Utrecht University Library
Partner in Science
Universiteit Utrecht

De primaire cultuur van den bacillus tuberculosus typus bovinus en hare diagnostische waarde

https://hdl.handle.net/1874/301613

A. qu. 192. 1931.

DE PRIMAIRE CULTUUR VAN DEN BACILLUS TUBERCULOSUS TYPUS BOVINUS EN HARE DIAGNOSTISCHE WAARDE

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT

J. VAN WOERDEN

DE PRIMAIRE CULTUUR VAN DEN BACILLUS TUBERCULOSUS TYPUS BOVINUS EN HARE DIAGNOSTISCHE WAARDE

DE PRIMAIRE CULTUUR VAN DEN BACILLUS TUBERCULOSUS TYPUS BOVINUS EN HARE DIAGNOSTISCHE WAARDE

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN

DOCTOR IN DE VEEARTSENIJKUNDE

AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS **DR. L. S. ORNSTEIN**, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER VEEARTSENIJKUNDE TE VERDEDIGEN OP **WOENSDAG *25 NOVEMBER 1931***, *DES NAMIDDAGS* TE 4 UUR DOOR

JAN VAN WOERDEN

DIERENARTS — ADJUNCT-DIRECTEUR VAN HET GEMEENTE-SLACHTHUIS TE ARNHEM — GEBOREN TE NAALDWIJK

1931

DRUKKERIJ Fa. SCHOTANUS & JENS, UTRECHT

BIBLIOTHEEK DER RIJKSUNIVERSITEIT UTRECHT.

Aan mijn Ouders.

Bij het verschijnen van dit proefschrift, voel ik mij gedrongen mijn groote erkentelijkheid te betuigen jegens allen, die aan de vorming van mijn geest hebben bijgedragen.

Het zij mij echter vergund U, Hooggeleerde VAN OYEN, Hooggeachte Promotor, mijn bijzonderen dank te betuigen voor het vele, wat Gij voor mij geweest zijt en gedaan hebt.

Uw groote belangstelling, welwillende steun en aansporing tot onderzoek, gepaard met Uw vriendschappelijken omgang, zullen steeds in dankbare herinnering blijven; in de jaren van mijn assistentschap aan Uw laboratorium werd de vaste grondslag gelegd, welke bij mijn dagelijkschen arbeid zoo zeer van noode is.

U, Hooggeleerde SCHORNAGEL, betuig ik mijn hartelijken dank voor de door U steeds getoonde belangstelling; Uw bijdrage, tot vermeerdering van mijn kennis op het gebied der pathologie, zal mij in mijn werkkring tot grooten steun zijn.

U, waarde collega's HOOGLAND en TEN THIJE zeg ik hartelijken dank voor Uw vriendschappelijke houding jegens mij en voor de raadgevingen, welke ik in zoo ruime mate mocht ontvangen.

Tenslotte dank ik de heeren WATRIN en JONGERIUS voor de steeds zoo bereidwillig verleende technische hulp.

HOOFDSTUK I.

INLEIDING.

Het behoeft geen betoog, dat een snelle, gemakkelijke en afdoende methode voor het aantoonen van tuberkelbacillen in pathologische producten, een groote aanwinst zou zijn, zoowel voor de kliniek, als voor alle inrichtingen die zich met het onderzoek der tuberculose hebben bezig te houden.

In het bijzonder in gevallen, waar twijfel bestaat over het oorzakelijk moment, zou deze nieuwe vinding van veel nut zijn.

In veel gevallen kan men met een eenvoudig onderzoek de tuberkelbacil niet aantoonen, doordat deze slechts in gering aantal aanwezig is; in andere is het niet kunnen aantoonen allerminst een bewijs voor het niet aanwezig zijn. Twijfel blijft zóó lang bestaan als geen agens is aangetoond.

Een van de secreta, waarvoor deze moeilijkheid in zeer sterke mate geldt, is melk en nog meer geldt dit, indien een onderzoek gevraagd wordt van de z.g. „mengmelk". Een andere onderzoekmethode dan de, om vele redenen minder gewenschte dierproef, is hier uitgesloten.

Door velen, die zich met de bestrijding der tuberculose en daarbij met het onderzoek van melk op tuberkelbacillen bezighouden, zal een vooruitgang op dit gebied, zeer zeker op prijs worden gesteld.

Ook voor hen, wier werkzaamheden liggen op het gebied der vleeschhygiene, zou een goede methode een juister uitvoeren van hun taak mogelijk maken.

Bij het beoordeelen van vleesch toch, afkomstig van dieren

met bepaalde vormen van tuberculose, moet men een uitspraak doen aan de hand van pathologisch-anatomische afwijkingen, en het zal niet ontkend worden, dat de mogelijkheid van het direct aantoonen van een bacillaemie een juister beoordeeling van deze ziekte mogelijk zou maken.

Het is daarom verheugend, dat in de laatste jaren een vooruitgang in deze richting te bespeuren valt.

De meeste onderzoekers houden zich bezig met materiaal van menschelijk origine, doch ook dierlijk materiaal is in dit opzicht reeds een studie object geweest.

Bij deze onderzoekingen heeft men getracht, de cultuur een grootere plaats in de diagnostiek van de tuberculose te laten innemen, dan tot nu toe het geval was.

Het doel van dit onderzoek is, een gemakkelijke en snelle methode voor de primaire cultuur van het bovine type van den tuberkelbacil te verkrijgen.

In de eerste plaats zal nagegaan worden, welke voedingsmedia bij deze primaire cultuur de beste resultaten geven en ook zal de invloed van wijzigingen in de samenstelling van den gebruikten bodem, welke in den laatsten tijd worden aanbevolen, worden onderzocht.

Daarna zal getracht worden de vraag te beantwoorden, welke techniek voor het verkrijgen van een reincultuur van tuberkelbacillen uit verontreinigd materiaal, het meest geschikt is; en in aansluiting hiermede, zullen de gevonden resultaten getoetst worden aan een aantal monsters melk, afkomstig van dieren met ernstige vormen van tuberculose.

Dieren met klinisch waarneembare uiertuberculose worden van dit laatste onderzoek evenwel uitgesloten.

Een ander belangrijk voedingsmiddel van dierlijken oorsprong — het vleesch — is tenslotte eveneens in dit onderzoek opgenomen, waarbij getracht is de cultuurmethode in te voeren.

HOOFDSTUK II.

METHODEN VOOR HET AANTOONEN VAN TUBERKELBACILLEN.

Voor het aantoonen van tuberkelbacillen zijn drie methoden gebruikelijk,

a. *Microscopisch*, b. *Cultureel*, c. *Dierproef*.

In dit onderzoek wordt de cultuurproef aan een nader onderzoek onderworpen, maar in verband met de hierbij toegepaste contrôleproeven door middel van de beide andere methoden is een korte beschouwing van deze twee methoden hier wel op zijn plaats.

a. *Microscopische methode:*

Bij een positieve bevinding is deze methode eenvoudig en afdoende, behoudens de mogelijkheid van vergissing met saprophytische zuurvaste bacillen, waartegen men soms de noodige maatregelen kan nemen (b.v. aseptische methode van verzamelen).

Bij een negatieve uitkomst is men evenwel niet veel verder gekomen en speciaal bij die secreta, waarin als regel weinig bacillen voorkomen, hetzij door verdunning of anderszins, zegt deze uitspraak weinig, gezien de geringe hoeveelheid materiaal die men onderzoekt.

Een eenvoudige berekening van *Klein* demonstreert dit wel zeer duidelijk.

Een dekglaasje van 18 m.M. in het vierkant bevat bij een

gebruikelijke vergrooting ruim 16.000 gezichtsvelden en gewoonlijk is 4 à 5 m.gr. materiaal benoodigd voor het uitstrijken over dit oppervlak.

Indien we dus één bacil per gezichtsveld vinden, beteekent dit, dat in 5 m.gr. van het onderzochte materiaal 16.000 bacillen of per gram 3.2 millioen voorkomen.

Komen er per gram b.v. eens ruim 3000 bacillen voor, dan is het mogelijk, dat we duizend gezichtsvelden doorzoeken moeten om een bacil te vinden en een juiste uitkomst te verkrijgen. Dit zou bij nauwkeurig werken ongeveer een onderzoek vereischen van ongeveer 1½ uur.

Bij deze berekening is dan nog geen rekening gehouden met het feit, dat de bacillen in hoopjes van 3 à 4 en meer voor kunnen komen, waardoor de verhoudingscijfers respectievelijk 3 à 4 maal ongunstiger kunnen worden.

In overeenstemming met dit resultaat is de een enkele maal gehoorde bewering, dat slechts na een bacterioscopisch onderzoek van één à twee uur een gemotiveerd negatieve uitspraak gedaan kan worden. De dikwijls vermelde zinsnede, dat in het onderzochte materiaal geen bacillen voorkomen, blijkens zorgvuldig verricht onderzoek, moet altijd met eenige reserve worden opgevat.

Een volledig onderzoek van een geheel preparaat zou een geheelen dag vereischen.

Het is derhalve wel duidelijk, dat voor enkele se- en excreta een uitgebreide toepassing dezer methode niet in aanmerking kan komen.

c. *Dierproef.*

In tegenstelling met de vorige methode wordt door velen deze proef als een zeker en vast diagnosticum aangemerkt. Speciaal bij die gevallen, waarbij men met het microscopische onderzoek niet tot een resultaat kan komen, wordt vaak de caviaproef als beslissend hulpmiddel aangewend.

Het cavia-experiment heeft echter de directe nadeelen, die aan het gebruik van proefdieren verbonden zijn en speciaal in

dit geval verhinderen de hooge kosten, ruimte voor stalling, intercurrent sterven, lange duur en zoo men niet over een eigen fokkerij beschikt, de moeilijkheid om aan het noodige materiaal te komen, een uitgebreide toepassing. Daarnaast zijn er evenwel nog andere bezwaren.

Hoewel het blijkens de literatuur gelukt is, om door het inbrengen van één tuberkelbacil bij de cavia tuberculose te verwekken en dit dus wijst op een zeer groote gevoeligheid voor het tuberculose virus, staan hier toch vele besliste mededeelingen tegenover, die dit gegeven zeer twijfelachtig maken.

Thoeni en *Theissen* hebben o.a. 19 caviae met 1 tot 75 bacillen subcutaan ingespoten en slechts bij één cavia ontstond één tuberculeuze haard, n.m.l. die waarbij 71 bacillen waren ingespoten.

Calmette (4), wiens oordeel hier wel als beslissend genomen mag worden, zegt, dat het gemiddeld aantal bacillen, noodig om een cavia te infecteeren, varieert en in *zeer sterke mate* afhangt van de virulentie en eveneens van het gewicht en den leeftijd van de cavia; de mededeelingen over infecties met één bacil zijn onjuist en bij zeer virulente culturen heeft men meestal nog 50 bacillen noodig.

Naast deze gegevens met scherp afgemeten hoeveelheden gecultiveerde bacillen staan mededeelingen van miswijzingen en niet aanslaan der infecties bij injectie met natuurlijk geïnfecteerd materiaal.

Korthoff (27), die met bacillenarm materiaal werkt, vindt in een reeks bij 17 positieve monsters 5 maal een negatieve caviaproef, wat dus een zeer aanzienlijk percentage is (30 %).

Van Riemsdijk (48) vermeldt een geval, met duidelijke niertuberculose, waarbij de cavia niet reageerde op de inspuiting met urine sediment, hoewel blijkens cultureel onderzoek wel tuberkelbacillen in de urine voorkwamen.

Kemkes injecteerde 23 positieve secreta bij 46 caviae, en vond bij twee caviae duidelijk tuberculose, terwijl de parallelcaviae geen reactie vertoonden. In één geval bleven beide caviae zonder eenige reactie, hoewel ook in dit laatste

geval caviapathogene tuberkelbacillen in het secretum aanwezig waren.

Op de 46 ingespoten caviae dus 4 miswijzingen of 7 %.

Knorr constateerde bij 157 positieve secreta 7 d.i. 4.5 % miswijzingen.

Soortgelijke mededeelingen doen *Matthis, Klieuwe, Römer, Sumiyoshi, Marion, Sonnenschein, Sütterlin, Long, van Deinse, Jakobsthal* e.a. Deze mededeelingen betreffen alleen materiaal van menschelijk origine.

Van veterinaire zijde is een mededeeling van *Wolthers* en *Dehmel*, die 234 caviae met melksedimenten inspoten. De dierproef bleek ten allen tijde positief te zijn als de cultuur een positief resultaat opleverde.

In 9 gevallen vertoonde de cavia geen reactie, hoewel zij een zuurvast staafje kweekten, hetwelk zij als typus gallinaceus meenden te moeten diagnosticeeren.

Bij *Clarenburg* (6) komt een mededeeling voor, dat ingespoten sputum geen reactie teweegbracht, hoewel hierin blijkens cultureel onderzoek toch tuberkelbacillen voorkwamen. *Clarenburg* wijst op de mogelijkheid, dat toevallig in het geïnjecteerde materiaal geen tuberkelbacillen voorkwamen, wat bij sputum niet geheel onmogelijk is.

