1 dag oud en 6 witte kuikens van 4 dagen oud, samengebracht in 1 kunstmoeder, werden 3 dagen achtereen gevoerd met Pullorum A bouillon-cultuur, welke over het voer werd gegoten. Den 4en dag werd hoogvirulenten bacteriophaag voor deze Pullorum A cultuur over het voer gedaan.

Ter contrôle kregen 7 witte kuikens van 4 dagen oud in een andere kunstmoeder, eveneens 3 dagen dezelfde cultuur over het voer, maar geen bacteriophaag.

Van de 13 patrijskleurige kuikens zijn den dag waarop den bacteriophaag over het voer werd gegeven, reeds 5 gestorven, waarvan bij 4 met zekerheid de diagnose Pullorum werd gesteld. Bij deze dieren had de bacteriophaag nog geen invloed kunnen doen gelden; ze waren al bijna dood toen deze gegeven werd. Van de 8 stuks die overbleven, zijn nog 5 gestorven, respectievelijk 2, 3, 6, 17 en 18 dagen nadat de dieren bacteriophaag over het voer hadden gehad. 3 dezer kuikens zijn in leven gebleven.

Van de 6 witte kuiken, die cultuur en daarna bacteriophaag over het voer hebben gehad, zijn 4 gestorven, respectievelijk 4, 13, 16 en 18 dagen nadat ze de laatste cultuur hadden gehad. Van deze groep zijn drie kuikens blijven leven. Deze 3 dieren zijn later afgemaakt, doch vertoonden niets abnormaals.

De kuikens van 1 dag oud zijn over het algemeen dus korter ziek geweest dan de 4 dagen oude. De 4 dagen oude kuikens blijken dus reeds minder gevoelig voor de cultuur. Van een gunstige werking van den bacteriophaag is niets te merken.

Groep B.

30 kuikens, bij het begin der proef 24 uur oud, kregen 3 dagen achtereen Pullorum A bouilloncultuur uit een der gestorven kuikens van groep A geïsoleerd, over het voer.

Tijdens het voeren der cultuur stierven reeds 2 kuikens en daags nadat met het voeren der cultuur was opgehouden, weer 3. De doodsoorzaak was echter geen Pulloruminfectie. Den 2den dag, nadat met het voeren der cultuur was opgehouden, waren weer 3 kuikens dood en bij deze werd de diagnose Pulloruminfectie bacteriologisch vastgesteld. De 22 kuikens, die nog over waren, werden in 2 groepen gesplitst, ieder in een afzonderlijke kunstmoeder.

11 kuikens werden subcutaan ingespoten met 1/10 cc. van een hoogvirulenten bacteriophaag voor de gebruikte Pullorum A. cultuur. De andere 11 kuikens dienden verder als contrôles.

Van de met bacteriophaag ingespoten kuikens is er 1 in leven gebleven. Ook van de contrôles is 1 in leven gebleven. Beide zijn later afgemaakt, maar bij de sectie werd niets abnormaals gevonden. 3 dagen na de splitsing in 2 groepen waren de andere 10 contrôles reeds alle gestorven, terwijl van de met bacteriophaag ingespoten kuikens toen nog slechts 3 dood waren. Van de andere 7 met bacteriophaag ingespoten kuikens stierf één 5 dagen, twee 7 dagen en vier 12 dagen na de inspuiting.

De met bacteriophaag ingespoten kuikens hebben dus in het algemeen langer geleefd dan de onbehandelde contrôledieren. De bacteriophaag heeft echter geen genezing tot stand kunnen brengen.

Groep C.

Toen bleek, dat de bacteriophaag in de vorige groepen geen duidelijke curatieve waarde had, werd hij in de volgende groepen preventief ingespoten of per os gegeven.

60 kuikens, bij het begin der proef ongeveer 24 uur oud. Hiervan werden 14 stuks subcutaan ingespoten met $^1/_{10}$ cc. van een hoogvirulenten bacteriophaag voor een pullorum A cultuur uit een gestorven kuiken van groep B geïsoleerd. (Groep 1.) 15 kuikens kregen ieder $^3/_{10}$ cc. van denzelfden bacteriophaag per os. (Groep 2.) De 31 kuikens, die nog over waren, (groep 3) kregen geen bacteriophaag.

6 uur na het ingeven en inspuiten van den bacteriophaag kregen alle 60 kuikens ieder $^3/_{10}$ cc. van bovengenoemde pullorum A bouilloncultuur, waarvoor de bacteriophaag hoogvirulent was, per os.

Van de 14 kuikens van groep 1 zijn in het geheel 8 gestorven en 24 dagen na het begin der proef werden de overige 6 gedood, waarbij bij één chronische veranderingen werden gevonden, die vermoedelijk wel tot den dood zouden hebben geleid.

Van de 15 kuikens van groep 2 zijn 14 gestorven. Eén is later afgemaakt, maar was volkomen normaal.

Van de 31 kuikens van groep 3 zijn 25 gestorven en 6 in leven gebleven. Deze 6 zijn 24 dagen na het begin der proef gedood. Toen was 1 er van reeds ziek en deze vertoonde chronische veranderingen; de overige waren gezond.

Zoowel van de contrôledieren, als van de voor het ingeven der cultuur met bacteriophaag behandelde dieren zijn dus feitelijk beide 6 gezond gebleven. Hoewel in den aanvang de sterfte onder de contrôledieren iets grooter was dan bij de met bacteriophaag behandelde, zijn toch van beide groepen

evenveel gestorven en van een duidelijke werking van den bacteriophaag was geen sprake. Daar van de kuikens, die enkel cultuur per os hebben gehad, ook zes zijn blijven leven, heeft zich hier vermoedelijk bij deze contrôledieren een virulenten bacteriophaag in den darm ontwikkeld.

Groep D.

Toen bij groep C geen duidelijke preventieve werking van den bacteriophaag kon worden aangetoond, door ingeving van cultuur, werd in deze groep de cultuur subcutaan ingespoten.

11 kuikens bij het begin der proef 3 dagen oud. Hiervan werden 6 stuks subcutaan ingespoten met $^1/_{10}$ cc. bacteriophaag, die hoog virulent was voor een Pullorum A cultuur, uit een gestorven kuiken van groep C geïsoleerd. Den volgenden dag werden alle 11 kuikens subcutaan ingespoten met $^1/_{10}$ cc. dezer cultuur. De met bacteriophaag ingespoten dieren waren gemerkt en daardoor kenbaar. Ze werden niet van de andere kuikens gescheiden.

2 kuikens die met bacteriophaag en cultuur waren ingespoten, stierven 4 dagen na de inspuiting der cultuur. 3 andere respectievelijk 5, 9 en 11 dagen na de inspuiting der cultuur. 1 kuiken bleef in leven.

Van de enkel met cultuur ingespoten kuikens stierven 4 stuks respectievelijk 1, 2, 4 en 6 dagen na de inspuiting der cultuur. 1 kuiken bleef in leven.

De met bacteriophaag ingespoten kuikens zijn hier dus langer blijven leven, dan de enkel met cultuur ingespoten kuikens, maar de bacteriophaag is toch niet in staat geweest ze voor den dood te behoeden.

Daar de beide groepen niet van elkaar waren gescheiden, is het mogelijk, dat de 5 dieren waarbij geen bacteriophaag werd ingespoten, deze hebben opgenomen, met excreta der andere kuikens. In ieder geval heeft dan toch de bacteriophaag de dieren niet meer voor den dood kunnen behoeden.

Groep E.

30 kuikens, bij het begin der proef 2 dagen oud, werden

gesplitst in 2 groepen, één van 20 kuikens (groep 1) en één van 10 (groep 2). In iedere groep werd de helft gemerkt.

De gemerkte kuikens van beide groepen kregen ieder $^1/_{10}$ cc. eener Pullorum A bouilloncultuur, uit een gestorven kuiken van groep B geïsoleerd, per os, terwijl de niet gemerkte $^1/_{20}$ cc. van dezelfde cultuur per os kregen. 3 uur later werd bij de gemerkte en de niet gemerkte kuikens van groep 1 ieder $^2/_{10}$ cc. hoogvirulenten bacteriophaag voor de ingegeven cultuur ingespoten.

De 10 kuikens van groep 2, de contrôledieren, kregen geen bacteriophaag. 5 van deze groep hadden ieder $^1/_{10}$ cc. cultuur en de andere 5 ieder $^1/_{20}$ cc. cultuur per os gehad.

Alle 10 contrôledieren zijn gestorven, behalve 1, die 24 dagen na het inspuiten der cultuur is afgemaakt, maar toen reeds chronische veranderingen vertoonde.

Van de 10 gemerkte kuikens van groep 1, die dus ieder $^1/_{10}$ cc. cultuur per os en $^2/_{10}$ cc. bacteriophaag subcutaan hadden gehad, zijn twee in leven gebleven en van de 10 die niet gemerkt waren en ieder $^1/_{20}$ cc. cultuur per os en $^2/_{10}$ cc. bacteriophaag subcutaan hadden gehad, zijn drie in leven gebleven. Deze zijn later gedood, doch bij de sectie werd niets bijzonders gevonden.

Terwijl dus alle contrôles gestorven zijn, zijn van de met bacteriophaag behandelde dieren 5 in leven gebleven. Hier is dus eenige werking van den bacteriophaag te bemerken.

Groep F.

Toen in de vorige groep E eenige werking van den bacteriophaag was te bemerken, werd bij deze groep de dosis cultuur nog kleiner genomen.