Een systemathisch onderzoek naar de betrouwbaarheid van de caviaproef kan natuurlijk alleen met bacillenarm materiaal ingesteld worden en hangt dan zoo zeer van het toeval af, dat men eigenlijk op „goed geluk" moet werken, wat een ruim gebruik van proefdieren vereischt, terwijl men evenmin nog over een goede en afdoende contrôlemethode de beschikking heeft.

De meeste mededeelingen zijn dan ook toevallige vondsten.

In de reeks van proeven is door mij, ook als toevallige vondst, éénmaal een miswijzing, die zeer duidelijk spreekt, bij de caviaproef, geconstateerd.

Van 100 c.c. normaal uitziende melk zonder microscopische afwijkingen, zonder tuberkelbacillen in 't Ziehl Neelsen-preparaat, wordt het sediment voor de helft bij een cavia sub-

cutaan en intramusculair geïnjicieerd, terwijl de andere helft voor het aanleggen van culturen gebruikt wordt.

De cavia vertoonde na acht weken geen enkele afwijking; ook het microscopisch onderzoek der regionale lymphklieren was negatief.

De aangelegde culturen vertoonden na drie weken bij microscopisch onderzoek een duidelijke rijkdom van tuberkelbacillen, terwijl na ongeveer 4 weken op elken bodem zich 30 tot 40 tot 50 koloniën ontwikkeld hadden, speciaal bij het condensvocht. In het geheel waren uit de eene helft van het sediment ongeveer 200 koloniën gegroeid (6 bodems).

De geïsoleerde cultuur bleek caviapathogeen te zijn; na zes weken stierf het betreffende proefdier aan algemeene tuberculose.

In tegenstelling met het geval van *Clarenburg*, kan hier niet gedacht worden aan een zoodanige verdeeling van de tuberkelbacillen in het sediment en of de melk, dat de geïnjicieerde helft vrij van tuberkelbacillen geweest zou zijn. Dit geval is veel klemmender.

Hier toch groeiden, na verdeeling op elk van de 6 daarvoor in aanmerking komende bodems, een betrekkelijk groot aantal koloniën.

De hoeveelheid sediment bij de cavia geïnjicieerd, kan zeer zeker grooter geacht worden dan de hoeveelheid geënt op de cultuurbodems. Door verdunning met physiol. NaCl-oplossing kan men vrijwel alle sediment met een injectiespuit opzuigen en injicieeren; doch bij het uitnemen van een platina naald of öse uit een sedimentbuisje voor het overbrengen op de cultuuroppervlakte, blijft een betrekkelijk groot gedeelte in het sedimentbuisje achter.

Er mag eveneens aangenomen worden, dat elke kolonie correspondeert met meer dan één bacil. Er zijn gegevens, waarbij men aanneemt, dat slechts 250 tuberkelbacillen een kolonie vormen *(Klein)*.

We hebben hier dus een duidelijk geval van een apart opgevangen, niet verdund melkmonster, hetwelk vrij veel cavia-

pathogene tuberkelbacillen bevat, terwijl het sediment van 50 c.c. geen tuberculose bij de cavia verwekt.

De zekerheid van de dierproef is dus allerminst absoluut en *Knorr* uit dit met de volgende woorden:

„In der Zahl der Veröffentlichungen über den Wert der einzeln biologischen Methoden, zum Nachweis von Tuberkelbazillen kann man die widersprechendsten Ergebnisse finden. Sie können veranlassen, dasz man starke Zweifel in den Wert dieser biologischen Nachweismethoden überhaupt setzt."

b. *Cultuurproef:*

Na verschillende vergeefsche pogingen slaagde *Koch* er in de tuberkelbacil op gestold runderserum te cultiveeren, maar de resultaten waren zoodanig, dat hij verklaarde, dat de cultuur van de tuberkelbacil geen groote rol in de studie der tuberculose zou spelen.

Na *Koch* hebben velen zich hiermede beziggehouden en vele verbeteringen aangebracht, maar desondanks is de cultuur nog geen algemeen gebruikte onderzoekmethode geworden. Toch valt gedurende de laatste jaren hierin eenige verandering te bespeuren door de ontdekking van *Löwenstein* en *Hohn* en vooral nu de laboratoria voor onderzoek van menschelijke se- en excreta deze cultuurmethoden gaan invoeren.

De groei van de tuberkelbacil is zeer traag en het cultiveeren uit materiaal, hetwelk tevens snelgroeiende begeleidende bacteriën bevat, is door deze overgroeiers onmogelijk.

Men zal vooraf deze snelgroeiende kiemen òf moeten verwijderen òf moeten dooden door een bepaalde voorbehandeling, terwijl de tuberkelbacil door deze voorbehandeling niet of in zeer geringe mate aangetast wordt, zoodat de groeikracht van deze laatste niet ongunstig beïnvloed wordt.

Op deze grondslagen berusten de vele uitgedachte methoden. Als meest bekende geldt wel de ook als „Anreicherungsverfahren" toegepaste methode van *Uhlenhuth* met antiformine.

Daarnaast is het geprobeerd met formaline, formaline-

dampen, H_2O_2, uitzoeken van vlokjes sputum en afspoelen in aqua dest., enz. Geen van deze voerden echter tot een bruikbaar resultaat.

Een geheel nieuwe vondst werd door *Löwenstein* (29) gepubliceerd.

Hij ontdekte in 1924 de groote resistentie van tuberkelbacillen tegenover verschillende zuren en alcaliën en zijn leerling *Sumiyoshi* paste dit gegeven toe bij het cultiveeren uit secundair verontreinigd materiaal.

Hij vermengde se- en excreta met een bepaalde hoeveelheid zuur of loog van bepaalde concentratie, liet dit zoolang inwerken tot alle begeleidende kiemen gedood waren, en bracht nu dit materiaal, na sedimenteeren en tweemaal wasschen om het storende aanwezige zuur te verwijderen, op een geschikt voedingsmedium en verkreeg aldus reinculturen van tuberkelbacillen.

Door het tweemalige wasschen werden de sedimenten dikwijls weer verontreinigd, zoodat zijn resultaten niet zoo heel gunstig zijn; doch het principe was vastgelegd.

Na hem hebben verschillende onderzoekers de proeven herhaald en over het algemeen daarmede gunstige resultaten bereikt.

De meesten hebben zich met het kweeken van het humane type beziggehouden, doch ook gegevens over materiaal van dieren afkomstig, zijn sindsdien verschenen *(Sefer, Wolters, Helm, Huck* en *Kramer, Clarenburg, Seelemann* en *Klingmüller)*.

Het is dan ook naar aanleiding van de ontdekking van *Löwenstein* en de gunstige resultaten die na hem speciaal door *Hohn* (18), dank zij de door *Hohn* aangebrachte verbeteringen, verkregen werden, dat een nader onderzoek werd ingesteld. Hier werd natuurlijk alleen gewerkt met het bovine type van de tuberkelbacil.

De meeste der publicaties, behalve de reeds genoemde, betreffen het humane type en het verschil tusschen deze twee typen rechtvaardigt alleszins een nader onderzoek.

Na zijn betrekkelijk gunstige resultaten moet *Hohn* toch verklaren, dat men nimmer bij de tuberkelbacil een behoorlijk snelle groei zal krijgen, daar de biologische eigenschappen en zijn verwantschap tot de actinomyceten (mycobacterium tuberculosum), zijn plaats tusschen echte bacillen en echte schimmels, zulks bij voorbaat zou uitsluiten.

Hoewel natuurlijk een groei als van de colibacil niet als voorbeeld aangehaald mag worden, is deze opvatting toch voor bestrijding vatbaar. Er valt immers een duidelijk verschil in cultureele eigenschappen waar te nemen tusschen de drie typen van tuberkelbacillen (humane, bovine, aviaire) en speciaal het aviaire type biedt bij het cultiveeren slechts weinig moeilijkheden en dit is zelfs voor ongeoefenden zeer gemakkelijk en met gunstig resultaat snel uit te voeren en te kweeken.

Het is dus à priori niet onmogelijk dat door eventueele verandering van uitwendige factoren (voedingsbodem enz.) ook voor het bovine type een groei wordt verkregen, die gelijk te stellen is met die van het aviaire type; in ieder geval is het argument van *Hohn* hiervoor niet onaanvechtbaar.

Men heeft reeds door verschillende wijzigingen in de samenstelling der bodems etc. een gunstige verandering zien optreden.

Bij het cultiveeren van tuberkelbacillen dient men in het oog te houden dat:

a. het bovine type het moeilijkst te cultiveeren is, langzamer groeit en minder snel aanslaat dan het aviaire en humane type.

Zooals reeds opgemerkt is, groeit het aviaire type vrij snel en gemakkelijk. Daarom mag er hier op gewezen worden, dat men bij het verkrijgen en beoordeelen van gegevens deze drie typen uit elkaar dient te houden. Als men de gegevens, verkregen bij cultiveeren uit kippenorganen eventueel varkensorganen, als norm laat gelden voor het bovine type krijgt men geflatteerde uitkomsten, welke zeer zeker niet gelden voor het bovine type.

In dit verband kan ook herinnerd worden aan het meer „culturabel" zijn van stammen na cavia passage een feit dat *Koch* reeds vermeldt. Ook deze gegevens dienen streng gescheiden gehouden te worden van het eigenlijke primaire bovine type en o.a. *Huck* en *Clarenburg* hebben met deze feiten onvoldoende rekening gehouden en de verschillende uitkomsten niet gescheiden.

Bongert zegt dat culturen geënt van organen van den mensch gemakkelijker aanslaan en sneller groeien dan die van runderorganen.

Hohn uit zich in deze woorden: het is opvallend hoe buitengewoon langzaam de culturen van het bovine type groeien en in alle gevallen groeiden bij mijn proeven een zeer gering aantal koloniën, menigmaal slechts één enkele kolonie.

Bij het humane type krijgt men na 10 tot 20 tot 25 dagen met het bloote oog zichtbare koloniën, een enkele maal iets later. *Hohn* noteert als gemiddeld aantal dagen voor typus humanus 17, waarbij macroscopisch waarneembare groei viel te constateeren, terwijl bij het gelijktijdig plaats vindend onderzoek met het bovine type dit 43 dagen bedraagt en soms zelfs pas na 64 dagen zichtbare koloniën werden waargenomen.

Dergelijke cijfers vinden we ook in andere publicatiën terug n.m.l. *Wolters* en *Dehmel* 25 tot 42, *Helm* 30 tot 80, *Seelemann* 30 tot 66, *Sawelieff* 35 tot 70 en zelfs tot 120 dagen terwijl *Sefer* het maximum bereikt met 180 tot 200 dagen voor sommige bovine stammen.

b. Een reeds gecultiveerde stam groeit veel sneller en gemakkelijker dan de primaire.

Experimenten van materiaal met culturen besmet (*Engel* e.a.) werden vermeden, daar zij vrijwel alle waarde voor een practische toepassing missen, afgezien van andere eigenschappen, (geringe resistentie etc.,) die conclusiën onjuist kunnen maken.

Zooals werd opgemerkt, zal de methode *Löwenstein-Hohn* aan een nader onderzoek onderworpen worden en in de eerste

plaats worden nagegaan, welke bodem het meest geschikt is voor de cultuur van het bovine type.

Voedingsmedia.

Hoewel het aantal gepubliceerde voedingsmedia voor tuberkelbacillen zeer groot is, blijkt toch voor een practisch laboratorium onderzoek dit aantal beperkt. *)

De hiervoor in aanmerking komende zijn:

1. Aardappelglycerine, eventueel volgens *Calmette*.
2. Eibodem van *Petroff*.
3. Eibodem volgens *Lubenau*.
4. Vloeibare bodem van *Besredka*.
5. Bodem van *Petragnani* (zie later).

Vele onderzoekers hebben in de laatste jaren bovengenoemde voedingsbodems vergelijkend onderzocht en bijna allen geven de voorkeur aan de vaste voedingsbodem volgens *Lubenau*, b.v. *Hohn, Schrader, Lichtenstein, van Riemsdijk* e.a.; alleen *Korthoff* prefereert de vloeibare bodem van *Besredka*.

Ook zij, die zich bezig houden met de cultuur van het bovine type, achtten den bodem van *Lubenau* het meest geschikt voor het gestelde doel en te verkiezen boven de bodems volgens *Petroff*, de aardappelglycerine- en de *Besredka*-bodem (*Seelemann* en *Klingmüller, Helm, Clarenburg, Sefer*).

Bij een kort ingesteld onderzoek bleek ook hier, dat van bovengenoemde bodems de *Lubenau*-bodem de beste resultaten geeft.

De aardappelglycerine voldeed allerminst en gaf zeer veel negatieve uitkomsten; wellicht tengevolge van het feit, dat met het sediment een geringe hoeveelheid zuur op de aard-

*) Na het afsluiten van het onderzoek werd door *Löwenstein* de samenstelling van een nieuwe eihoudende bodem met asparagine gepubliceerd, welke goede resultaten zou geven. Volgens een onlangs verschenen publicatie zou de bodem vlgs. Petragnani betere resultaten geven dan de bodem van Löwenstein.

appeloppervlakte gebracht wordt, welk zuur een sterk remmenden invloed op den groei zou blijven uitoefenen, eventueel geheel remmen.

Bij een eibodem wordt dit zuur chemisch gebonden en blijft deze werking achterwege.

De vloeibare bodem van *Besredka* gaf evenmin goede resultaten en daar een vaste bodem voordeelen bezit tegenover een vloeibare, werd ook deze uitgeschakeld; op vaste bodems is de groei regelmatig te controleeren en te vergelijken. Bij de vloeibare *Besredka* moet men voor onderzoek den inhoud afgieten en een microscopisch onderzoek instellen van het sediment van den bodem, en dit is dus niet meer voor vergelijkend materiaal bruikbaar.

Naast bovengenoemde bodems werd evenwel nog een ander milieu gebruikt, n.m.l. de bodem volgens *Dorset*.

Lubenau en *Dorset*.

Alleen *van Riemsdijk* betrekt den eibodem van *Dorset* in het vergelijkend onderzoek en vindt de *Lubenau*-bodem beter dan de *Dorset*-bodem (sneller groei).

Niemand, ook niet zij, die met het bovine type werken, gebruikt den bodem volgens *Dorset*, die in wezen slechts verschilt, doordat bij het milieu van *Lubenau* glycerine wordt toegevoegd, terwijl dit niet het geval is bij het mengsel volgens *Dorset*.

De volgende overwegingen deden het gewenscht voorkomen een vergelijkend onderzoek in te stellen.

Theobald Smith neemt aan, dat het bovine type, in tegenstelling tot het humane, in bouillonglycerine geen glycerine assimileert. Het humane type zet glycerine volgens hem om in zuren. Voor het bovine type zou dus de glycerine, mits natuurlijk voldoende andere stoffen aanwezig zijn, geen rol van beteekenis spelen.

Park, Moeller en *Kendall* kennen aan de glycerine een remmende werking op de ontwikkeling van het bovine type toe. *Rabinowitsch* en *Jenssen* bestrijden dit weer. Na afloop van dit onderzoek is een publicatie verschenen van *Wolthers*

en *Dehmel*, waarin zij tot de conclusie komen, dat glycerine ongunstig werkt op den groei van het bovine type.

In verband hiermede is getracht den invloed van glycerine in eihoudende voedingsbodems na te gaan op de ontwikkeling van nog niet gecultiveerde tuberkelbacillen; dit laatste is van beteekenis, daar een cultuur op glycerinehoudende of glycerinevrije media reeds gewend is aan glycerine en omgekeerd, zoodat verschillen, die bij een primaire cultuur sterk voor den dag zouden treden, bij een secundaire en tertiaire kweeking verdwenen kunnen zijn. Dit verklaart misschien de tegenstrijdige uitkomsten verkregen door de bovengenoemde auteurs. Ter verkrijging van een primaire cultuur is een voorbehandeling met zuur of loog natuurlijk noodzakelijk.

Bij de bereiding van de bodems volgens *Lubenau* en *Dorset* werden steeds versche eieren en zure bouillon gebruikt. Eveneens werd kunstmatig condensvocht toegevoegd.

Van het daarvoor klaargemaakte materiaal werd met dezelfde öse een hoeveelheid geënt, waarbij zorgvuldig dezelfde manipulaties verricht werden: d.w.z. drie maal over het eioppervlak met de öse heen en weer gestreken, zoodat de bacillen er als het ware ingewreven werden.

Tweemaal per week werden de bodems, eventueel met loupe onderzocht.

Tevens werden sommige culturen microscopisch onderzocht; dit geschiedde reeds na 4 dagen bebroeden.

Er is getracht het aantal gegroeide koloniën vast te leggen. Was dit aantal gering, dan was het mogelijk deze te tellen, waarbij natuurlijk de kleine nog niet zichtbare koloniën niet medegeteld werden. Maar de telling werd bij overeenkomstige buizen op het zelfde tijdstip verricht, eventueele fouten zullen elkaar grootendeels opgeheven hebben.

Indien het aantal gegroeide koloniën belangrijk werd en het onmogelijk was, deze te tellen zonder fouten te maken, of wanneer zich een beslag gevormd had, zoodat geen geïsoleerde koloniën meer waren waar te nemen, moest een andere maatstaf gebruikt worden.

Om toch een overzicht te krijgen van den groei is een classificatie ingevoerd, die, daar de verkregen waarden speciaal als vergelijkend object dienst moesten doen, zeer goed voldeed.

De indeeling geschiedde in 5 klassen.

Klasse I. aantal koloniën per buis 1— 50.
„ II. „ „ „ „ 50—100.
„ III. „ „ „ „ 100—250.
„ IV. „ „ „ „ meer dan 250 evenwel nog geïsoleerd.
„ V. geen geïsoleerde koloniën meer, maar beslag.

De verkregen cijfers zijn in de tabellen neergelegd en indien het mogelijk was om het aantal koloniën te tellen, is dit aantal er tusschen haakjes achter geplaatst.

Bezien we eerst Tabel I, kolommen 1 en 2.

Het valt op, dat we op den *Lubenau*-bodem twee, dat is 9%, negatieve uitkomsten moeten noteeren (nos. 8 en 21), terwijl deze zelfde sedimenten op den *Dorset*-bodem positief zijn na respectievelijk 17 en 75 dagen met 10 en 11 koloniën.

Dit wijst reeds in een bepaalde richting en indien verder geen verschillen bespeurd zouden worden, zou het toch al gewenscht zijn om den *Dorset*-bodem te prefereeren boven de glycerine houdende *Lubenau*. Er zou dan nog sprake kunnen zijn van toevallige omstandigheden; immers ook op den correspondeerenden *Dorset-bodem* komen slechts ongeveer 10 koloniën tot ontwikkeling en bij no. 21 pas na 75 dagen. Een en ander wijst op gering groeivermogen der aanwezige tuberkelbacillen. Speciaal in dit geval kan men zich voorstellen, dat een geringe remmende factor i.c. glycerine den groei zoodanig belemmert, dat deze geheel achterwege blijft.

TABEL I.

No.	Dagen macr. groei		Aantal koloniën		Dagen microsc. groei		Aantal bact. per micr. veld	
	1	2	3	4	5	6	7	8
	D.	L.	D.	L.	D.	L.	D.	L.
1	12	32	I (40)	I (45)	11	18	15	5
2	12	32	V	IV	18	18	30	n.
3	12	28	V	IV	24	n.	30	n.
4	13	19	IV	III (115)	24	24	—	25
5	14	14	IV	IV	11	18	—	15
6	14	14	II (60)	I (45)	11	18	—	150
7	14	14	I (35)	I (40)	14	18	—	100
8	17	n.	I (10)	n. (o)	16	21	—	150
9	18	21	III (150)	I (18)	18	18	—	3
10	18	30	II (60)	I (25)	18	26	—	15
11	18	28	I (40)	I (40)	11	14	veel	100
12	17	32	III (150)	III (200)	7	7	veel	veel
13	18	36	I (18)	I (10)	7	7	veel	veel
14	18	32	V	IV	11	18	veel	100
15	18	30	III	III	11	18	veel	veel
16	28	30	I (40)	II (50)	14	18	veel	50
17	30	28	I (30)	I (30)	18	18	veel	50
18	30	30	III	III	20	20	veel	200
19	50	50	IV	I (1)	20	28	veel	200
20	36	65	I (24)	I (13)	24	28	veel	—
21	75	n.	I (11)	n. (o)	—	—	—	—
22	75	49	I (13)	I (18)	—	—	—	—
gem. zonder 8 en 21	23	31	2.5	1.9	15.5	18.6	—	—

posit. 100 % 91 %.
neg. 0 % 9 %.
Kolom 1, 2, 3 en 4 correspondeeren.
5, 6, 7 en 8 eveneens.

D = Dorset } bodem.
L = Lubenau }
I—V geven de klassen aan waarin de cultures naar de mate van „groei" zijn ingedeeld.

Bezien we de overige 20 gevallen, dus zonder Nrs. 21 en 22, dan is toch ook hier een verschil onmiskenbaar. In dertien gevallen is bij den bodem volgens *Lubenau* de groei duidelijk langzamer en geremd en de verschillen in tijdsduur, waarbij groei optreedt, bedragen resp. 20, 20, 16, 6, 3, 12, 10, 15, 18, 14, 12, 29 en 26 dagen, wat, gezien de orde van cijfers zeer

hoog genoemd kan worden. De gemiddelde tijdsduur van met het bloote oog waarneembaren groei bedraagt bij deze dertien, duidelijk verschil gevende gevallen, resp. 18 voor „Dorset" en 32 dagen voor den Lubenau-bodem.

In vijf gevallen nos. 5, 6, 7, 18 en 19 is, wat groeitempo betreft, geen verschil waarneembaar.

Slechts in twee gevallen slaat de balans door naar de zijde van den *Lubenau*-bodem, waarbij no. 17 nog uitgeschakeld kan worden, daar het tijdsverschil hier slechts twee dagen bedraagt, wat van geen beteekenis is op een duur van 4 weken.

Iets anders is het met no. 22.

Het betreft hier een langzaam groeiende stam, waarbij na 49 dagen op den Lubenau- en na 75 dagen op den Dorset-bodem groei waarneembaar was.

Of hier een andere onbekende factor van invloed is geweest, dan wel of deze stam „glycerine" prefereerde, is niet nagegaan; de eindconclusie kan hierdoor niet gewijzigd worden.

De langzamere groei bij den *Lubenau*-bodem komt ook tot uiting in den gemiddelden tijdsduur van de 22 culturen, n.m.l. 23 en 31 dagen.

De glycerine oefent dus een remmende werking uit op de groeisnelheid van het bovine type en het kan zelfs zoodanig zijn, dat algeheele groei achterwege blijft. Dit laatste treedt speciaal op bij gevallen, waarin weinig tuberkelbacillen aanwezig zijn. Van deze 22 monsters blijken immers die, welke de 2 negatieve uitkomsten op den *Lubenau*-bodem gaven, op den overeenkomstigen *Dorset*-bodem, het minste aantal koloniën van deze 22 te vertoonen, n.m.l. 10 en 11.

Is er ook een invloed merkbaar op het aantal koloniën? Een antwoord hierop trachten kolommen 3 en 4 te geven.

Er is gewerkt met secreta, waarvan het gehalte aan tuberkelbacillen zeer uiteen liep.

We kunnen hier niet die scherpe grenzen trekken als in het vorige geval, te meer daar bij de uitvoering der techniek zeer gemakkelijk kleine, moeilijk controleerbare verschillen kunnen optreden.

Er is getracht dit zooveel mogelijk te vermijden; zooals reeds vermeld is, èn de hoeveelheid materiaal èn de wijze van overstrijken zijn gelijk genomen, doch de bacillenverdeeling in natuurlijk geïnfecteerd materiaal kan zoodanig uiteen loopen, dat deze voorzorgen een gedeelte van hun waarde verliezen.

Bij een onderzoek van een aantal gevallen is het mogelijk, door een verkregen gemiddelde afwijking, eenigszins een norm te bepalen.

Kleine verschillen in aantal koloniën moeten hierbij buiten beschouwing gelaten worden, daar dit te veel afhangen kan van de techniek.

Wij zien evenwel, dat soms groote verschillen kunnen optreden, zooals blijkt uit de monsters 2, 3, 4, 9, 14, 19.

De geringste invloed van de toegepaste techniek is daar te verwachten, waar we een groot aantal bacillen verwerken en waar zich veel koloniën ontwikkelen.

Een cultuur, waarbij een beslag ontstaat en dus geen geïsoleerde koloniën zijn waar te nemen (2, 3 en 14), staat, wat aantal koloniën betreft, in scherpe tegenstelling tot culturen, waarbij de koloniën nog geïsoleerd voorkomen. Het aantal koloniën op den bodem van *Dorset* van genoemde monsters, is toch minstens 2 à 3 maal zoo groot als op den overeenkomstigen bodem van *Lubenau*.

De nos. 9 en 19 geven een nog duidelijker beeld.

Bij no. 9 ontwikkelen zich ongeveer 8 maal zooveel koloniën op den glycerinevrijen, als op den glycerinehoudenden bodem.

Nog sterker spreekt dit bij no. 19, waar slechts op den *Lubenau*-bodem 1 kolonie tot ontwikkeling kwam, terwijl de verkregen cultuur op den *Dorset*-bodem zeer mooi en rijkelijk was.

Gerubrificeerd blijkt, dat van de 22 cultures 12 een gelijk aantal of ongeveer gelijk aantal koloniën te zien geven, hoewel hier toch ook een zeer geringe voorkeur bestaat voor den glycerinevrijen bodem en het aantal koloniën bijna altijd iets grooter is.