26 kuikens bij het begin der proef 2 dagen oud. Hiervan kregen 5 kuikens ieder $^1/_{40}$ cc. Pullorum A bouilloncultuur, uit een gestorven kuiken van groep B geïsoleerd, per os. 4 en 16 dagen na het ingeven der cultuur stierf één der kuikens aan Pullorum infectie. 2 kuikens bleven in leven en 18 dagen na het ingeven der cultuur stierf nog 1 kuiken, dat achter

gebleven was in groei. Bij de sectie daarvan werden geen bijzonderheden gevonden en uit de organen aangelegde culturen bleven steriel.

Naast deze contrôles kregen 21 kuikens $^1/_{40}$ cc. van dezelfde cultuur per os en tegelijkertijd $^1/_4$ cc. bacteriophaag, die hoogvirulent was voor de ingegeven cultuur, subcutaan. Den volgenden dag werd bij deze 21 kuikens $^1/_5$ cc. van denzelfden bacteriophaag subcutaan ingespoten.

Van deze 21 kuikens zijn op den dag van inspuiting en den dag daarna 6 gestorven, tengevolge van de inspuiting of doordat ze reeds achterbleven in groei. Van de overige 15 zijn twee gestorven, respectievelijk 21 en 27 dagen na de laatste inspuiting van den bacteriophaag. De andere zijn 27 dagen na de laatste inspuiting der bacteriophaag afgemaakt. Daarbij werden bij 3 enkele witte haardjes in de lever gevonden en bij de rest geen veranderingen.

In het geheel zijn dus 10 kuikens absoluut gezond gebleven van de 15, die voor conclusie in aanmerking kwamen. Wanneer men van de 5 contrôles het in groei achtergebleven kuiken uitschakelt, zijn daarvan dus twee gestorven en twee gezond gebleven en de eerste twee zijn korter ziek geweest dan de gestorven kuikens die met bacteriophaag waren ingespoten.

In dit geval is dus wel eenige werking van den bacteriophaag te constateeren, hoewel nog lang niet zoo, dat met bacteriophaag ingespoten dieren in leven bleven.

Groep G.

12 kuikens, bij het begin der proef 10 dagen oud, werden verdeeld in twee groepen, goed van elkaar gescheiden. Groep 1 bestond uit 5 donkere en 2 witte kuikens. Hiervan kregen de 5 donkere een $^1/_2$ cc. van een hoogvirulenten bacteriophaag voor een Kleinsche ziekte-cultuur, uit kip 909 gestorven aan Kleinsche ziekte geïsoleerd, per os. Indien de bacteriophaag zooals *d' Herelle* meent ook de andere dieren besmet, zouden de witte kuikens eveneens de bacteriophaag in de faeces moeten krijgen en daardoor voor de infectie behoed zijn.

De 2 volgende dagen kregen alle 7 kuikens van groep 1 en ook de 5 van groep 2 ieder telkens $^1/_2$ cc. van bovengenoemde Kleinsche ziekte-bouilloncultuur per os.

Tusschen 4 en 8 dagen nadat de laatste maal cultuur gegeven was zijn reeds 10 kuikens gestorven. Uit iedere groep is bij 1 kuiken de ziekte chronisch geworden, maar ook deze zijn later gestorven.

Van eenige werking van den bacteriophaag is dus niets te merken. Bij onderzoek der faeces der beide groepen, verzameld voor het ingeven van den bacteriophaag, bleek dat de kuikens van beide groepen reeds een tamelijk virulenten bacteriophaag in hun faeces hadden voor de gebruikte cultuur.

Groep H.

10 kuikens bij het begin der proef 5 dagen oud, werden verdeeld in twee gelijke groepen. De 5 kuikens der eerste groep kregen eerst drie druppels van een hoogvirulenten bacteriophaag voor een Kleinsche ziekte-cultuur, uit kip 263 geïsoleerd, per os. Den volgenden dag kregen alle 10 kuikens 2 druppels der bovengenoemde bouilloncultuur per os.

Tusschen 6 en 9 dagen na het ingeven der cultuur zijn reeds 9 kuikens gestorven. 1 kuiken dat alleen cultuur had gehad is blijven leven.

In de faeces, verzameld voor het ingeven van den bacteriophaag, was reeds een virulenten bacteriophaag aanwezig. Deze is blijkbaar nog niet virulent genoeg geweest om de dieren in leven te houden, maar ook de ingegeven bacteriophaag heeft geen waarneem effect veroorzaakt.

Groep I.

Bij de vorige groepen werden steeds de dieren kunstmatig, door inspuiting of ingeven van cultuur, geïnfecteerd. Daarbij was van een duidelijke preventieve of curatieve werking van den bacteriophaag weinig te merken. Daarom heb ik getracht zooveel mogelijk spotane infectie te verkrijgen en daarvoor kuikens van 24 uur oud geplaatst bij zieke kuikens uit koppels

waaronder sterfte ten gevolge van pullorum A infectie was geconstateerd.

Bij een eerste in deze richting genomen proef bleek al spoedig, dat dit niet zoo eenvoudig was als het op eerste gezicht lijkt. Van 30 kuikens van 24 uur oud, stierf namelijk geen enkel.

Van een tweede groep groot 28 kuikens van 24 uur oud werd de helft gemerkt en deze kregen $^1/_4$ cc. van een virulenten Kleinsche ziekte bacteriophaag per os. Daarna werden alle 28 kuikens gezet in een kunstmoeder, waarin reeds twee dagen 15 aan Pulloruminfectie lijdende kuikens waren. Deze stierven spoedig. Van de met bacteriophaag behandelde dieren stierf geen enkel, maar van de kuikens die niet met bacteriophaag waren behandeld zijn drie gestorven aan een chronische pullorum A infectie.

Van de overige kuikens zijn een aantal afgemaakt. Bij geen enkel werd echter eenige verandering gevonden.

Hieruit bleek dus, dat men op deze wijze wel kuikens kan besmetten, maar dat dit niet zoo gemakkelijk gaat als men zou denken.

Hoewel het opvallend is, dat juist drie kuikens zijn gestorven, die niet met bacteriophaag waren behandeld, is deze proef niet voldoende, om er een conclusie omtrent de preventie werking van den bacteriophaag uit te trekken. Het is dan ook slechts volledigheidshalve, dat ik ze vermeld.

SAMENVATTING

Uit de beschreven infectieproeven blijkt, dat de ingegeven of ingespoten bacteriophaag geen frappante preventieve of curatieve werking heeft vertoond. Hoewel in vele gevallen de met bacteriophaag behandelde kuikens langer hebben geleefd dan de niet behandelde, was echter in al die gevallen de infectie nog te sterk. Werd echter de dosis cultuur te klein genomen, dan bleef ook het aantal contrôles in leven, wat zeer goed te verklaren was, toen bleek, dat in de laatste

groepen de faeces reeds voor het toedienen van den bacteriophaag, toch virulente of tamelijk virulente bacteriophaag bevatte. Dus ook hier weer de moeilijkheid, dat dieren die geen bacteriophaag werd toegediend, deze toch in de faeces hadden of kregen, waardoor vergelijkingen niet goed meer mogelijk zijn. Alleen wanneer men den bacteriophaag bij de contrôledieren kon uitschakelen is een nauwkeurige vergelijking mogelijk.

---

f. De bacteriophaag als bestrijdingsmiddel der Kleinsche ziekte en Pulloruminfectie in de practijk

Naast de experimenteele infecties, werd in navolging van *d' Herelle* ook getracht, spontane gevallen van Kleinsche ziekte door middel van inspuiting van bacteriophaag, of voedering ervan, te beïnvloeden en te genezen om zoodoende ook dat als bewijs voor de rol van den bacteriophaag in de immuniteit te laten gelden.

Omdat *d' Herelle* meent, dat inspuiting beter resultaat geeft, dan toediening per os, heb ik mij bepaald tot inspuiting van den bacteriophaag, vooral ook omdat het aantal gevallen, dat voor gecontroleerde behandeling in aanmerking komt, niet erg groot is.

Alleen de aan het slot beschreven gevallen van kuikensterfte zijn behandeld door toediening per os, omdat daarbij practisch gesproken, inspuiten niet goed uitvoerbaar is.

Geval 1, C. te P.

Koppel van 100 kippen. In 8 dagen 50 gestorven. Bij de sectie werd een typische bronskleurige lever en enteritis gevonden. Culturen gaven een sterk positieve aglutinatie met Kleinsche ziekte-serum en de Kleinsche ziekte-bacteriophaag was in staat een suspensie, van die cultuur gemaakt, op te lossen en meerdere uren helder te houden. Nadat in 8 dagen 50 kippen waren gestorven, werden de 50 overgebleven dieren, waarvan de helft reeds ziek was (diarrhee, blauwe kammen en kreupel loopen), intramusculair ingespoten met 2 cc. bacteriophaag.

Daags na de inspuiting waren die dieren veel opgewekter,

de leg verbeterde spoedig, maar enkele kippen bleven wat stijf. De eerste 3 weken na de inspuiting stierven nog 8 kippen. Drie weken na de eerste inspuiting werd echter de sterfte weer grooter. Hoewel toen de diagnose niet bacteriologisch werd vastgesteld zijn toch de 22 kippen die toen nog over waren, weer ingespoten met 2 cc. bacteriophaag. Daarna hield de sterfte weer op, maar na 4 weken was er weer af en toe een kip dood, zoodat van den geheelen koppel slechts enkele dieren zijn overgebleven.