Bij 8 gevallen is een zeer duidelijke superioriteit van den glycerinevrijen bodem te constateeren; op den glycerinevrijen bodem is het aantal koloniën veel grooter.

In twee gevallen gaf de *Lubenau-* in tegenstelling met de *Dorset*-bodem een negatief resultaat.

Zouden we het gemiddelde van de klassen als een maatstaf mogen aannemen, dan blijkt, dat dit bij de *Lubenau* 1.9 en bij de *Dorset* 2.5 bedraagt.

Hiernaast zijn nog vier kolommen, nos. 5, 6, 7 en 8 geplaatst, vermeldende het aantal dagen, waarna microscopisch groei waarneembaar was en het aantal bacillen, dat dan per gezichtsveld werd waargenomen.

Natuurlijk kunnen deze cijfers moeilijk met elkaar vergeleken worden. De gegevens in kolom 5 en 7 en die in 6 en 8 hangen onderling te veel samen, zoodat een juiste, afzonderlijke vergelijking zeer moeilijk is.

De verschillen zijn hier eenigszins gereduceerd, wat in het gemiddelde tot uiting komt.

Wellicht zouden deze verschillen zich duidelijker demonstreeren, indien gewerkt was met stoffen, welke slechts zeer weinig tuberkelbacillen bevatten.

Als geheel komt men met deze gegevens toch tot dezelfde conclusiën.

Resumeerende mogen wij dus zeggen:

Glycerine remt den groei van het bovine type der tuberkelbacillen bij primaire culturen in belangrijke mate; ook op de ontwikkeling van het aantal koloniën heeft het een ongunstigen invloed en het gebruik dient derhalve in eihoudende voedingsbodems vermeden te worden.

HOOFDSTUK III.

DE VOEDINGSBODEM VOLGENS PETRAGNANI EN DE DAARIN AANGEBRACHTE WIJZIGINGEN.

Petragnani (37), hoogleeraar in hygiëne aan de universiteit te Cagliare, publiceerde in 1923 in een Italiaansch tijdschrift de samenstelling van een nieuwe voedingsbodem voor het cultiveeren van tuberkelbacillen uit verontreinigd materiaal.

Bij een door hem ingesteld onderzoek over den invloed van verschillende kleurstoffen, (methyleenblauw — gentiaanviolet — basische fuchsine — malachietgroen) op bacteriën, bleek, dat de meeste kiemen voorkomende in se- en excreta, na korteren of langeren tijd gedood werden, terwijl tuberkelbacillen niet of bijna niet werden aangetast, maar hun vitaliteit behielden, zoodat het mogelijk bleek, ze op deze manier in reincultuur te kweeken.

Dit bracht hem op de gedachte de kleurstoffen *in* den voedingsbodem te verwerken, in analogie met *Petroff* e.a.

Hij koos daarbij van bovengenoemde kleurstoffen het malachietgroen, daar dit volgens een ingesteld onderzoek de sterktste bactericide werking op de verontreinigende bacteriën heeft, terwijl daarentegen de invloed op tuberkelbacillen zeer gering is.

Methyleenblauw oefent een zeer geringe werking uit op banale bacterien; iets meer de basische fuchsine, terwijl het gentiaanviolet, hoewel beter dan de beide vorige, toch minder geschikt dan het malachietgroen bleek, speciaal wat betreft

het gelijktijdig remmend of doodend werken op verontreinigers en het niet aantasten van den tuberkelbacil.

Zooals bekend, wordt in den bodem van *Petroff* voor tuberkelbacillen, het gentiaanviolet gebruikt en o.a. *Blechmann* heeft vergelijkende onderzoekingen verricht over de waarde van het milieu van *Petroff* en van *Petragnani,* maar vindt deze laatste „nettement supérieure".

Petragnani maakte na enkele vergelijkende onderzoekingen gebruik van een milieu, dat in 1894 reeds aangegeven is door *Sclavo,* namelijk een milieu samengesteld uit kippenei, melk en aardappel, een mengsel van bestanddeelen die elk op zich zelf — speciaal het eerste en het laatste — gebruikt worden voor het cultiveeren van tuberkelbacillen en waarin alle stoffen voorkomen, die de bacil noodig heeft voor zijn groei. Experimenteel heeft hij de gewenschte hoeveelheid malachietgroen bepaald.

Na zijn eerste publicatie heeft *Petragnani* enkele veranderingen in de bereidingswijze aangebracht en wel, speciaal in verband met onderzoekingen over de werking van het malachietgroen, de toegevoegde hoeveelheden van deze laatste stof vermeerderd en ten tweede is de bereiding zoodanig geworden, dat de bodem in twee à drie uur voor het gebruik gereed is.

Bereiding: (eigen eenigszins gewijzigde techniek)

In een steriele kolf van ongeveer 1 liter inhoud doet men 150 c.c. versche rundermelk, (de reactie moet amphoteer zijn, dus geen oude, door melkzuurbacterien zuur geworden melk, daar dit de zuurgraad van den bodem zou kunnen beinvloeden), 6 gram aardappelmeel, 1 gram pepton, en een in kleine stukjes gesneden geschilde aardappel (grootte = ongeveer een ei).

Men brengt nu de kolf met inhoud in een kokend waterbad, waarbij door schudden — de hand beschermd door een doek, — de inhoud der kolf in roteerende beweging gehouden wordt. Na ongeveer 10 minuten treedt een soort lijmvorming op. Het schudden is noodig daar anders de inhoud — aard-

appelmeel en eiwit — zich aan den binnenwand van den kolf vasthecht.

Het geheel is nu goed vermengd en men laat de kolf nog één uur in een kokend waterbad staan. Daarna wordt afgekoeld tot ongeveer 60° C. en men voegt vier geheele eieren plus het geel van een vijfde ei met 10 c.c. van een 2% malachietgroen-oplossing in aqua dest. toe.

Het is niet noodzakelijk dat de gebruikte kolf of het aardappelmeel of melk steriel zijn. Evenmin behoeft men de eieren aan een zorgvuldige voorbehandeling te onderwerpen, b.v. afwasschen met carbol of spiritus.

Ter voorkoming van mogelijke storende verontreinigingen, werd voor dit onderzoek door mij bij de bereiding de steriliteit wel zooveel mogelijk in acht genomen en steriele kolven gebruikt en de eieren vooraf goed schoon gemaakt met spiritus.

Het geheel wordt nu door een steriel gaas gefiltreerd en hierop blijven enkele vaste bestanddeelen (stukjes aardappel, eivlies etc.) achter, die storend zouden werken voor het verkrijgen van een gladde oppervlakte van den bodem.

Met behulp van een steriele trechter verdeelt men het filtraat in steriele cultuurbuizen; in elke buis brengt men ongeveer 12—14 c.c. vloeistof. Het verdient aanbeveling, hierbij gebruik te maken van een wijd model cultuurbuizen, zoodat na stolling een groot oppervlak ontstaat.

Het vullen van de buizen moet zoodanig geschieden, dat geen bestanddeelen van het mengsel aan de binnenzijde van de buis komen, die gekeerd is naar de latere eioppervlakte; anders hechten zich zetmeelkorrels aan den binnenwand, die het later moeilijk, zoo niet onmogelijk maken, de eioppervlakte met het bloote oog of loupe te bestudeeren. De buizen worden dus tijdens het vullen in schuinen stand gehouden en direct daarna, zonder omdraaien der buis, in het vooraf verwarmde stollingsapparaat gebracht. Als stollingsapparaat werd het toestel van *Lautenschläger* gebruikt met de afmetingen, binnenwerks 7.5 bij 20 bij 40 c.m.

Het inwendige van het stollingsapparaat moet een temperatuur hebben van 85° C. Na een verblijf van 25 minuten bij deze temperatuur is de inhoud der buizen gestold en zijn de bodems — behoudens contrôle op steriliteit — klaar voor het gebruik.

In het stollingsapparaat is de temperatuur evenwel niet overal gelijk.

Indien er twee of drie lagen buizen met eimengsel ingelegd zijn, is de inhoud van de buizen der onderste laag na ongeveer 25 minuten reeds gestold, terwijl van de middelste en bovenste laag de inhoud der buizen nog vloeibaar is, wat men gemakkelijk controleeren kan door heel zacht tegen het stollingsapparaat te tikken; bij de niet gestolde ontstaat in de vloeibare massa een lichte rimpeling. Ook de inhoud der buizen die direct bij den zijwand liggen is vlugger gestold dan van die in het midden. Ook dit is een gevolg van de ter plaatse hoogere temperatuur.

Voorzichtig manoevreerende kunnen dan eventueel de gestolde media er uitgenomen worden; de nog niet bruikbaar zijnde buizen op de onderste rij gelegd en daar zoolang gelaten als noodig is. Deze hinderlijke factor van ongelijktijdig stollen is zooveel mogelijk te beperken door het stollingsapparaat goed af te sluiten, eventueel met watten tusschen het deksel en apparaat, zoodat de warmteafgifte tot een minimum beperkt blijft. Het gelukte evenwel niet deze storende factor geheel en al op te heffen.

De door *Petragnani* gevolgde methode bestond daarin, dat hij de gevulde buizen drie dagen achtereen gedurende 25 minuten verwarmde op 75 tot 85° C.

Het bleek evenwel, dat speciaal indien men zorgvuldig werkt en bij de bereiding de steriliteit zoo veel mogelijk in acht neemt, een eenmalige verwarming tot 85° C. voldoende is, waarbij men er evenwel op letten moet, dat in alle buizen inderdaad een temperatuur van 85° C. bereikt wordt. De contrôle op de temperatuur geschiedt door een thermometer op of tusschen de buizen te leggen.

Wij hebben ter bereiking van steriele bodems een samenwerking van het antisepticum malachietgroen met de verwarming tot 85° C., terwijl tevens niet vergeten moet worden, dat het mengsel vooraf een uur in een kokend waterbad heeft gestaan, waardoor reeds een gedeeltelijke sterilisatie, speciaal bij die stoffen, welke de meeste microorganismen bevatten (melk — aardappel), bereikt wordt.

Na deze verwarming in het waterbad worden alleen maar eieren en malachietgroen toegevoegd, waarbij men steriele voorzorgen zooveel mogelijk in acht kan nemen.

Men heeft het bezwaar geuit, dat een mogelijk geinfecteerd zijn van de gebruikte kippeneieren met tuberkelbacillen, aanleiding zou kunnen geven tot onjuiste waarnemingen, doordat deze bacillen later tot kolonien zouden kunnen uitgroeien.

Deze bewering is evenwel onjuist, daar de verwarming tot 85° C. gedurende 25 minuten alle aanwezige tuberkelbacillen doodt.

Het afsluiten der buizen.

Petragnani brengt de watteprop na het enten geheel in de buis en overgiet deze met paraffine, waardoor een volkomen afsluiting ontstaat.

Deze methode is, speciaal als men vele malen een microscopisch onderzoek in wil stellen, hinderlijk en lastig. Beter kan men gebruik maken van gummikapjes, welke gemakkelijk aangebracht en verwijderd kunnen worden, temeer daar dit een niet zoo hermetische afsluiting geeft, wat in verband met het aeroob zijn van den tuberkelbacil, slechts gunstig kan zijn.

Een nadeel is, dat deze kapjes, speciaal de minder goede soorten, soms stug worden en scheuren, met het gevolg, dat deze buizen uitdrogen en alle condenswater verdampt, waardoor de negatieve resultaten waardeloos worden.

Een regelmatige contrôle kan natuurlijk dit bezwaar gemakkelijk ondervangen.

Eenigen tijd is nog gebruik gemaakt van brolon capsules —

een soort celloidin met aether of spiritus, welke na het aanbrengen verdampt en zóó een stevig omhulsel geeft — doch deze capsules zijn slechts één maal te gebruiken, waartegenover de gummi kapjes, welke goed afsluiten, zeer sterk in het voordeel zijn.

Condenswater.

De hoeveelheid condenswater, welke ontstaat, is meestal zeer gering, doch indien men de afsluiting met paraffine toepast, voldoende, evenwel onvoldoende bij het gebruik van gummikapjes, daar dan bij een verblijf van twee, drie of soms zes weken en meer in de broedstoof, die geringe hoeveelheid condensvocht verdampt.

Het ligt voor de hand, dit op te heffen door het toevoegen van condenswater, zooals *Hohn* dit doet bij zijn eibodem volgens *Lubenau* in den vorm van steriele physiol. Na Cl. solutie, pepton keukenzout of anderszins. In dezen vorm kan dit hier evenwel niet geschieden.

Bij het enten brengt men meestal materiaal op den bodem, hetwelk nog verontreinigende kiemen bevat, die, door de remmende werking van het malachietgroen, op dezen bodem niet of zeer langzaam groeien. In het toegevoegde condensvocht — waarin natuurlijk ook voedende bestanddeelen zijn of komen — is niet die concentratie malachietgroen aanwezig welke het gestolde eimengsel bevat. In het begin van het onderzoek trad veelal een verontreiniging op, van het condensvocht uitgaande, en langzaam naar boven opkruipende.

Het aanwezig zijn van een bacterieele verontreiniging in het oogenschijnlijk steriele condensvocht na enting en/of bebroeding gedurende korten tijd, was gemakkelijk aan te toonen, door enting van dit condensvocht op een malachietgroen-vrije eibodem, en/of agarplaat. Meestal ontstond dan hierop een rijkelijke groei.

Ter vermijding van dit euvel werd aan het toegevoegde kunstmatige condensvocht dezelfde of een zelfs hoogere concentratie malachietgroen als in het eimengsel aanwezig is, toe-

gevoegd. De verontreinigingen waren na deze toevoeging direct veel minder talrijk. Het is het beste om steriele physiologische NaCl-oplossing als kunstmatig condensvocht toe te voegen, waardoor de groei in het condenswater, door het arm zijn aan voedingsstoffen eveneens belemmerd wordt.

Contrôle op steriliteit:

Dit vereischt meer dan een of twee etmalen bebroeden bij 37° C. en deze in het begin toegepaste contrôle-methode gaf foutieve resultaten. Later bij langer bebroeden traden verontreinigingen op, welke in het begin niet te verklaren waren. Na eenig zoeken werd de oplossing echter gevonden. Door de remmende werking van het toegevoegde malachietgroen blijft de groei van eventueel aanwezige verontreinigers of geheel achterwege of treedt pas macroscopisch waarneembaar op na vier, zes, acht dagen, afhankelijk van den aard der bacteriën.

Een verblijf in de broedstoof van vijf- tot zeven dagen is dus noodzakelijk om geinfecteerde buizen te kunnen elimineeren.

Er dient direct bijgevoegd te worden, dat als men de bodems eenige malen gemaakt en routine verkregen heeft, het aantal niet steriele bodems uiterst gering wordt; in het begin is het evenwel noodzakelijk om deze langdurige contrôle op steriliteit uit te voeren.

De kleur van den bodem is door het toegevoegde malachietgroen uitgesproken groen, evenwel met vrij sterke variaties van zeer licht- tot donkergroen. Ook zien we kleurveranderingen optreden bij het groeien van verschillende bacterien.

Van malachietgroen bestaat een witgekleurde verbinding met dezelfde chemische formule, de z.g. leucobase. Deze leucobase ontstaat direct bij reductie en bij toevoeging van NaOH, KaOH, Carbon. natricus, NH_3 etc. Ook bij verwarming in de aanwezigheid van eiwit ontstaat deze.

Als de buizen zich in het stollingsapparaat bevinden, zal

de temperatuur niet overal gelijk zijn, maar dicht aan den wand en bij den bodem is de temperatuur hooger dan in het midden. Door deze hoogere temperatuur zal in sommige buizen meer dan in andere, de vorming van de leucobase optreden, met het gevolg, dat deze iets lichter van kleur zullen zijn.

Ook kan dit zich manifesteeren, als (door betere afsluiting van het stollingsapparaat enz., factoren die men niet geheel in de hand heeft), de temperatuur in het inwendige van het stollingsapparaat hooger of lager is. De eene maal zijn de buizen iets lichter van kleur dan een volgende maal.

De vorming van deze leucobase schijnt eveneens op te treden als het ongestolde mengsel ei-melk-aardappel-malachietgroen een nacht of 24 uur blijft overstaan; de kleurverandering naar lichtgroen is dan duidelijk waarneembaar. Dit is zeer goed mogelijk, daar de reactie bij deze lagere temperatuur wellicht langzamer verloopt.

Indien met zuur voorbehandeld materiaal zonder neutraliseeren op den bodem gebracht wordt, treedt ter plaatse direct een kleurverandering op naar donker groen. Dezelfde kleuromslag ontstaat eveneens rondom kolonien van sommige bacterien, welker groei zeer waarschijnlijk met een geringe zuurvorming gepaard gaat. Om de kolonie vormt zich dan een scherp gecontoureerde groene zône. Bij het opbrengen met een öse van een geringe hoeveelheid natronloog, zien we ter plaatse een licht gele kleur ontstaan; dit kan ontstaan doordat de leucobase zich vormt en de gele kleur van den eibodem te voorschijn treedt, of door een kleurverandering van malachietgroen naar geel.

De kolonien van de tuberkelbacil zijn geel, strookleurig en het is voor de hand liggend om aan te nemen, dat een geringe vorming van alcali of een reduceerend reagens bij de kolonien optreedt, waardoor de gele kleur der kolonien met omgeving ontstaat.

Sommige slecht of langzaam groeiende stammen vormen geen macroscopisch zichtbare kolonien, maar op de groene oppervlakte ontstaat een gele weerschijn, die zich tegen deze

groene ondergrond duidelijk afteekent. Hoewel hierbij een microscopisch onderzoek noodzakelijk is, is deze aanwijzing bij veel onderzoek zeer zeker van waarde en vergemakkelijkt de diagnose. Op een gewone gele eibodem is deze aanwijzing natuurlijk niet aanwezig.

Het optreden van kleurveranderingen bij kolonien is een zeer gemakkelijk hulpmiddel bij de diagnose, daar sommige verontreinigers door hun groene randzône, zonder microscopisch onderzoek direct als zoodanig zijn aan te merken.

Na het verschijnen der publicatie van *Petragnani* hebben enkele onderzoekers met het nieuwe milieu, zij het dan in den vorm zooals dit door P. oorspronkelijk is aangegeven, geëxperimenteerd; zij komen meestal tot gunstige resultaten.

Petragnani zelf, die aseptisch opgevangen bloed, pus, urine en weefsels verwerkt, verkrijgt regelmatig een positief resultaat, hetwelk eveneens het geval is bij verontreinigd materiaal, waarbij dit eerst met een 4 % NaOH oplossing behandeld wordt ter vernietiging of verzwakking van de aanwezige saprophyten. Voor het opbrengen op een bodem wordt dit materiaal met steriele HCl. geneutraliseerd, waarbij eenige vooraf toegevoegde druppels lakmoestinctuur als indicator functioneeren.

Hij vermeldt evenwel geen contrôle-proeven, noch dierproeven.

Castelli heeft bij een vergelijkend onderzoek gevonden, dat de bodem van *Petragnani* even gunstige resultaten geeft als het milieu volgens *Hohn*.

Blechmann verkiest de Petragnani-bodem boven die van *Petroff*, door het grooter aantal positieve uitslagen met de eerste, hoewel hij bij microscopisch positieve sputa toch nog enkele negatieve resultaten verkreeg. De door hem gegeven cijfers hebben zeer geringe waarde, daar geen dierproef vermeld wordt en hij secreta o. m. voorbehandelt met 12 N. zwavelzuur, een behandeling die zooals hij zelf opmerkt, in staat is, bacillenarm materiaal steriel te maken.

Harada vergeleek de voedingsbodems volgens *Petroff*,

Dorset, Lubenau en *Petragnani* en krijgt de beste resultaten zoowel wat positieve uitslagen als het aantal gegroeide kolonien betreft, met den bodem volgens Petragnani, maar toch ook hier is het aantal negatieve bevindingen bij tuberkelbacillenhoudend materiaal nog vrij belangrijk, n.m.l. 25%.

Deze cijfers hebben in een opzicht meer waarde, daar het gebruikte materiaal slechts zeer weinig bacillen bevatte.

In ander opzicht moeten deze ongunstige uitkomsten eveneens weer verklaard worden uit het te sterke zwavelzuur (tot 12 %) dat als voorbehandelingsmateriaal gebruikt werd, en waarbij de schrijver, evenals *Blechmann*, opmerkt, dat de gebruikte concentraties zwavelzuur de bacillen kunnen dooden.

Verdina, werkende met den bodem volgens *Petragnani*, verwerkt 137 absoluut positieve secreta en vindt met de caviaproef 84.7% en met de cultuurproef 67% positieve resultaten.

Bovengenoemden werkten alleen met materiaal van menschelijke origine; van hen die secreta van dierlijk origine onderzochten, noemen we *Bertrand* en *Clarenburg*.

Bertrand vermeldt, dat met den Petragnani-bodem tuberkelbacillen in secreta aangetoond werden, wat op geen enkele andere manier inclusief de dierproef, gelukte. *Bertrand* wijst ook op het niet absoluut zekere der caviaproef en de trage groei van het bovine type.

Clarenburg constateert op den bodem van *Petragnani* een snellere groei dan op het milieu van *Lubenau* en *Besredka*, maar het aantal dagen waarna macroscopische groei waarneembaar was, varieert voor culturen uit tuberculeuze organen van 30—65 dagen, voor sputum van 30—48 dagen; microscopisch respectievelijk 4—30 en 4—14 dagen. Alleen van een achttal melkmonsters afkomstig van dieren met een duidelijke tuberculeuze mastitis, verkrijgt hij na 18—30 dagen bebroeden macroscopisch waarneembare groei. Microscopisch trad hier na 4—8 dagen groei op.

Bij het onderzoek van materiaal verkregen uit een 20-tal tuberculeuze organen van rund, paard, varken, kip en cavia

verkreeg *Clarenburg* in 90% der gevallen cultureel positieve resultaten, terwijl de bacillen in het uitgangsmateriaal slechts in 14 gevallen microscopisch aan te toonen waren.

Uit 12 runderspúta werden 4 maal tuberkelbacillen gekweekt, terwijl volgens de caviaproef 6 sputa tuberkelbacillen houdend waren.

De waarde dezer gegevens wordt verminderd, doordat *Clarenburg* bij het orgaanmateriaal niet afzonderlijk vermeldt, van welke dieren de monsters genomen zijn, daar speciaal het aviaire type (kip en varken) de gemiddelden gunstig zal beinvloeden, wegens de bekende gemakkelijke en snelle groei; een factor, waarmee wij ook rekening moeten houden bij materiaal afkomstig van caviae, daar ook deze passage de stam gemakkelijk culturabel maakt.

Bij 6 sputa, welke volgens de dierproef tuberkelbacillen bleken te bevatten, gaven slechts drie sputa een positief resultaat, en hoewel het aantal proeven te gering is om een conclusie te trekken, is dit percentage miswijzingen toch zeer zeker te hoog.

Bovenstaande publicatien geven zeer zeker den indruk, dat met deze nieuwe vondst een verbetering bereikt is; een stap verder in de goede richting van het gebruik voor de praktijk.

De meeste onderzoekers hebben gewerkt met materiaal van humane oorsprong, uitgezonderd *Clarenburg* en *Bertrand*.

In verband met het feit, dat *Petragnani* de samenstelling van de voedingsbodem gebaseerd heeft op uitkomsten verkregen bij het werken met het humane type en het bovine type buiten beschouwing heeft gelaten, is het gewenscht de verschillende factoren, die voor een snelle groei van het bovine type van beteekenis kunnen zijn, na te gaan.

Ook is er, in verband met nieuwe gegevens van den laatsten tijd over groeibevorderende elementen voor het bovine type (o.a. haematine van *Hohn*) reden, om hier een onderzoek naar in te stellen.

De resultaten van *Bertrand* en *Clarenburg* zijn nog aller-

minst voldoende; en ook Bertrand merkt, zooals reeds vermeld, de trage groei van het bovine type op.

Glycerine:

De invloed van glycerine op den groei van het bovine type is reeds ter sprake gebracht en het ligt voor de hand om ook hier aan een zelfde remmende invloed te denken, ja, het zou niet onlogisch zijn om, zonder verder onderzoek dezen bodem te gebruiken zonder glycerine.

Toch is er, doordat andere stoffen aanwezig zijn (mala-

TABEL II.

No.	Aantal bac. per veld	Dagen macr. groei		Dagen micr. groei		Aantal koloniën		Aantal bac. p. gezichtsveld	
		gl. vrij	gl. h.	gl. vrij	gl. h.	gl. vrij	gl. h.	gl. vrij	gl. h.
1	15	11	38	6	18	IV	III	veel	40
2	veel	11	21	5	11	III	I 7	—	—
3	10	11	60	5	32	III	I 12	—	—
4	10	11	44	6	11	IV	I 20	veel	40
5	veel	11	60	5	21	III	I 18	—	—
6	veel	12	22	8	8	I 35	I 10	—	—
7	veel	12	22	8	8	I 13	I 10	—	—
8	2	14	26	7	14	III	III	veel	200
9	10	14	—	7	14	III	v	veel	100
10	3½	14	26	8	15	III	III	veel	10
11	3½	14	44	7	14	III	III	veel	100
12	veel	18	44	11	11	IV	I 20	300	300
13	2	21	n.	15	**70**	III 200	n.—	veel	**25**
14	½	21	n.	16	**90**	III 200	n.	veel	**200**
15	½	22	29	8	14	III	I 10	—	—
16	1½	22	n.	8	n.	III 150	n.	—	n.
17	2½	25	70	18	42	I 35	I 25	veel	300
18	2	38	n.	21	n.	I 40	n.	200	n.
19	2	38	n.	21	n.	I 40	n.	veel	n.
	gem.	17		9		2½	1.1		
	gem. z. neg.	14	39	9	25	2.8	1½		
	%neg.	0%	28%	0%	16%	—	—		

n = negatief.

v = verontreinigd.

gem. z. neg. = gemiddelde zonder negatieven, vermeld in kolom 4 en 6.

chietgroen, aardappel), reden deze invloed bij het milieu van *Petragnani* na te gaan.