10 dagen na de eerste inspuiting van bacteriophaag werd versche faeces uit het hok verzameld. Het filtraat daarvan bevatte echter geen virulenten bacteriophaag, voor de uit de gestorven dieren verkregen culturen.

Geval 2, H. te B.

Sterfte onder kippen, zeer chronisch, 1 à 2 sterfgevallen per dag. In het geheel zijn in ongeveer 3 weken 40 kippen gestorven. Bij de sectie werden in lever en hart witte haardjes gevonden. Culturen uit een gestorven dier geïsoleerd, gaven met Kleinsche ziekte-serum een positieve aglutinatie en ook de bacteriophaag was actief voor deze stam. De 160 overgebleven kippen werden intramusculair ingespoten met 1 cc. bacteriophaag. Aanvankelijk hield de sterfte op, maar geleidelijk is ze weer op nieuw begonnen. 4 weken na de eerste injectie is weer 1 cc. bacteriophaag per kip ingespoten. Na deze tweede injectie is de sterfte absoluut opgehouden.

Geval 3, D. te E.

De ziekte verloopt zeer chronisch. Soms even stilstand, maar spoedig daarna weer sterfte. In 1 jaar tijd zijn er van 400 stuks maar 150 meer over. Ook in de omgeving heerscht geregeld chronische sterfte.

Sectie, aglutinatie met Kleinsche ziekte serum en werking van den Kleinsche ziekte bacteriophaag positief.

In 1 koppel, 38 donkere kippen 1 cc. en 22 witte 2 cc. bacteriophaag intramusculair ingespoten. In een tweede koppel

geheel geïsoleerd van de vorige, 84 stuks ieder $^1/_2$ cc. bacteriophaag. De sterfte hield daarna onmiddellijk geheel op en na een half jaar was er nog geen recidive.

Geval 4, B. te A.

Sterfte onder de kuikens van ± 4 weken oud. 1 á 4 per dag dood. Van 150 nog 80 over.

Aglutinatie met Kleinsche ziekte serum en werking van den Kleinsche ziekte bacteriophaag positief.

Ieder kuiken met 1 cc. bacteriophaag ingespoten. Na de behandeling zijn nog 4 kuikens gestorven, waarbij 2, die bij de inspuiting reeds erg ziek waren. Twee dagen na de inspuiting waren de dieren weer zoo goed als gezond.

Geval 5, K. te U.

Sterfte onder kippen. Aglutinatie met Kleinsche ziekte serum en werking van den Kleinsche ziekte bacteriophaag positief. Behandeling met Kleinsche ziekteserum, had niet het minste resultaat gegeven.

In het geheel waren er nog 300 stuks over. Deze 1 cc. bacteriophaag intramusculair ingespoten. Daarna is de sterfte onmiddellijk blijvend opgehouden.

Geval 6, H. te B.

Koppel kippen groot 150 stuks. Acute sterfte, 3 à 4 per dag. Werking van den Kleinsche ziekte-bacteriophaag positief op de uit enkele gestorven dieren verkregen culturen. Per kip 1 cc. van dezen bacteriophaag ingespoten. Daarna is de sterfte onmiddellijk en blijvend opgehouden.

Geval 7, M. te O.

In een koppel kippen van 110 stuks zijn in 14 dagen 30 gestorven. Sectie, aglutinatie met Kleinsche ziekte-serum en werking van den Kleinsche ziekte-bacteriophaag positief.

Van de 80 dieren die nog over waren, de helft met Kleinsche ziekte-serum en de andere helft met 1 cc. Kleinsche ziekte-

bacteriophaag ingespoten en beide groepen gescheiden. In de laatste groep hield de sterfte onmiddellijk op, terwijl bij de met serum behandelde dieren na enkele dagen reeds weer sterftegevallen voorkwamen. Daarna werden ook deze met 1 cc. bacteriophaag ingespoten, waarna de sterfte ook in die helft onmiddellijk ophield.

Geval 8, M. te O.

Koppel van ongeveer 100 kippen. Sterfte 3 à 4 per dag. Werking van den Kleinsche ziekte-bacteriophaag op de uit een gestorven dier verkregen culturen positief

Per kip 1 cc. van deze bacteriophaag ingespoten. Daarna is de sterfte onmiddellijk en blijvend opgehouden.

Geval 9, G. te E.

Verloop der ziekte chronisch, in een half jaar zijn van 150 kippen maar 52 meer over. Soms weken met 12 dooden, soms ook weken met geen enkele. In de omgeving zijn bij een aantal kippenhouders de laatste 2 jaar reeds tweemaal zoo goed als alle kippen uitgestorven, met steeds hetzelfde chronische verloop.

Culturen uit een gestorven dier geïsoleerd gaven met Kleinsche ziekte serum een positieve aglutinatie en de Kleinsche ziekte-bacteriophaag kon de groei der bacteriën in bouillon ongeveer 10 uren tegenhouden.

25 witte kippen werden ingespoten met $^1/_2$ cc. van dezen bacteriophaag en 27 donkere met 1 cc. Daarna hield de sterfte onmiddellijk op; geen enkele kip is meer gestorven, terwijl in de omgeving de sterfte op dezelfde chronische wijze doorging.

Geval 10, K. te A.

Koppel kippen groot 140 stuks. Sterfte acuut, 15 in 4 dagen gestorven. Culturen uit een gestorven kip geïsoleerd gaven een positieve aglutinatie met Kleinsche ziekte serum en ook de werking van den bacteriophaag was positief.

Per kip $^1/_2$ cc. van dezen bacteriophaag ingespoten. Resultaat

zeer gunstig. Daags na de behandeling zijn nog 3 erg zieke dieren gestorven, na dien tijd geen enkel meer.

Geval 11, S. te H.

In een koppel van 400 kippen zijn in ongeveer 2 maanden 150 dieren gestorven, van 1—6 per dag. Sectie aglutinatie met Kleinsche ziekte-serum en werking van den Kleinsche ziekte-bacteriophaag op uit de een gestorven dier geïsoleerde culturen was positief.

De 250 kippen die nog over waren, ieder $^1/_2$ cc. Kleinsche ziekte-bacteriophaag ingespoten. Daarna is het aantal sterfgevallen sterk verminderd en de algemeene toestand van den koppel veel verbeterd, maar 2 maanden na de eerste inspuiting stierf nog steeds af en toe een kip. Toch werkte de Kleinsche ziekte-bacteriophaag op de culturen, die uit de na de inspuiting gestorven dieren geïsoleerd werden. 2 maanden na de eerste inspuiting zijn de kippen die nog over waren voor de tweede maal, nu met $^1/_{10}$ cc. bacteriophaag, ingespoten. Daarna is geen enkel dier meer gestorven en ook recidive is niet opgetreden. Door de inspuiting van den Kleinsche ziekte-bacteriophaag is dus het acute karakter van de sterfte verdwenen, maar deze is niet geheel opgehouden.

Geval 12, J. te E.

In een koppel van ongeveer 225 kippen heerscht een sterfte van 7 à 8 per dag. Een paar weken voor het uitbreken der ziekte had de eigenaar jonge hennen gekocht. Daags na de ontvangst was er al één dood en later volgden nog meerdere. Daarna begon de sterfte ook in zijn andere koppels, temeer daar hij de aangekochte dieren niet eerst afzonderlijk had gehouden.

Sectie, aglutinatie met Kleinsche ziekte-serum en werking van den Kleinsche ziekte-bacteriophaag was positief.

In het geheel waren er 3 koppels.

Koppel 1. Sterfte 3—7 per dag. 100 stuks $^1/_2$ cc. bacteriophaag ingespoten. Daags na de inspuiting zijn in deze koppel nog 5 kippen gestorven; daarna geen enkele meer.

Koppel 2. Hierin was naar verhouding de ziekte het hevigst, ± 3 sterfgevallen per dag. De 24 dieren die nog over waren, ingespoten met $^1/_2$ cc. bacteriophaag. Vele dieren waren erg ziek en meerdere dooden, die dien dag gestorven waren, lagen in en om het hok. Na de inspuiting is de sterfte wel verminderd, en een aantal dieren is wel veel vlugger geworden, maar geregeld gaat nog een enkel dier dood, wat niet te verwonderen is, gezien de vele zeer zieke dieren bij de inspuiting.

Koppel 3. Een koppel van 100 stuks was geïsoleerd van de vorige twee. In deze koppel was nog geen sterfte. Alle 100 dieren werden echter preventief met 4 cc. Kleinsche ziekte-serum ingespoten. 4 dagen later begon in deze koppel ondanks de preventieve enting met serum toch ook de sterfte. Per dag stierven 4 à 5 dieren. Nadat ongeveer 20 dieren waren gestorven, is de rest met $^1/_2$ cc. bacteriophaag ingespoten. Daarna hield de ziekte op behoudens enkele sterfgevallen door Tuberculose.

Geval 13, L. te E.

Sterft onder volwassen kippen. Sectie, aglutinatie met Kleinsche ziekte-serum positief. Werking van den bacteriophaag op de uit een gestorven dier geïsoleerde cultuur was zwak. Volgens de methode van *d'Herelle* werden de buizen bouillon, waarbij filtraat was gedaan, niet heelemaal helder en er ontwikkelde zich spoedig een secundaire troebeling.