Ter verkrijging van zoo juist mogelijke resultaten, werd met hetzelfde materiaal zoowel een glycerine houdende als een glycerine vrije Petragnani-bodem geënt.

De concentratie der glycerine bedraagt 4 %, een concentratie die overeenkomt met die van den Lubenau-bodem.

Tabel No. II toont het resultaat van een negentiental niet verontreinigde primaire culturen van het bovine type, uit uiersecreta of melk, waarin bij microscopisch onderzoek de tuberkelbacillen aangetoond konden worden en het aantal bacillen dus niet onbelangrijk is.

Het gemiddeld aantal bacillen per microscopisch gezichtsveld bij onderzoek van het te enten materiaal is vermeld in kolom 2.

De superioriteit van den glycerine-vrijen bodem is bij deze uitkomsten wel zeer frappant; alle culturen slaan aan en geen enkele negatieve bevinding of miswijzing wordt geconstateerd; daarentegen bedraagt het aantal negatieven bij den glycerinehoudenden bodem 5, d. i. 28 %. Deze negatieve uitkomsten zijn als miswijzingen aan te merken, daar het niet aannemelijk is te veronderstellen dat het aantal opgebrachte bacillen op den glycerine houdenden bodem aanmerkelijk zal verschillen van dat van den glycerine vrijen bodem.

Dit klemt te meer, daar het aantal gegroeide kolonien geteld op de correspondeerende glycerinevrije bodems vrij belangrijk is, n.l. ± 200, ± 200, ± 150, 40 en 40.

Er is hier dus geen sprake van een niet aanwezig zijn van levende tuberkelbacillen op den glycerine houdenden bodem, hetzij door den aard van het onderzochte secretum, hetzij door de voorbehandeling.

Direct wordt hierbij opgemerkt, dat de concentratie van het gebruikte zuur nooit meer dan 1 N. bedroeg; volgens sommigen is dit onschadelijk, maar zooals later blijkt, oefent het zijn invloed op den tuberkelbacil wel degelijk uit.

Van de 5 macroscopisch negatieven, blijken er nog twee (No. 13 en 14) bij microscopisch onderzoek positief te zijn, hoe-

wel dit pas gediagnosticeerd werd, na resp. 70 en 90 dagen. Na deze lange bebroeding is het aantal bacillen in het gezichtsveld nog niet bijzonder groot.

De drie overige, No. 16, 18 en 19, zijn na verblijf van drie maanden in de broedstoof bij microscopisch onderzoek nog negatief. Het is een opmerkelijk feit, dat in de gevallen waarin een negatief resultaat verkregen wordt, het aantal tuberkelbacillen in het uitgangsmateriaal betrekkelijk gering is, n.m.l. nooit meer dan gemiddeld 2 bacillen per microscopisch gezichtsveld.

De waarden, vermeld onder de rubriek „aantal bacillen per microscopisch gezichtsveld", resp. kolom 2, 9 en 10, zijn de gemiddelden, verkregen door telling eventueel schatting, van het aantal bacillen in een aantal (5—20) velden.

Deze cijfers hebben slechts vergelijkende waarde en geven eenigszins een indruk van den aard van het onderzochte materiaal. Zooals blijkt, is speciaal de bacillenrijkdom van het uitgangsmateriaal van veel beteekenis voor de verkregen resultaten.

Bij de meeste publicatien worden deze gegevens niet verschaft en wordt aan den invloed van het aantal tuberkelbacillen in het onderzochte secretum onvoldoende aandacht geschonken. Deze factor blijkt nog ten overvloede uit het feit, dat bij die culturen waar in minder dan twintig dagen macroscopisch groei werd geconstateerd, de bacillenrijkdom van het uitgangsmateriaal vrij aanzienlijk was; uit kolom 2 van tabel II blijkt, dat het aantal bacillen in het uitgangsmateriaal in twee gevallen 3½ bedroeg, en in de overige 9 sedimenten varieerde van 10 tot veel. In een geval, no. 8, was het aantal 2.

Behalve de negatieve uitkomsten wijzen ook de positieve resultaten op een sterke beinvloeding door de glycerine.

Het aantal dagen, waarna macroscopisch waarneembare groei bij de glycerinevrije Petragnani en glycerine houdende optrad, is respectievelijk 11—38, gemiddeld 14 dagen en 22 tot 70, d.i. gemiddeld 39 dagen; de tijdsduur is dus ruim verdubbeld. Hier zijn niet medegerekend die gevallen, waarbij

negatieve uitkomsten met de hiermede correspondeerende positieve resultaten verkregen worden.

Microscopisch positief resultaat wordt verkregen na 5—21 dagen, d.i. gemiddeld 9 en na 8—90, d.i. gemiddeld 25 dagen. In kolom 6 en 7 wordt het aantal gegroeide kolonien vermeld, en ook hier is de invloed van de glycerine merkbaar. Als wij geringe verschillen verwaarloozen, blijkt toch, dat bij de No. 2, 3, 4, 5, 12 en 15, zonder glycerine een veel gunstiger resultaat verkregen wordt. Het aantal kolonien op de glycerinevrije Petragnani is soms het tien- en meervoudige van het aantal op de glycerine houdende dito.

De glycerine werkt dus ook in het milieu van Petragnani groeibelemmerend en dient voor het kweeken van het bovine type niet toegevoegd te worden.

De uitkomsten blijven bij glycerinetoevoeging zooals *Petragnani* dat in zijn recept aangeeft, verre achter bij de resultaten verkregen met den glycerinevrijen bodem.

Het aantal miswijzingen bedraagt een zeer hoog percentage, n.l. 28 en 16%, wat vooral van beteekenis is, daar gewerkt is met materiaal, hetwelk veel tuberkelbacillen bevat.

Zoowel de snelheid van groeien als het aantal zich ontwikkelende kolonien is op den glycerinehoudenden Petragnani-bodem veel ongunstiger dan wanneer geen glycerine wordt toegevoegd.

Het behoeft hier niet gezegd te worden, dat steeds gewerkt is met natuurlijk geinfecteerd materiaal en deze conclusien niet behoeven te gelden voor secundaire culturen.

De verkregen resultaten zijn eigenlijk zeer ongunstig uitgevallen, ongunstiger dan verwacht werd. Het zeer ongunstig resultaat is misschien te verklaren uit een cumulatie van remmende invloeden i.c. glycerine, zuurbehandeling en misschien malachietgroen. Indien elk der factoren ieder afzonderlijk aanwezig was, zou deze ongunstige invloed misschien niet zóó scherp aan den dag treden.

Versche rundergal:

Petragnani vermeldt in zijn publicatie, dat bij het gebruik

van zijn bodem voor het kweeken van het bovine type in plaats van glycerine, rundergal toegevoegd zou kunnen worden. Hij vermeldt er evenwel geen proeven of verkregen uitkomsten bij, daar hij in deze richting geen onderzoek heeft ingesteld.

Calmette gebruikt, zooals bekend is, zijn rundergal-aardappel voor het kweeken van het bovine type en verkrijgt daarop een zeer snelle groei.

Zeer zeker (speciaal in verband met het gegeven van Calmette) is de mogelijkheid van verbetering niet uit te sluiten. Er werd een kort vergelijkend onderzoek ingesteld.

De vergeleken objecten waren de glycerinevrije Petragnani-bodem, die voortaan altijd gebruikt wordt bij de volgende proeven, en een bodem waaraan versche rundergal tot een hoeveelheid van ± 4% was toegevoegd (300 c.c. ei-mengsel en 2 c.c. gal).

Van een zestal uiersecreta werden zoowel de Petragnani als de galhoudende Petragnani geënt.

TABEL III.

No.	Dagen macr. groei		Microsc. groei		Aantal koloniën	
	P.	P. gal	P.	P. gal	P.	P. gal
1	16	16	11	11	III	III
2	20	25	12	12	III	III
3	18	18	12	12	II	I (40)
4	24	30	14	14	II	I (40)
5	18	43	12	26	III	II à III
6	26	18	12	12	II	II à III
gem.	21	25	12	14	2.5	2.2

Groote verschillen blijken niet op te treden.

Bij monster 2, 4 en 5 is een verschil waarneembaar. Hier toch is bij den Petragnani bodem na resp. 20, 24 en 18 dagen waarneembare groei opgetreden, terwijl deze bij de correspondeerende galhoudende milieus resp. na 25, 30 en 43 dagen

optreedt. Een verschil van 5, 6 en 25 dagen is aanmerkelijk en van belang. Dit komt ook uit in het verschil in dagen van microscopisch waarneembare groei bij geval 5, n.m.l. resp. 12 en 26 dagen.

Geval no. 6 spreekt ten gunste van galtoevoeging. Hier is het tijdperk van waarneming met 8 dagen verkort.

Het aantal kolonien wijst evenmin op een gunstige invloed van de rundergal. In geval 3 en 4 is het resultaat na de galtoevoeging zelfs aanmerkelijk ongunstiger.

De gemiddelden wijzen ook in deze zelfde richting.

Resumeerende kunnen we dus zeggen, dat rundergal toegevoegd aan den glycerinevrije Petragnani bodem op de cultuur van den tuberkelbacil geen gunstige invloed uitoefent, zoowel wat betreft de groeisnelheid als het aantal zich ontwikkelende kolonien; ja zelfs is een — zij het geringe — ongunstige invloed merkbaar. De toevoeging van versche rundergal is derhalve niet aan te bevelen.

Haematine:

In een zeer enthousiast gesteld artikel beschrijft *Hohn* (19), die zich speciaal met de tuberkelbacillen cultuur bezig houdt, over een nieuwe vinding, waardoor de groei van het bovine type zeer belangrijk verbeterd zou worden.

Hohn meende opgemerkt te hebben, dat bij het gebruik van eieren met een sterk gekleurde dooier een rijkere groei viel waar te nemen, en hij meende deze kleur te moeten toeschrijven aan de door de kippen speciaal in het voorjaar meer opgenomen plantenkleurstoffen, o.a. chlorophyl, en via de chlorophyl kwam *Hohn* door de chemische en biologische verwantschap tot een bestanddeel dat gemakkelijker in zijn milieu te verwerken valt, het haemoglobine of haematine. Hij verkrijgt deze haematine uit de resten van bloed, gebruikt voor de Wassermanreactie.

Het volledige recept van bereiding is te vinden in het Centr. f. Bakt. Orig. Bd. 113.

Zijn conclusien na toepassing luiden, dat er een belangrijke

verbetering voor de cultuur van het bovine type bereikt is. De gemiddelde duur, die anders bij de door hem gebruikte milieus ong. 25 dagen bedraagt, wordt verkort met 8 à 10 dagen, dus zou er na ong. 16 dagen reeds macroscopisch waarneembare groei zijn. Soms bleef groei op zijn Lubenau eibodem achterwege, terwijl de haematine bodem een positief resultaat gaf.

De enkele gegevens, die verschaft worden, wettigen alleszins een nadere proefneming, waarbij evenwel uitgegaan is van den Petragnani bodem als contrôle bodem.

De Petragnani bodem heeft zoodanige voordeelen boven den door *Hohn* gebruikten bodem, dat, al zou er geen gunstige invloed van de haematine op den Petragnani bodem en wel op den Dorset of Lubenau bodem zijn, zooals *Hohn* aangeeft, toch de Petragnani gehandhaafd zou moeten worden.

In het kort was de bereiding als volgt:

1e. In een steriel kolfje van 100 c.c. vangt men door middel van venenpunctie ± 70 c.c. bloed op, laat dit stollen en schudt zoodanig, dat de vloeibare bloedresten vrijkomen.

2e. giet het vloeibare deel af en voeg gelijke hoeveelheid aqua dest. toe.

3e. na goed schudden zet men het mengsel een nacht in de ijskast, zoodat volledige haemolyse optreedt door het bijgevoegde aqua dest.

4e. den volgenden morgen filtreeren door grof filtreerpapier of steriele watten.

5e. van het filtraat de gewenschte hoeveelheid bij het eimengsel voegen.

De toe te voegen hoeveelheden loopen voor beide typen — want ook voor het humane type beveelt *Hohn* haematine aan — nogal uiteen. Voor het bovine zou de gewenschte hoeveelheid varieeren van 3—5 % van het eimengsel.

In overeenstemming hiermede werd in deze proeven een zoodanige hoeveelheid toegevoegd, dat de concentratie 4% bedroeg, dus 12 c.c. bloedoplossing bij 300 c.c. eimengsel.

TABEL IV.