In de koppel, bestaande uit 100 kippen werd $^1/_2$ cc. van bovengenoemden bacteriophaag intramusculair ingespoten, echter zonder het minste resultaat. Eerst nadat 2 weken later weer $^1/_2$ cc. was ingespoten, verminderde de sterfte sterk. Vermoedelijk is dus in dit geval de resistentie der bacteriën achteruit gegaan, of de ingespoten hoogvirulenten bacteriophaag is zeer hoog virulent geworden en heeft dus den strijd tegen de bacteriën kunnen winnen.

Geval 14, B. te B.

In een geïsoleerde koppel volwassen kippen, groot 200 stuks, heerscht een chronische sterfte.

Sectie, aglutinatie met Kleinsche ziekte-serum en werking van den Kleinsche ziekte-bacteriophaag op de uit een gestorven dier geïsoleerde culturen was positief.

Alle 200 dieren zijn toen ingespoten met $^1/_2$ cc. van den Kleinsche ziekte-bacteriophaag. Hoewel enkele erg zieke dieren ook ingespoten werden, is toch geen enkel dier meer gestorven en de zieke zijn genezen.

In dit geval dus een zeer gunstig resultaat.

Geval 15, B. te V.

Sterfte onder volwassen kippen, gemiddeld 3 à 4 per dag. Ongeveer drie weken geleden is de ziekte begonnen, zoodat in het geheel 60 dieren zijn gestorven.

Uit een gestorven dier dat bij de sectie enteritis, bronskleurige lever en een vrij groote milt vertoonde, werden culturen geïsoleerd, die niets op Kleinsche ziekteculturen geleken en bestonden uit groote witte koloniën. De Kleinsche ziekte-bacteriophaag werkte echter sterk op deze culturen, zoodat toen dat gebleken was, de 317 kippen die nog over waren en waarvan een groot aantal suf en erg ziek was, ingespoten werden met $^1/_{10}$ cc. van den Kleinsche ziekte-bacteriophaag. De sterfte hield daarna onmiddellijk en blijvend op.

Geval 16, N. te V.

Sterfte onder oude kippen. In 1 maand zijn 23 dieren gestorven. Sectie, aglutinatie met Kleinsche ziekte serum en werking van den Kleinsche ziekte bacteriophaag op de uit een gestorven dier geïsoleerde cultuur waren positief.

De 71 kippen die nog over waren, zijn ingespoten met $^1/_{10}$ cc. van den Kleinsche ziekte-bacteriophaag. Daarna is de ziekte onmiddellijk en blijvend opgehouden.

Geval 17, H. te V.

Nadat 137 kuikens de eerste 4 dagen na de geboorte goed vlug waren geweest, trad den 5den dag sterfte op en 10 dagen na de geboorte waren reeds 80 gestorven, waarbij de

diagnose Pullorum A infectie werd gesteld. Dien dag kregen de 55 kuikens die nog over waren hoogvirulenten Kleinsche ziekte-bacteriophaag door het drinkwater.

Daarna zijn nog 3 gestorven.

Geval 18, M. te B.

In een toom van 500 kuikens is direct na de geboorte sterfte begonnen. 14 dagen na de geboorte waren reeds 150 dood. Bij enkele gestorven dieren werd de diagnose Pullorum infectie gesteld en de Kleinsche ziekte-bacteriophaag werkte positief op een uit een gestorven kuiken geïsoleerde cultuur.

14 dagen na de geboorte is toen eenige dagen Kleinsche ziekte-bacteriophaag in het drinkwater gegeven en daarna hield de ziekte even op. 4 dagen later waren er echter weer meerdere dieren dood en een groot aantal ziek. Een 20-tal van deze zieke kuikens zijn afgemaakt en deze vertoonden alle zonder uitzondering haardjes in het hart. Behalve deze 20, waren er zeker nog wel ongeveer 100 kuikens, die klinisch dezelfde verschijnselen vertoonden en dus waarschijnlijk ook allen dezelfde chronische veranderingen hadden. Genezing van die dieren werd dan ook niet verwacht. Toen de dieren 5 weken oud waren, waren er in het geheel nog 150 kuikens over en deze waren oogenschijnlijk gezond. De laatste dagen was dan ook geen enkel kuiken meer gestorven.

Zeer duidelijk blijkt hier, dat na het opnemen van den bacteriophaag het acute beeld der ziekte verdwijnt, maar dat een groot aantal dieren toch nog sterft, tengevolge van de chronische veranderingen, bij de kuikens vooral in het hart aanwezig.

Geval 19, B. te B.

In een toom van 500 kuikens is 6 dagen na de geboorte sterfte opgetreden. Ongeveer 16 kuikens per dag. De gestorven dieren vertoonden reeds witte haardjes in hart en longen. Pullorum A infectie werd geconstateerd.

11 en 12 dagen na de geboorte werd hoogvirulente Kleinsche

ziekte-bacteriophaag, die de uit een gestorven kuiken geïsoleerde cultuur goed oploste, door het drinkwater gegeven. Daarna werd de sterfte veel minder. Nadat later nog eens Kleinsche ziekte-bacteriophaag door het drinkwater is gegeven, is de sterfte geheel opgehouden. Na de eerste voedering van bacteriophaag zijn nog ongeveer 30 dieren gestorven.

Ook hier dus weer het verdwijnen van het acute beeld, terwijl nog een aantal dieren sterven, waarbij reeds ernstige veranderingen zijn opgetreden.

Geval 20, W. te A.

Sterfte onder kuikens van 14 dagen oud. Van 200 stuks waren nog 93 over. Sterfte erg ongelijk.

Werking van den Kleinsche ziekte-bacteriophaag op de uit de gestorven dieren geïsoleerde culturen was sterk positief.

De 93 kuikens die nog over waren zijn ingespoten met $^1/_2$ cc. Kleinsche ziekte-bacteriophaag. Na de inspuiting zijn nog 2 gestorven.

Volledigheidshalve moet ik tenslotte nog 2 gevallen van kippensterfte vermelden, waarbij de diagnose door dierenartsen, alleen door de sectie werd gesteld en dus de werking van den bacteriophaag op de culturen niet kon worden nagegaan.

Bij 1 ervan had inspuiting van bacteriophaag absoluut geen resultaat, terwijl in het tweede geval de sterfte ophield na inspuiting van bacteriophaag.

SAMENVATTING

In het geheel is dus in 11 gevallen, samen 1785 kippen waaronder Kleinsche ziekte voorkwam, de ziekte na inspuiting van een meer of minder groote dosis hoogvirulenten bacteriophaag, direct opgehouden. Vooral om de zeer snelle werking van den ingespoten bacteriophagencultuur, kan men de directe werking van den bacteriophaag moeilijk ontkennen.

Behalve deze zeer gunstige resultaten zijn er ook eenige gevallen, met minder gunstig verloop.

Vooreerst 2 gevallen (No. 2 en 11) waarbij eerst na een tweede injectie, blijvend de sterfte ophield.

In 1 geval (No. 13) werkte de bacteriophaag zwak op een uit een gestorven kip geïsoleerde cultuur en inspuiting van bacteriophaag had dan ook niet het minste resultaat. Toen later met denzelfden bacteriophaag de dieren voor de tweede maal werden ingespoten, hield de sterfte echter op.

Tenslotte werd de bacteriophaag bij kuikens ingespoten (No. 4 en 20) met zeer gunstig resultaat.

Bij jongere kuikens werd de bacteriophaag door het drinkwater gegeven, omdat inspuiten daarbij niet goed mogelijk is. Deze voedering van bacteriophaag in 3 gevallen (No. 17, 18 en 19), samen 1825 kuikens had in zooverre resultaat, dat de acute sterfte in alle 3 gevallen onmiddellijk ophield. De dieren met chronische veranderingen stierven echter later toch en hoe vroeger de behandeling werd ingesteld, des te minder dieren met chronische veranderingen zijn er gestorven.

In het algemeen kan ik dus de meening van *d' Herelle*, dat de Kleinsche ziekte-bacteriophaag, door directe lysis der bacteriën, sterfte onder kippen, tengevolge van Kleinsche ziekte, onmiddellijk doet ophouden, volkomen bevestigen.

d' Herelle wijst er reeds op, dat geen genezing meer optreedt, wanneer chronische veranderingen zijn ontstaan. Ook dit kan ik volkomen bevestigen. Bij de kuikensterfte blijkt namelijk zeer duidelijk, dat na het toedienen van den bacteriophaag, het acute beeld verdwijnt, maar dat de dieren die chronische veranderingen hadden, nog stierven.

De door *d' Herelle* beschreven gunstige resultaten van bacteriophagentherapie bij Kleinsche ziekte, zijn waarschijnlijk alle verkregen in acute gevallen. In de door mij behandelde gevallen was dit zeer zeker niet het geval. Wanneer de culturen uit een gestorven dier met Kleinsche ziekte-serum een positieve aglutinatie gaven, werd bacteriophaag ingespoten en daarbij zijn zeer zeker ook gevallen van chronische Pullorum-infecties geweest. Door het ontbreken van voldoende gegevens

omtrent de mate waarin chronische Pullorumlijders voorkomen, is het moeilijk een oordeel over de gevallen waarin de bacteriophaag niet direct genezing teweegbracht, te vellen. Uit de resultaten bij kuikens met Pullorum blijkt zeer duidelijk de beteekenis der chronische veranderingen, die door den bacteriophaag niet meer kunnen worden genezen en vermoedelijk zullen juist de koppels, waarin de chronische Pullorumlijders voorkomen moeilijk door inspuiting van bacteriophaag te genezen zijn. Wanneer bij een acute opflikkering in dergelijke koppels den bacteriophaag wordt ingespoten, zal het acute beeld verdwijnen, maar de dieren met de chronisch veranderde ovaria, zullen vroeger of later toch nog sterven. De sterfte zal dus in mindere mate blijven bestaan.

Meerdere bekendheid omtrent de mate waarin chronische Pullorumlijders voorkomen, zal ook in deze gevallen meer licht brengen.

Uit de resultaten verkregen door inspuiting van bacteriophaag in spontane gevallen van Kleinsche ziekte, kom ik evenals *d' Herelle* tot de conclusie, dat de bacteriophaag zeer zeker een rol speelt in de immuniteit en dat hij bij de bestrijding der Kleinsche ziekte een zeer goed middel is.

B. Vlekziekte

Na het isoleeren van een filtraat, dat sterk lytisch werkte op vlekziektebacillen, meenden *Miessner* en *Baars* een methode te hebben gevonden, om de preventieve en curatieve waarde van den bacteriophaag te bepalen. Door inspuiting van muizen met vlekziektebacteriophaag, meer of minder langen tijd voor of gelijktijdig met een injectie van een doodelijke dosis vlekziektecultuur gingen ze na, of die muizen langer leefden, dan muizen die enkel met een doodelijke dosis cultuur waren ingespoten. Ze vonden echter geen enkel verschil.

6 muizen werden subcutaan ingespoten met $^1/_2$ cc. bacteriophagencultuur die eerst gefiltreerd was door een bacteriekaars en toen telkens 2 ervan respectivelijk 1, 3 en 6 dagen later subcutaan geinfecteerd met een doodelijke dosis cultuur. Alle 6 muizen stierven even spoedig als een contrôlemuis, waarbij enkel cultuur subcutaan was ingespoten.

2 muizen werden subcutaan ingespoten met vlekziektecultuur en op een andere plaats van het lichaam met $^1/_2$ cc. der bacteriophagencultuur. Ook deze zijn beide even spoedig gestorven als de contrôlemuis.

Toen deze experimenten alle negatief verliepen, werd dezelfde proef herhaald met een grootere dosis bacteriophagencultuur en den tijd tusschen de inspuiting van den bacteriophaag en later van de cultuur werd grooter genomen, n.l. 1, 2 en 13 weken. Ook bij deze tweede proef weer hetzelfde negatieve rusultaat. Dus van homogene en van heterogene immuniteit was geen sprake.

Bij bestudeering van deze door *Miessner* en *Baars* gepubliceerde resultaten, kreeg ik den indruk, dat de door hen

gebruikte dosis bacteriophagencultuur voor het verkrijgen van een homogene immuniteit te groot was. Immers bij een buffel van ± 100 K.g., geeft een injectie van $^1/_4$ cc. van een virulenten bacteriophaag pas na 20 dagen een homogene immuniteit. Doseeringen van $^1/_2$ en 1 cc. bij muizen komen ongeveer overeen met 2500 en 5000 cc. bij een buffel van 100 K.g. *d' Herelle* deelt echter mede dat 20 cc. reeds niet zulk een goede immuniteit geeft, dan een kleinere dosis.

Met het doel de proeven met vlekziektebacteriophaag te herhalen is door *Miessner* zeer welwillend een weinig van een virulenten bacteriophagenstam (No. 1383) en een vlekziektecultuur, waarvoor deze hoogvirulent was, afgestaan. Deze bacteriophaag was in staat volkomen lysis der cultuur teweeg te brengen, zoodat zich geen secundaire cultuur ontwikkelde. Toen de virulentie der cultuur door eenige passages door muizen, was opgevoerd, werd deze weer onderzocht op zijn gevoeligheid voor den bacteriophaag. Daarbij bleek, dat ook nu in een aantal gevallen zich geen secundaire cultuur ontwikkelde, in een ander deel der gevallen echter wel. Daarna heb ik een aantal muizen ingespoten met verschillende zeer kleine doseeringen van dezen virulenten vlekziektebacteriophaag en verschillende tijden daarna $^1/_{10}$ cc. vlekziektecultuur.

Proef 1. 3 muizen werden subcutaan ingespoten met respectievelijk $^1/_{20000}$, $^1/_{10000}$ en $^1/_{5000}$ cc. van den virulenten bacteriophaag. 10 dagen later werd bij deze 3 muizen en bij 3 contrôles, $^1/_{10}$ cc. vlekziektebouilloncultuur subcutaan ingespoten. Alle muizen stierven 5, 6, of 7 dagen daarna. Van eenige immuniteit was dus nog geen sprake.

Proef 2. Bij deze proef werden 4 muizen subcutaan ingespoten met respectievelijk $^1/_{20000}$, $^1/_{10000}$, $^1/_{5000}$ en $^1/_{1000}$ cc. van den virulenten vlekziektebacteriophaag. 15 dagen later werden alle 4, met nog 2 contrôles subcutaan ingespoten met $^1/_{10}$ cc. eener vlekziektebouilloncultuur, geïsoleerd uit een contrôlemuis van groep 1. Alle muizen stierven 5 dagen daarna, dus er was nog geen immuniteit ontstaan bij de met bacteriophaag ingespoten dieren.

Proef 3. 4 muizen werden weer subcutaan ingespoten met respectievelijk $^1/_{20000}$, $^1/_{10000}$, $^1/_{5000}$ en $^1/_{1000}$ cc. van den virulenten vlekziektebacteriophaag. 22 dagen later werden deze 4, met nog 2 contrôles, subcutaan ingespoten met $^1/_{10}$ cc. vlekziektebouilloncultuur, geïsoleerd uit een contrôlemuis van groep 2. Alle 6 muizen stierven weer 5 dagen na de cultuurinjectie.

Proef 4. 4 muizen werden subcutaan ingespoten met respectievelijk $^1/_{20000}$, $^1/_{10000}$, $^1/_{5000}$ en $^1/_{1000}$ cc. van den virulenten vlekziektebacteriophaag. 31 dagen later werden deze 4, met nog 2 contrôles subcutaan ingespoten met $^1/_{10}$ cc. vlekziektebouilloncultuur, geïsoleerd uit een contrôlemuis van groep 3. Alle muizen stierven den 5en of 6en dag na de cultuurinspuiting.

Alle muizen van deze 4 proeven werden op denzelfden dag ingespoten met denzelfden virulenten vlekziektebacteriophaag en verschillende tijden daarna de vlekziektecultuur. Daar alle met bacteriophaag ingespoten muizen denzelfden dag, of 1 dag vroeger of later, dan de contrôlemuizen, zijn gestorven, was dus na 10, 15, 22 en 31 dagen van een homogene immuniteit nog geen sprake.

Teneinde na te gaan, of de bacteriophaag bij vlekziekte aan muizen een heterogene immuniteit geeft, spoot ik muizen in met vlekziektecultuur en op een andere plaats van het lichaam met vlekziektebacteriophaag.

Proef 5. Bij 4 muizen werd $^2/_{10}$ cc. vlekziektebouilloncultuur subcutaan ingespoten en bij 2 ervan respectievelijk $^1/_{100}$ en $^1/_{1000}$ cc. van den virulenten vlekziektebacteriophaag aan de andere zijde, ook subcutaan.

Terwijl de muis, die ingespoten was met $^1/_{100}$ cc. vlekziektebacteriophaag, 3 dagen na de injectie stierf zijn de andere drie eerst 6 dagen na de injectie gestorven.

Proef 6. Bij 4 muizen werd $^1/_{10}$ cc. vlekziektebouilloncultuur subcutaan ingespoten en bij 2 ervan respectievelijk $^1/_{10}$ en $^1/_{100}$ cc. van den virulenten vlekziektebacteriophaag aan de andere zijde, ook subcutaan.

De muis, die was ingespoten met $^1/_{10}$ cc. cultuur en $^1/_{10}$ cc.

vlekziektebacteriophaag, is 8 dagen na de inspuiting daarvan gestorven. De muis die was ingespoten met $^1/_{10}$ cc. cultuur en $^1/_{100}$ cc. bacteriophaag, stierf na 3 dagen en de 2 contrôlemuizen, die enkel met vlekziektecultuur waren ingespoten, na 5 en 6 dagen.

Was bij proef 5 van eenige werking van den bacteriophaag nog geen sprake, bij proef 6 kan men eenige werking constateeren. De muis ingespoten met $^1/_{100}$ cc. vlekziektebacteriophaag, is 2 dagen voor de contrôles gestorven en de muis ingespoten met $^1/_{10}$ cc. vlekziekte bacteriophaag, 3 dagen na de contrôles.

Het geeft dus den indruk, alsof de kleine dosis den dood heeft vervroegd, daarentegen de grootere dosis deze heeft vertraagd. Een opmerkelijk feit is, dat bij de kleinere dosis cultuur in proef 6 gebruikt, eenige werking te onderkennen was, terwijl een dubbele dosis in proef 5 gebruikt, geen verschil gaf. Deze resultaten zijn echter nog lang niet voldoende, om er conclusies uit te trekken. Het vroeger of later sterven van 3 muizen kan zeer goed een toeval zijn geweest.

Wat de heterogene immuniteit betreft, deze acht ik op grond van de door *Miessner* gevonden negatieve resultaten, niet uitgesloten.