No.	Petragnani H. b.	Petragnani	Petragnani H. b.	Petragnani
1	30	26	III	III
2	28	28	III	III
3	18	21	IV	IV
4	16	16	IV	IV
5	18	18	IV	IV
6	26	22	I (10)	I (40)
7	26	20	II	III
8	27	21	II	II
9	18	18	III	IV
10	16	21	IV	IV
11	18	18	IV	IV
gem.	22	21	3.1	3.3

De eenigszins hooggespannen verwachtingen werden door de verkregen uitkomsten grootendeels te niet gedaan. Bij een 11-tal onderzochte monsters bleken geen duidelijke verschillen te ontstaan door de al of niet toevoeging van de bloedoplossing en allerminst kan de meening gedeeld worden, dat een werkelijke verbetering tot stand is gekomen. Bij de monsters 1, 6, 7, 8 is het resultaat verkregen bij de bodems bereid met haematine ongunstiger wat betreft de groeisnelheid. De verschillen in waarnemingsduur bedragen resp. 4, 4, 6 en 6 dagen, wat op een tijdsduur van 3 à 4 weken een aanmerkelijk verschil genoemd mag worden. Daar staan 2 monsters tegenover (no. 3 en 10) die een iets gunstiger uitkomst geven bij haematine houdende bodems. De verschillen, 3 en 5 dagen, zijn evenwel slechts gering en vallen misschien binnen de grenzen van het normale; maar indien we waarde willen hechten aan deze verschillen, dan blijkt, dat de glycerine vrije Petragnani bodem de voorkeur verdient boven die waaraan haematine is toegevoegd.

Het aantal kolonien blijft vrijwel gelijk, al bestaat er een geringe neiging tot een iets mindere groei bij den bodem met haematine bij de nos. 6, 7 en 9.

De geringe verschillen blijken tenslotte het duidelijkste uit

de gemiddelden, n.m.l. na 22 en 21 dagen macroscopisch waarneembare groei en het aantal gegroeide kolonien volgens de ingevoerde classificatie resp. 3.1 en 3.3.

De verkregen uitkomsten bij deze 11 onderzoekingen wettigen de uitspraak, dat geen verbetering van groei door toevoeging van haematine verkregen wordt; integendeel wijzen enkele waarnemingen op een ongunstige werking van de toegevoegde „bloedoplossing".

Malachietgroen:

Zooals reeds vermeld constateerde *Petragnani* een doodende, eventueel verzwakkende werking van malachietgroen op banale kiemen, terwijl de tuberkelbacil in het geheel niet aangetast werd.

Latere publicatiën gewagen zelfs van een groeibevorderende werking van malachietgroen op tuberkelbacillen.

Volgens *Frongia* werkt een concentratie hooger dan 0.3 % remmend op den groei, terwijl een concentratie van 0.05 tot 0.3 % gunstig op den groei van tuberkelbacillen werkt en deze versnelt.

Petragnani voegt bij een mengsel ei-aardappel-melk van ong. 350 gram, 10 c.c. 2 % waterige oplossing van malachietgroen toe, d.w.z. de concentratie van het kristallijne malachietgroen bedraagt dus 0.5—0.6 $^0/_{00}$. *Frongia* gaat dus met zijn concentratie veel hooger.

Sonnenschein voegt ¼ $^0/_{00}$—2 $^0/_{00}$ bij den Lubenau bodem en verkrijgt hierbij nog gunstige resultaten.

Korthoff mengt zijn gebruikte Besredkabodem met verschillende hoeveelheden, varieerende van 1/40 $^0/_{00}$—1/10 $^0/_{00}$, kristallijn malachietgroen en vindt de eerste concentratie te slap, doordat nog te veel verontreinigingen optreden, de laatste te sterk, zoodat hij als optimum concentratie 1/20 $^0/_{00}$ aangeeft.

Bij de lage concentraties (1/40 $^0/_{00}$) is de groei minder snel en worden zelfs een aantal negatieve uitkomsten geno-

teerd, die bij de bodems met 1/20 $^0/_{00}$ kristallijn malachietgroen positief zijn.

Tegenstrijdig zijn de gegevens van *Korthoff*, waar hij bij 17 monsters dubieuse secreta 17 duidelijk positieve culturen verkreeg op zijn Besredka bodem, waaraan geen malachietgroen is toegevoegd, terwijl hij later bij 44 duidelijk positieve secreta na enting op den Besredka bodem met 1/40 $^0/_{00}$ malachietgroen (de minimum concentratie dus) een aantal negatieven waarnam. Malachietgroen zou dus in geringe concentraties remmend op den groei van de tuberkelbacillen werken, wat niet wel aanneembaar is.

De toegevoegde hoeveelheden door *Korthoff* zijn dus veel geringer, dan die door *Frongia, Petragnani* e.a. en deze laatsten vermelden nog gunstige resultaten bij concentraties, welke volgens *Korthoff* sterk remmend werken.

Het meest voor de hand liggend is hier te denken aan een verschil in de gebruikte milieus. Bij *Korthoff* een vloeibaar medium, bij *Petragnani* en *Frongia* vaste media.

Het is natuurlijk een verschil of men werkt met vaste of vloeibare media. Het contact bij de laatste is veel inniger en zoo is het verklaarbaar, dat *Korthoff* lagere concentraties als optimum waarden vindt.

Zoowel *Petragnani* als *Frongia* en *Sonnenschein* geven aan, dat tot 0.5 $^0/_{00}$ kristallijn malachietgroen een stimuleerende werking op den groei van tuberkelbacillen uitoefent.

Deze gemeenschappelijke optimale concentratie bij vaste bodems komt dus het eerst in aanmerking om vergeleken te worden met dezelfde bodems waaraan, om eventueele verschillen zoo duidelijk mogelijk te laten uitkomen, in het geheel geen malachietgroen toegevoegd werd.

Enkele uiersereta en materiaal afkomstig van tuberculeuze caviae werden na dezelfde voorbehandeling, resp. voor zoover dit materiaal afkomstig was van caviae zonder voorbehandeling, geënt op malachietgroenhoudende Petragnani (0.5 $^0/_{00}$ kristallijn) en op glycerinevrije Petragnani waaraan geen kleurstof was toegevoegd.

Het aantal dagen, waarna macroscopisch, eventueel microscopisch groei optrad en het aantal ontwikkelde kolonien werd in tabel V opgenomen.

Het blijkt, dat de verkregen uitkomsten evenmin groote verschillen vertoonen.

TABEL V.

No.	Aantal dagen macrosc. waarneembare groei		Aantal ontwikkelde koloniën	
	Petragnani	Petr. zonder malachietgr.	Petragnani	Petr. zonder malachietgr.
1	16	16	IV	IV
2	24	24	I ± 30	I 34
3	17	24	I (25)	I 35
4	20	24	I (18)	I ± 40
5	17	21	III (120)	I ± 80
6	23	19	III	III
7	21	24	I (± 40)	I ± 40
8	25	25	I (± 45)	I ± 30
9	21	21	IV	IV
10	18	18	III	III
gem.	20.2	20.6		

Wat de groeisnelheid betreft, is bij de nos. 1, 2, 8, 9 en 10, dus 50% van het totaal, geen verschil bemerkbaar. Van de overige vijf geven de nos. 4, 5, 6 en 7 slechts een gering verschil van 3 of 4 dagen, wat binnen normale grenzen valt. Alleen bij No. 3 geeft de Petragnani bodem zonder malachietgroen een eenigszins belangrijke achterstand van een week, op een periode van 24 dagen.

Ook de kolommen 4 en 5 wijzen niet op een invloed van malachietgroen, de kleine schommelingen liggen ook hier binnen normale grenzen. De geringe beteekenis der verschillen komt ook uit in de gemiddelde tijdsuur, n.m.l. 20.2 en 20.6 dagen.

Deze waarnemingen wettigen dus de meening, in tegenstelling met Frongia, dat van een concentratie van 0.5 ‰

malachietgroen in den Petragnani bodem nóch een remmende, nóch een groei bevorderende werking uitgaat, maar doordat de aanwezigheid van het malachietgroen in den bodem vele voordeelen heeft, zal men dit ten allen tijde aan deze bodems voor de cultuur van den tuberkelbacil toevoegen. Behalve de selectief antiseptische werking bestaat nog het voordeel, dat op een groen gekleurden bodem de gele kolonien van den tuberkelbacil gemakkelijker en beter waar te nemen zijn dan op de gele ei-bodems. Misschien is hierdoor ook het iets betere resultaat met den malachietgroenhoudenden bodem wel te verklaren.

De *zuurgraad* van den bodem.

Theobald Smith was de eerste, die vond, dat het bovine type op glycerinebouillon groeiende, dit milieu niet van reactie doet veranderen, althans niet zuurder maakt, maar soms alcaliseert in tegenstelling met het humane type. Hij geeft dit zelfs aan als een karakteristieke eigenschap, die gebruikt kan worden voor de diagnostiek van beide typen.

Lobstein meent dat de reactieverandering een functie is van de intensiteit der groei en de samenstelling van het medium.

Smith verklaart het vermelde verschijnsel door aan te nemen, dat zoowel het bovine als het humane type een alcalescentie van den bodem bewerkstelligen door omzetting van aminozuren, maar het humane type maskeert dit, door vorming van zuren uit de aanwezige glycerine, terwijl het bovine type de glycerine onaangetast laat.

Volgens Smith zou het bovine type gevoeliger zijn voor een overmaat zuur of een zure reactie dan het humane. Bij een reëele zuurgraad van 6.4 zou typus bovinus slechts langzaam groeien.

Volgens *Dernby* en *Naselung* is de optimum pH voor typus bovinus daarentegen 6.0 à 6.5.

Engel, Sütterlin, Lehmann en *Neumann* geven eveneens waarden die varieeren van 6.0—6.2—6.5, doch indien de pH stijgt boven 6.7 worden de resultaten met de stijging minder.

Daarentegen vermelden *Korthoff* en *Hohn*, dat bij den Besredka-bodem met een pH van 7.0—7.4 de tuberkelbacillen voortreffelijk groeien.

Ishimori geeft voor bovine stammen 5.8—6.9 aan en heeft zelfs stammen, die de beste groeiresultaten geven bij een pH van 8.0.

Hier dus zeer verschillende gegevens, die eensdeels onverklaarbaar, anderdeels een gevolg kunnen zijn van de verschillende milieus, die gebruikt worden.

Een tweede factor, die niet vermeld wordt is of bij deze experimenten gewerkt werd met primaire- of secundaire eventueel tertiaire enz. culturen.

Voor secundaire- eventueel tertiaire culturen zal de pH. van den bodem der primaire cultuur niet zonder beteekenis zijn.

Hohn bepaalt de pH van zijn eimengsel door 2 druppels hiervan te vermengen met 15 c.c. physiologisch NaCl.-oplossing en dan moet de pH. volgens de kleurencomparator van *Michaëlis* 7.0—7.2 zijn. *Hohn* moet zoo sterk verdunnen daar anders zijn vloeistof ondoorzichtig is. Het is te verwachten, dat bij zoo sterke verdunning de pH. van de verdunde oplossing een geheel andere zal zijn dan die van den bodem waarvan werd uitgegaan.

Om een maatstaf te krijgen werd getracht van de verschillende buizen, waaraan afgemeten hoeveelheden zuur of alcali waren toegevoegd, de pH. te bepalen.

Door een gelijktijdig plaats hebbend onderzoek over de waterstofionenconcentratie in vleesch was het mogelijk, zoowel electrometrisch als colorimetrisch de pH van enkele mengsels te bepalen.

Bij het nog niet gestolde ei-aardappel-melk mengsel was dit betrekkelijk eenvoudig, daar dit onverdund of verdund met gelijke deelen aqua dest. onderzocht kon worden.

Gecontroleerd werd of de stolling in het Lautenschläger-apparaat invloed uitoefende en de pH door de verwarming en stolling veranderde.

Daartoe werd de gestolde massa uit een cultuurbuis zoo

fijn mogelijk verdeeld, overgoten met een drie- à viervoudige hoeveelheid aqua dest. en goed geschud. Na een half uur werd gefiltreerd en van het filtraat zoowel electrometrisch als colorimetrisch de pH. bepaald. Een methode die overeenkomt met de door *Fooy* toegepaste methode voor vleesch.

Bij een — zonder eenige toevoeging van zuur of alcali — normale Petragnani, zonder glycerine, werd gevonden:
electrometrisch 7.0, 6.8, 6.8, 6.9, 6.9.
na stolling van het op boven beschreven wijze verkregen filtraat:

electrometrisch 7.0, 6.9, 6.9, 7.0, 6.8.
colorimetrisch 7.2, 6.95, 7.0, 7.1, 6.8.

Het blijkt, dat de gevonden waarden, zij het slechts geringe, verschillen vertoonen.

Ter verkrijging van een meer alkalische of zure reactie van den bodem werd gebruik gemaakt van een 10 % carbonas natricus of 7½% acid. lacticum oplossing.

Bij een toevoeging van zuur wordt de bodem diepgroen, terwijl bij de toevoeging van carbonas natricus de bodem licht groen tot geel wordt.