Om de onschadelijkheid der gefiltreerde bacteriophagencultuur aan te toonen, werd door *Miessner* een muis ingespoten met $^1/_2$ cc. daarvan. Deze muis bleef in leven, terwijl een muis, die werd ingespoten met $^1/_4$ cc. van dezelfde bacteriophagencultuur, welke niet eerst gefiltreerd was, maar waarin door uitstrijken op agar geen bacteriegroei was aan te toonen, aan vlekziekte stierf. Bij een tweede muis werd dit herhaald en ook toen stierf de muis tengevolge van een injectie van ongefiltreerde bacteriophagencultuur, waarin door uitstrijken op agar geen bacteriegroei was aan te toonen. In de muizen, die waren ingespoten met gefiltreerde bacteriophagencultuur was bij den dood in het bloed geen bacteriophaag aan te toonen, hetgeen wel het geval was bij de twee muizen die waren ingespoten met gefiltreerde bacteriophagen-

cultuur. Bouillonculturen uit het bloed aangelegd bleven steriel. Agarculturen, uit het bloed aangelegd, vertoonden echter bacteriegroei. Bij overenting van deze agarcultuur, in bouillon en op agar, bleven beide echter steriel. Daar deze laatste feiten van groot belang zijn, voor een oordeel omtrent de resistentie der bacteriën in het dierlijk organisme, heb ik 2 muizen ingespoten met ½ cc. van een ongefiltreerde door vlekziektebacteriophaag opgehelderde suspensie van vlekziektebacillen, waarin door uitstreken geen bacteriën meer kon aantoonen. Beide muizen zijn echter gezond gebleven. Hoewel zich af en toe bij proeven met denzelfden bacteriophaag en dezelfde bacteriestam in vitro een duidelijke secundaire cultuur ontwikkelde, kan hier zeer goed de bacteriophaag alle bacteriën opgelost hebben, zoodat geen enkele bacterie werd ingespoten, wat bij de proeven van *Miessner* wel het geval is geweest.

Miessner en *Baars* verklaren de door hen verkregen resultaten, doordat in het lichaam de bacteriën zouden worden beschermd door colloiden, evenals dit op agar en in gelatine geschiedt. Hoewel in de ongefiltreerde bacteriophagencultuur, door uitstrijken op agar geen bacteriën konden worden aangetoond, is dit toch blijkbaar wel het geval geweest. Vermoedelijk hebben de colloiden uit het lichaam op de bacteriën een sterkere beschermende werking uitgeoefend, dan die uit de agar en hebben daardoor de bacteriën zich in het lichaam wel kunnen ontwikkelen, maar in de uitstrijken op agar niet, of men moet aannemen, dat de bacteriën op agar meer direct worden aangevallen.

In ieder geval zijn de bacteriën, die met de ongefiltreerde bacteriophagencultuur zijn ingespoten, resistent geweest tegen den bacteriophaag en daardoor hadden zij minder bescherming noodig, dan niet of weinig resistente bacteriën. Hoewel het zeer goed mogelijk is, dat de colloiden van het lichaam de bacteriën beschermen, of den bacteriophaag remmen in zijn werking, is dit toch voor niet sterk resistente bacteriën, gezien de gunstige resultaten met bacteriophageninspuiting bij andere ziekten

niet voldoende, om deze voor lysis te behoeden. Alleen bacteriën, die reeds vrij resistent zijn tegen den bacteriophaag, zullen door de colloiden zoo beschermd worden, dat ze niet meer opgelost worden. Dit komt volkomen overeen met de meening van *Zdansky*, dat men de resistentie van een bacterie moet beoordeelen, in het milieu, waarin deze in aanraking komen met den bacteriophaag. Dit is voor het dierlijk organisme veelal het serum.

Bij mijn experimenten met vlekziektebacteriophaag heb ik dus evenals *Miessner* en *Baars* geen homogene immuniteit kunnen verkrijgen.

Wat echter de heterogene immuniteit betreft, acht ik de door *Miessner* en *Baars* aangehaalde bewijzen voor een de bacteriën beschermende werking der colloiden niet voldoende om daarom aan den bacteriophaag bij vlekziekte geen rol in de immuniteit toe te kennen. Bewijzen dat dit wel het geval is, heb ik ook niet met zekerheid kunnen leveren. Evenals bij iedere andere ziekte, zullen deze ook bij vlekziekte het beste in de praktijk kunnen worden gebracht.

C. Paratyphus bij muizen

Bij het onderzoek van den Kleinsche ziekte-bacteriophaag, ten opzichte van zijn werkzaamheid op andere bacteriesoorten, werd gevonden dat een paratyphuscultuur, virulent voor muizen, zeer goed werd opgelost.

In de hoop door middel van dezen bacteriophaag, muizen, die met een doodelijke dosis der Paratyphuscultuur waren ingespoten, te kunnen genezen, werden verschillende proeven genomen.

Groep 1. Van 4 muizen, die ieder subcutaan werden ingespoten met $^1/_5$ cc. Paratyphuscultuur, werden 2 tegelijkertijd op een andere plaats van het lichaam subcutaan ingespoten met $^1/_5$ cc. bacteriophaag, die virulent was voor de paratyphuscultuur.

Een der contrôlemuizen, die dus enkel met cultuur was ingespoten, stierf 6 dagen na de injectie daarvan, terwijl de andere 3 muizen reeds 4 dagen na de cultuurinjectie stierven.

Van eenige werking van den bacteriophaag was dus nog geen sprake.

Groep 2. In de veronderstelling, dat de bij groep 1 gebruikte dosis cultuur te groot was, werden bij deze proef 4 muizen ingespoten met $^1/_{00}$ cc. paratyphusbouilloncultuur en 2 daarvan tevens met $^1/_{10}$ cc. paratyphusbacteriophaag, hoogvirulent voor de gebruikte cultuur, subcutaan.

De contrôlemuizen stierven 5 dagen na de injectie, de 2 muizen waarbij tevens cultuur was ingespoten 6 dagen na de cultuurinjectie.

Dus ook hier nog geen werking van den bacteriophaag te bemerken.

Groep 3. Toen ook bij de kleine dosis cultuur, in groep 2 geen verschil te bemerken was, tengevolge van inspuiting van bacteriophaag, werden in deze groep 4 muizen intraperitoneaal ingespoten met $^1/_{100}$ cc. der paratyphusbouilloncultuur en bij 2 ervan tevens $^1/_{10}$ cc. hoogvirulenten bacteriophaag, ook intraperitoneaal.

De 2 contrôlemuizen stierven 4 en 5 dagen na de cultuurinjectie, de 2 muizen waarbij bacteriophaag en cultuur intraperitoneaal was ingespoten, beide 5 dagen na de injectie daarvan. Ook op deze wijze dus geen verschil.

Groep 4. Tenslotte werden 4 muizen 1 dag gevoerd met brood, gedrenkt met paratyphusbouilloncultuur (ieder 2 cc.), nadat 2 ervan daags te voren subcutaan waren ingespoten met $^1/_{10}$ cc. hoogvirulente paratyphusbacteriophaag.

Beide contrôlemuizen stierven 5 en 6 dagen na de voedering der cultuur. De muizen, die tevens bacteriophaag hadden gehad, stierven ook 5 en 6 dagen na de voedering der cultuur.

Op welke wijze cultuur en bacteriophaag ook werden gegeven, met de bovenbeschreven doseeringen, was het niet mogelijk een beschermende werking van den bacteriophaag aan te toonen.

Evenals bij de infectieproeven bij kuikens, is ook bij deze proeven waarschijnlijk de dosis cultuur te groot geweest. Neemt men echter de dosis cultuur kleiner, dan blijft ook een deel der contrôles leven.

D. Vogelcholera

De mooiste resultaten, door *d' Herelle* door middel van den bacteriophaag verkregen, zijn zeer zeker die bij haemorrhagische sceptichaemie der buffels. Het feit, dat kippen en eenden en vooral ook muizen zeer gevoelig zijn voor ovale bacillen, was aanleiding, dat ik in den aanvang mijner onderzoekingen vooral getracht heb een bacteriophaag te isoleeren, virulent voor vogelcholeraculturen. Daarvoor werd eerst faeces onderzocht van een aantal kippen aan het Instituut aanwezig. Toen het niet gelukte, hoe dikwijls ik in vitro volgens de methode van *d' Herelle*, ook versterkte, eenig spoor van een ovale bacillenbacteriophaag aan te toonen, heb ik getracht deze in vivo virulent te maken. Daarvoor werden 3 kippen aan het Instituut eenige dagen met een zeer geringe dosis bouilloncultuur van vogelcholerabacillen gevoerd. Reeds spoedig stierven 2 dezer kippen, zonder dat ik in de faeces een ovale bacillen bacteriophaag kon aantoonen. De derde kip is ondanks dat nog eenige malen cultuur werd gevoerd, blijven leven, maar ook bij deze heb ik geen bacteriophaag aan kunnen toonen voor vogelcholerabacillen.

Tijdens de onderzoekingen omtrent Kleinsche ziekte werden daarvoor een aantal monsters faeces onderzocht op de aanwezigheid van Kleinsche ziekte bacteriophaag. Dezelfde faeces werd ook onderzocht op de aanwezigheid van ovale bacillen bacteriophaag, maar telkens met negatief resultaat.

Ten slotte werden een kip en een eend, afkomstig uit Oostzaan, van een eendenhouderij, waar enkele eenden aan cholera waren gestorven, eenige dagen gevoerd met $^1/_{10}$ cc. ovale bacillen bouilloncultuur.

Beide zijn echter gestorven, zonder dat ooit in de faeces een ovale bacillen bacteriophaag was aan te toonen.

Het isoleeren van een cholerabacteriophaag is dus zeer zeker niet eenvoudig.

HOOFDSTUK IV

ALGEMEENE BESCHOUWINGEN EN CONCLUSIES

Een van de voorname bewijzen van *d' Herelle* voor zijn meening, dat de bacteriophaag een rol speelt in de immuniteit, waren de gunstige resultaten, door hem verkregen bij de bestrijding der Kleinsche ziekte bij kippen, door middel van inspuiting van bacteriophagencultuur. Deze resultaten kon ik in een groot aantal der door mij behandelde gevallen bevestigen. Vooral de chronische veranderingen, die dikwijls optreden, zijn bij een beoordeeling der resultaten zeer in acht te nemen.

De directe werking van de inspuiting der bacteriophagencultuur, waardoor bijna plotseling een einde komt aan de sterfte is het beste bewijs, dat de genezende werking niet berust op bacterieproducten, die in de bacteriophagencultuur aanwezig zijn, maar op een directe lysis der ziekteveroorzakende bacteriën, door den bacteriophaag.

Uit verschillende proeven van *Miessner* en *Baars* blijkt wel, dat colloiden in het lichaam de bacteriën beschermen, of de bacteriophaag remmen in zijn werking. Dit is echter voor gevoelige bacteriën niet voldoende, deze zullen ondanks de beschermende werking toch door den bacteriophaag worden opgelost. Een bacteriestam, met een zekere resistentie, zal zich daardoor echter vrijwel ongestoord kunnen ontwikkelen en den dood van het geinfecteerde organisme veroorzaken, hoewel in een eiwitarm milieu de bacteriophaag de cultuur wel

degelijk op zou lossen. Deze beschermende werking van de colloiden zou berusten op de grootere viscositeit.

Op deze wijze zijn waarschijnlijk de resultaten van *d' Herelle* bij coliïnfecties verkregen, wel te verklaren. Bij direct in contact brengen van den bacteriophaag met de colibacillen in den blaas, zullen deze worden opgelost, omdat de urine in ieder geval eiwitarm is. Bij inspuiting echter komt de bacteriophaag in aanraking met de colloiden van het lichaam en deze zouden hem op een of andere wijze in zijn werking remmen.

In ieder geval zal men bij beoordeeling van de resistentie van bacteriën ten opzichte van den bacteriophaag, dit moeten doen in het mileu, waarin in vivo beide met elkaar in contact komen, dus in vele gevallen bloed of bloedserum.

Hiermee is in overeenstemming de mededeeling, dat bacteriën, die in serum resistent zijn, in bouillon dikwijls nog opgelost worden.

Niet alleen in de practijk, maar ook op laboratoria zijn proeven genomen, om de preventieve of de curatieve waarde van den bacteriophaag aan te toonen. Een opmerkelijk feit is het, dat alleen bij staphylococcen de ingespoten staphylococcen-bactheriophaag de experimenteele infectie met staphylococcen kan verhinderen. Alle andere op laboratoria ondernomen proeven, waarbij muizen werden geïnfecteerd en voor of na de infectie met virulenten bacteriophaag voor de infecteerende bacteriën werden behandeld, mislukten.

Ook bij mijn proeven met paratyphus en vlekziekte bij muizen, kreeg ik dezelfde negatieve resultaten. Proeven met kuikens gaven slechts enkele malen een geringe gunstige werking. Bij al deze proeven bleven namelijk, wanneer de dosis cultuur te klein werd genomen, ook een aantal contrôledieren in leven. Toen bij een aantal contrôlekuikens in de faeces een virulenten of een tamelijk virulenten bacteriophaag kon worden aangetoond, werd het waarschijnlijk, dat zich bij de contrôledieren ook een bacteriophaag in den darm ontwikkelt uit een bacteriophaag, die virulent was voor een andere bacteriesoort,

of dat een avirulente Kleinsche ziekte-bacteriophaag weer virulent werd. Hiermee in overeenstemming waren de resultaten bij kippen, die op de een of andere wijze Kleinsche ziekte-culturen werd toegediend en waarbij daarna het verloop der virulentie van den bacteriophaag voor de Kleinsche ziekte-cultuur werd nagegaan. Daarbij bleek, dat de meeste dieren, die aanvankelijk geen aantoonbare Kleinsche ziekte-bacteriophaag in de faeces hadden, deze na toediening der cultuur in de meeste gevallen toch kregen.

Op deze wijze zijn dan ook de zeer wisselende resultaten van infectieproeven bij kippen en muizen met Kleinsche ziekte-culturen te verklaren.

Ontwikkelt zich echter geen virulenten bacteriophaag, dan is een zeer kleine dosis cultuur voldoende, om den dood van het geïnfecteerde dier te veroorzaken. Wanneer in de faeces een virulenten bacteriophaag aanwezig is, beschermt deze het organisme tegen groote hoeveelheden infecteerende, voor den bacteriophaag sensibele bacteriën, zooals *d' Herelle* bij zijn contrôle-experimenten zeer duidelijk aantoonde en hetgeen ik kon bevestigen.

Verder bleek, dat de toestand van het geïnfecteerde dier volkomen samenhangt met de verhouding der virulentie van den bacteriophaag ten opzichte van de infecteerende bacteriën. Wordt het dier ziek, dan is in de faeces geen bacteriophaag aanwezig, die de infecteerende bacteriën op kan lossen. Zoodra dit echter wel het geval is, gaat de toestand van het dier weer vooruit, tenzij groote veranderingen zijn opgetreden.

Ik kan dan ook de meening van *d' Herelle*, omtrent de rol van den bacteriophaag in de immuniteit volkomen bevestigen, maar moet daarbij vooral wijzen op de groote beteekenis der chronische veranderingen, die juist in de practijk der Kleinsche ziekte en Pulloruminfecties zooveel voorkomen.

De meeste bewijzen voor de rol van den bacteriophaag in de immuniteit, zullen verkregen moeten worden, door zijn preventieve en curatieve waarde in de practijk na te gaan.

CONCLUSIES

De toestand van een geïnfecteerd dier hangt volkomen samen met de virulentie van den bacteriophaag voor de infecteerende bacteriën.

Wanneer de bacteriophaag niet tamelijk spoedig na een infectie virulent wordt, of niet tijdig wordt ingespoten, zijn reeds zoodanige veranderingen opgetreden, dat hij het voortgaan der infectie niet meer kan belemmeren.

Infectieproeven op het laboratorium, om de waarde van een preventieve of curatieve toediening van bacteriophaag na te gaan, mislukken in de meeste gevallen, omdat zich bij de contrôledieren veelal ook een virulenten bacteriophaag in den darm ontwikkelt, waardoor vergelijkingen niet goed meer mogelijk zijn.

De door *Miessner* en *Baars* aangevoerde bewijzen, dat de bacteriophaag tengevolge van de werking der colloiden geen rol zou spelen in de immuniteit, zijn alleen juist voor tamelijk resistente bacteriën.

De meeste bewijzen voor de rol van den bacteriophaag in de immuniteit, zullen moeten worden verkregen door zijn preventieve en curatieve waarde in de spontane ziektegevallen na te gaan, daar de experimenteele infectie een geheel onjuiste nabootsing der spontane is.

De Kleinsche ziekte-bacteriophaag speelt zeer zeker een groote rol in de immuniteit bij de Kleinsche ziekte.

De Kleinsche ziekte-bacteriophaag is een zeer geschikt middel ter bestrijding der Kleinsche ziekte in de practijk.

HOOFDSTUK V

LIJST DER GEBRUIKTE LITTERATUUR

Le bacteriophage, son role dans l' immunité par F. d' Herelle.

The bacteriophage and its role in immunity by F. d' Herelle.

Immunity in natural infectious disaeses, by F. d' Herelle.

Dr. N. van der Walle. Nieuwere onderzoekingen over den bacteriophaag. Ned. Tijdschr. voor geneesk., 1923, 2e helft No. 6.

Wolff en Janzen. Over den typhusbacteriophaag. Ned. Tijdschr. voor Geneesk. 1922, 2e helft No. 17.

Watanaba. Wien. Klin. Woch. 1921, bladz. 447.

Putten en Vallen. Klin. Woch. 1923.

Botez. La bacteriolyse en séries par le violet de méthyle. Comt. Rend. de Soc. de Biol. 1921, 85, bladz. 585.

Otto—Munter—Winkler. Zeitschr. f. Hyg. 1922, Bd. 96, bladz. 118.

Weinberg en Otolesco. Autobacteriolysines et le phénomene de d' Herelle. C. R. de S. de B. 1922, 86, bladz. 833.

Weinberg en Azner. Quelques faits nouveaux sur les autolysines. C. R. de S. de B. 1922, 87, bladz. 135.

Gildemeister. Ueber das d' Herelleschen Phänomen. Berl. Klin. Woch. No. 46, 1921, blz. 1555.

Bail. Ueber Shiga-Bakteriophagen. Wien. Klin. Woch. 1921, bladz. 555.

Pico. Sur la nature du principe bacteriophage de Twort—d' Herelle. C. R. de S. d. B. 1922. 86, bladz. 886.

Beckerich en Hauduroy. Sur l' obtention de bacteriophage par l' antagonisme microbien. C. R. de S. de B. 1922, 87, p. 1124.

Ogatha. Zur Entstehung des bacteriophagen in alten Reinculturen. Centralbl. f. Bact. etc. Bd. 93, 1924, deel 5.

Flu. Een methode van onderzoek van reinculturen op besmetting met bacteriophaag. Tijdschr. v. Verg. Geneesk. Deel X, 1924.

Pondman. Proeven tot het verkrijgen van het verschijnsel van d' Herelle uit Reinculturen. Dissertatie Leiden.

Praussnitz. Untersuchungen über den d' Herelleschen bakterioph. Centralbl. f. Bakt. etc. Abt. 1. OR. Bd. 89, bladz. 187.

Flu. Kunnen bacteriophagen door een 3 % agargel diffundeeren. Tijdschr. voor Vergel. Geneesk. Deel X, afl. 4, 1924.

Beckerich en Hauduroy. Au sujet du titrage du bacteriophage. C. R. de S. de B. 1922, 86, bladz. 165.

Eliava en Pozerski. De l' action destructive des sels de quinine sur le bacteriophage de d' Herelle, C. R. de B. 1921, 85, bladz. 139.

Bablet. Sur le principe bacteriophage de d' Herelle. C. R. de S. de B. 1920, 83, bladz. 1322.

Otto en Munter. Ueber die Natur des d' Herelleschen Bakterioph. Deutsch. Med. Woch. 1921, bladz. 1579.

De Necker. De l' absorption du principe bacteriophage par les colloides. C. R. de S. de B. 1922, 87 bladz. 1247.

Nakamura. Die Hemmung der bakteriophagenwirkung durch Gelatine. Archiv. f. Hyg. 1923, Bd. 1923. Bd. 92, bladz. 61.

Meissner. Die bindungsverhältnisse zwisschen bakteriophagen und bakterien. Centralbl. f. Bakt. etc. Orig. Bd. 93, deel 7/8.

Otto en Munter. Das bakteriophagenlysin, etc. Zeitschr, f. Hyg. und Inf. Bd. 98, 1922, bladz. 302.

Otto—Munter—Winkler. Beitrage zum d' Herelleschen phänomen. Zeitschr. f. Hyg. und Inf. 1922, Bd. 96, bladz. 118.

v. Angerer. Beitrage zum Bakteriophagenproblem. Arch. f. Hyg. 1924. Bd. 2, bladz. 312.

Wolff en Janzen. Action de divers antiseptiques sur le bacteriophage de d' Herelle. C. R. de S. de B. 1922. 87, bladz. 1087.

De Necker. De l' unfluance de la chaleur sur le principe bacteriophage. C. R. de S. de B. 1922, 86, bladz. 736.

Haudaroy. Influence du chauffage sur le bacteriophage de d' Herelle. C. R. de S. de B. 1922. 87, bladz. 1089.

Dörr en Grüninger. Studien zum Bakteriophagenproblem. Zeitschr. f. Hyg. und Inf. 1922 Bd. 97, bladz. 209.

Gildemeister en Herzberg. Zur theorie der Bakteriophage. Centralbl. f. Bakt. etc. Orig. Bd. 93, 1924, bladz. 402.

Marcuse. Klin. Woch. 1922, bladz. 2452.

Flu. Over de thermoresistentie van bacteriophagen enz. Tijdschr. v. Vergel. Geneesk., Deel X, Afl. 4, 1924.

Hauduroy. Sur les lysines du bacteriophage de d' Herelle. C. R. de S. de B. 1922. 87, bladz. 964.

Okuda. Ueber Pyocyaneusbakteriophagen. Arch. f. Hyg. Bd. 92, 1923, bladz. 109.

Bürgers en Bachmann. Bakteriophagenstudien. Zeitschr. f. Hyg. Bd. 101, 1924, bladz. 350.

Meier. Mond- en klauwzeerbacteriophaag. Tijdschr. v. Diergen. 1925. Afl. 7.

Flu. Over cholerabacteriophagen. Tijdschr. v. Verg. Geneesk. Deel X.

Lisch. Ueber die sogenannten Pyocyaneusbakteriophagen. Centralbl. f. Bakt. Or. Bd, 93, 6,

Pesch. Milzbrand-pseudobakteriophagen. Centralbl. f. Bact. Or. Bd. 93, blz. 525.

Kabeshima. Sur un ferment d' immunité bacteriolysant, etc. C. R. de S. de B. 1920, 83, bladz. 210 en bladz. 471.

Bordet en Ciuca. Le bacteriophage de d' Herelle, son production et son interpretation. C. R. de S. de B. 1920, 83, bladz. 1296.

Borchardt. Biologische Beitrage zum d' Herelleschen Phanomen. Zeitschr. f. Immunitatsforsch. Or. Bd. 37, Deel 1 en 2.

Flu. Tryptische fermenten en bacteriophaag. Tijdschr. v. Verg. Geneesk. Deel X, Afl. 2 en 3, bladz. 189.

Keller. Trypsin und Lysin. Zeitschr. f. Hyg. 1924. Bd. 103, bladz. 177.

Davisson. Observations on the properties of bacteriolysants. Journal of Bact. 1922. Part 1, pag. 478.

Herderschee en Wolff. Geneeskrachtige waarde van den Typhusbacteriophaag enz. Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1924, No. 24.

Beckerich en Hauduroy. Le bacteriophage de d' Herelle, etc. Journal of Bact. 1923, bladz. 163.

Miessner en Baars. Paratyphusbacteriophaag. Deutsch. Tierarztl. Woch. No. 16, bladz. 211, 1922.

Bruynoghe en Maisin. Essais de therapeutique au moyen du bacteriophage du staphylococce. C. R. de S. de B. 1921. 85, bladz. 1120.

Gratia. La lyse transmissible du staphylococce. etc. C. R. de S. de B. 1922, 86, bladz. 276.

Appelmans. Le dosage du bacteriophage. C. R. de S. de B. 1921. 85, bladz. 1098.

Appelmans. Quelques applicaticns de la methode de dosage du bacteriophage. C. R. de S. de B. 1922, 86. bladz. 508.

Piorkowsky. Beitrage zur Streptococcenfrage enz. Med. Klin. 1922, S. 474.

Miesner en Baars. Das d' Herelleschen Phanomen an Rotlaufbakt. Centralbl. f. Bakt. u. Paras. Bd. 93, 1924, deel 1—4.

Zdansky. Krit. und Exp. Beitrage zur Frage der Wirkungsmöglichkeit des Bakteriophagen im Warmblutorganismus u. s. w. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. 1924, Bd. 103, bladz. 164.

Doerr en Grüninger. Experimentelle Untersuchungen über die beziehungen von bakteriën und bakteriophagen zur Galle. Zweizer. Med. Woch. 1922, bladz. 761.

Marcuse. Grundlagen und Aufgaben der Lysintherapie. Deutsch. Med. Woch. 1924, bladz. 334.

Bruynoghe et Maisin. Au sujet de la reaction consécutive aux injections du bacteriophage. C. R. de S. de B. 1922, 86, bladz. 294.

Gratia en Jaumain. Au sujet des reactions consécutives aux injections du principe lytique staphylococcique. C. R. de S. de B. 1922, 86, bladz. 519.

Van Straaten en Ten Hennepe. De Kleinsche kippenziekte. Mededeelingen der Rijksseruminrichting 1917. Deel 1. Afl. 2.

Hadley. The colon-typhoidintermediates as causative agents of disaese in birds. Agricult. Exp. Stat. of the Rhode Island State Coll. No. 174.

May. The examination of egss from infected and immunized hens, etc. Agric. Exp. Stat. of the Rhode Isl. State Coll. 197.

STELLINGEN

I

De bacteriophaag speelt een groote rol in de immuniteit bij Kleinsche ziekte en pullorum infecties en is een goed middel ter bestrijding daarvan.

II

Een onpartijdig wetenschappelijk onderzoek naar, en een geregelde contrôle betreffende de waarde van alle zoowel in staatsinstituten als in particuliere Instituten bereidde sera en vaccins is noodzakelijk en geeft de grootste waarborg aan arts en dierenarts voor de toepassing daarvan.

III

Voor een meer economische uitvoering van de vleeschkeuring verdient het aanbeveling, bij het bacteriologisch vleeschonderzoek de gekweekte microorganismen, waar mogelijk, te determineeren en een mildere beoordeeling voor te schrijven.

IV

Bij secties op varkens met een hevige acute gastritis vindt men dikwijls een flink met voedsel gevulde maag.

V

Punctie van de groote magen der herkauwers dient zoo weinig mogelijk te geschieden.

VI

De methode ter beoordeeling van mannelijke fokrunderen waarbij gebruik wordt gemaakt van een indeeling in klassen, zooals deze is gebruikt bij de laatste districtskeuring in Gelderland, is te verkiezen boven de tot nu toe gevolgde.

VII

Een nadere bestudeering der methode Pondorff ter genezing van tuberculose is zeer gewenscht. Hiervoor dienen proeven op runderen en andere dieren op uitgebreide schaal genomen te worden.

VIII

Bij de behandeling van hoefkanker, waarbij belangrijke woekeringen van de hoefmatrix voorkomen, geniet het gebruik van salicylzuur de voorkeur boven sulfoliquid.

IX

Een algeheele uitroeiing der strongylose bij paarden is practisch gesproken onmogelijk.