Een tweede opmerkelijk feit is, dat bij zuurtoevoeging de consistentie van het gestolde ei-mengsel verandert. Na zuurtoevoeging wordt deze brosser, slapper, en wanneer meer dan 1 c.c. 7½ % acid. lactic. per cultuurbuis, dus per ong. 14 c.c., wordt toegevoegd, is deze zoo slap, dat bij het overstrijken met een platina öse meestal het oppervlak beschadigd wordt. *Van Deinse* merkt dit „slappe uiterlijk" der bodems op en weet hiervoor geen verklaring te geven en wijt het aan oude eieren en oude melk.

In verband met het bovenstaande is dit zeer goed mogelijk en verklaarbaar, speciaal bij gebruik van niet versche melk, waar een sterke melkzuurvorming door de melkzuurbacterien kan zijn ontstaan.

Bij de toevoeging van alcali wordt de gestolde bodem vaster, elastischer, stugger.

Bij de eerste serie werd per 10 c.c. mengsel toegevoegd respectievelijk 0.1 c.c., 0.2 c.c., 0.4 en 0.7 c.c. acid. lactic. 7½ %. De gemiddelden der gevonden waarden bedroegen voor de pH 6.4, 5.7, 4.4 en ong. 3.6 (deze laatste gaf zeer wisselende uitkomsten, door de sterke zuurgraad speelt dit echter geen rol, daar deze als zoodanig direct uitgeschakeld kan worden.)

Negen stammen *) werden onder dezelfde omstandigheden op de verschillende buizen overgeënt.

Na ongeveer drie weken werden de culturen macroscopisch en microscopisch onderzocht.

Hetzelfde werd verricht na toevoeging van resp. 0.1, 0.4, 0.7 en 1 c.c. van een 10 % carbonas natricus oplossing aan elke 10 c.c. van het ongestolde mengsel.

De gemiddelden der bepaalde waterstofionenconcentratie zijn respect. voor

de buis met 0.1 c.c. carb. natric. 10% : pH = 7.25;
„ „ „ 0.4 „ „ „ „ „ = 7.45;
„ „ „ 0.7 „ „ „ „ „ = 8.05;
„ „ „ 1.- „ „ „ „ „ = 8.15.

De resultaten van macroscopische- en microscopische waarnemingen zijn neergelegd in tabel VI.

Een zeer geringe toevoeging van zuur (acid. lacticum) aan het mengsel geeft direct ongunstige resultaten. De groei vermindert sterk en zelfs is bij 4 culturen elke macroscopische waarneembare groei achterwege gebleven.

Alleen stam 8, afkomstig van een cavia, vormt een uitzondering op dezen regel en deze stam groeit bij een pH van 6.4 blijkbaar beter dan bij een neutrale reactie.

Bij het gelijktijdig ingesteld microscopisch onderzoek van dezelfde reeks, blijkt dat enkele nos., die macroscopisch negatief waren, bij een bodem waaraan 0.1 c.c. melkzuur 7½%

*) Bij uitzondering werd hier met stammen gewerkt, door gebrek aan „primair materiaal".

TABEL VI.

Macroscopische waarneming.

	Contrôle	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Acid. lacticum 7½ %	pH 7.0	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+	+++
	0.1 cc. 6.4	++	—	+	—	—	++	—	++	+
	0.2 cc. 5.7	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	0.4 cc. 4.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	0.7 cc. 3.6	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Microscopische waarneming.									
	Contrôle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	0.1 cc.	+++	—	++	++	—	+++	++	+++	++
	0.2 cc.	+	—	+	—	—	+	+	+	—
	0.4 cc.	+	—	—	—	—	+	—	—	—
	0.7 cc.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Carbonas natricus 10 %	**Macroscopische waarneming.**									
	Contrôle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
	0.1 cc. 7.25	++	—	+++	+++	++	—	+	+	—
	0.4 cc. 7.45	+	—	+	++	—	—	—	—	—
	0.7 cc. 8.05	+	—	+	—	—	—	—	—	—
	1 cc. 8.15	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Microscopische waarneming.									
	Contrôle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	0.1 cc.	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++
	0.4 cc.	++	+	++	+++	++	++	+	—	—
	0.7 cc.	++	+	++	++	—	—	—	—	—
	1.0 cc.	+	—	—	+	—	—	—	—	—

+++ = sterke groei.
++ = nog duidelijke groei.
+ = geringe groei.
— = geen groei.

toegevoegd was, toch wel groei vertoonden b.v. no. 4 en 7; bij de nos. 2 en 5 is zelfs microscopisch geen groei waarneembaar op den bodem met een pH van 6.4.

De overige reeksen, die met een pH van 5.7 en lager, geven zulke duidelijke resultaten, dat deze verder buiten beschouwing kunnen blijven.

Bezien we de resultaten na toevoeging van alcali, dan blijkt

ook een spoedige remming in groei na een geringe stijging der pH in den voedingsbodem.

Twee stammen 3 en 4 ondervinden geen invloed van een reactie verandering tot pH = 7.25. Daarnaast zijn er evenwel 3 stammen 2, 6 en 9, waarbij na drie weken nog geen groei viel te constateeren, hoewel, blijkens microscopisch onderzoek, hier toch wel een duidelijke groei aanwezig was. Tusschen deze uitersten liggen de stammen 1, 5 en 7 en 8 met een eenigszins geremde groei. Ook hier vertoonen de buizen bereid met 0.4 c.c. carbonas natricus 10%, en meer, zoodanige verschillen, dat deze direct geëlimineerd konden worden.

Bij de bereiding van den Petragnani bodem diene men uit te gaan van versch materiaal en geen zuur of alcali toe te voegen, daar men dan de beste resultaten verkrijgt. De reactie is ongeveer neutraal pH = 7.—.

HOOFDSTUK IV.

INVLOED VAN CHEMICALIËN, IN HET BIJZONDER ZWAVELZUUR, OP DEN GROEI VAN TUBERKELBACILLEN.

§ 1. Litteratuuroverzicht.

Zooals reeds werd vermeld, ontdekte *Löwenstein* de groote resistentie van tuberkelbacillen tegen verschillende zuren en alcaliën, waarna *Sumiyoshi* deze vonds toepaste voor het verkrijgen van reinculturen uit geïnfecteerd tuberculeus materiaal. Het geïnfecteerde materiaal werd gedurende een bepaalden tijd met zuur of loog vermengd, daarna gecentrifugeerd en een of tweemaal gewasschen. Hierdoor werd het zuur of loog verwijderd, waardoor zij de nadeelige werking, welke zij toch ook tegenover tuberkelbacillen bezitten, niet meer kunnen uitoefenen. Na deze manipulaties werd het materiaal op de daarvoor bestemde voedingsmedia gebracht.

Bij deze werkwijze is van belang:

1e. Aard van het voorbehandelingsmiddel.
2e. Concentratie van het voorbehandelingsmiddel.
3e. Duur van de voorbehandeling.

1. Uit de literatuur blijkt, dat van alle gebruikte chemicaliën zwavelzuur als het gunstigste voorbehandelingsmiddel beschouwd wordt.

Sumiyoshi gebruikt oorspronkelijk zwavelzuur, zoutzuur, melkzuur of natronloog.

Hohn (17) geeft aan zwavelzuur de voorkeur, en na hem is door velen, die met het humane type experimenteerden, even-

eens van zwavelzuur gebruik gemaakt *(Schmidt, Kemkes, Korthoff, Harada, Sonnenschein, Sütterlin, Corper en Nao Uyei, Verdina)*.

Ook *Helm* (16), *Huck* en *Kramer* (20), *Clarenburg, Saweliefl* en *Sefer*, die zich met het bovine of aviaire type bezig houden, verkiezen zwavelzuur boven andere chemicaliën.

Volgens *Schmidt* oefent NaOH een schadelijke werking uit, een meening, die gedeeld wordt door *Soranyi* en *Putnoki*. Volgens *Corper* zou NaOH evenals HCl wel bruikbaar, doch niet zoo goed als H_2SO_4 zijn.

Alleen *Isabolinsky* en *Gitowitsch* prefereeren NaOH; zij werken echter met gekweekte stammen.

Blechmann kent aan NaOH het sterkst steriliseerend vermogen toe. *Erica Hermann* geeft de voorkeur aan antiformine, doch zij blijft in dit opzicht de eenige.

Pesch en *Simchowitz* hebben verschillende alcaliën beproefd, doch hadden hiermee slechte resultaten vergeleken met H_2SO_4.

Seelemann en *Klingmüller*, die met materiaal van dierlijke origine werken, zijn de eenige, die, op grond van vergelijkende proeven met H_2SO_4, aan zoutzuur de voorkeur meenen te moeten geven.

Bij een voorbehandeling met resp. 20 % HCl en 20 % H_2SO_4 zijn de resultaten met HCl: 2 verontreinigd, 1 steriel, 2 positief en met zwavelzuur alle steriel.

Bij vergelijking van 15 % HCl met 12 % H_2SO_4, verkreeg hij respectievelijk 4 verontreinigd, 1 buis positief met 7 koloniën en 3 verontreinigd, 1 steriel, 1 buis positief met 4 koloniën.

Enkele andere gegevens met kunstmatig geïnfecteerde melk geven gelijksoortige uitkomsten.

Uit deze gegevens volgt m.i. allerminst een superioriteit van het HCl boven H_2SO_4, doch alleen dat 20 % H_2SO_4 te sterk steriliseerend, eventueel sterker dan 20 of 15 % HCl, werkt.

In het door hen gebruikte sediment komen zeer veel tuber-

kelbacillen voor, varieerende van 5—10 bac. per gezichtsveld. Wij kunnen dus aannemen, dat gemiddeld bij enting ¼—1 millioen bacillen op de eioppervlakte gebracht worden; toch verkrijgen zij niet meer dan 4—7—11 koloniën per cultuurbuis.

Dit resultaat wijst zeer duidelijk op de te sterk doodende werking van het door hen gebruikte reagens en het ware juister geweest, indien zij getracht hadden hierin verandering te brengen. Bij dergelijke resultaten zijn conclusies voorbarig.

2. De concentratie en tijdsduur:

De gebruikte concentraties loopen betrekkelijk veel uiteen. Hohn is de eerste, die een grens aangeeft en wel bij 13—14 % H_2SO_4.

In navolging van *Hohn* hebben zeer velen dezelfde concentratie gebruikt, *Schmidt, Kemkes, Harada, Verdina, Sawelieff, Sütterlin, Seelemann* en *Klingmüller, Brechmann, Matthis,* e.a.

Hohn heeft later op het feit gewezen, dat een hooge concentratie van het zuur invloed op den tuberkelbacil zal uitoefenen en derhalve zoo mogelijk verlaagd moet worden. Ook *Korthoff* wijst hierop.

Het blijkt uit het groote aantal miswijzingen bij bovengenoemde onderzoekers, dat de methode toegepast met 10—12 % H_2SO_4 allerminst voldoet en een vergelijking met de dierproef niet kan doorstaan.

Hohn vindt bij een behandeling met 15 % H_2SO_4 75 % miswijzingen, *Schmidt* 40 %, *Kemkes* 30 %, *Harada* 25 %, *Verdina* 30 %, *Sawelieff* 33 %, enz. Hun conclusies zijn dan ook allerminst gunstig en de cultuurproef wordt verre achter gesteld bij de dierproef. Men had evenwel met deze hooge concentratie rekening dienen te houden en de mogelijkheid van concentratievermindering in acht nemende, de beoordeeling van de waarde der cultuurmethode moeten opschorten. Behalve dat er verschil bestaat tusschen de stammen onder-

ling, is het gehalte aan tuberkelbacillen van het onderzochte materiaal een factor van beteekenis, waar geen of weinig aandacht aan geschonken wordt.

Harada e.a. wijzen er op, dat een voorbehandeling met een geconcentreerd zuur, bacillenarme sputa en dito secreta steriel kan maken.

Daartegenover staat de mededeeling van *Sefer* volgens wien zelfs 9N. zwavelzuur geen of weinig invloed heeft en allerminst doodend werkt op tuberkelbacillen.

Dit groote verschil in opvatting en uitkomst is hierdoor te verklaren, dat *Sefer* werkt met secreta, welke zeer rijk aan tuberkelbacillen zijn en het is zeer goed mogelijk, dat het agens 95 % of meer der aanwezige tuberkelbacillen doodt, doch dat een klein gedeelte door toevallige omstandigheden niet aangetast wordt (ingehuld zijn in slijm of eiwit, centrale ligging, enz.).

Het is ook mogelijk, dat sommige stoffen door de zuurbehandeling coaguleeren en een beschermende laag om de bacillen vormen. De mogelijkheid dat bij een massale hoeveelheid enkele bacillen overblijven, is zelfs waarschijnlijk en eveneens, dat dan ondanks die hooge concentratie een positieve d.i. bevredigende uitkomst verkregen wordt.

Korthoff heeft er het eerst de aandacht op gevestigd, dat het juister is om de gebruikte sterkte van het zuur in normaliteiten uit te drukken, daar het weergeven in percentages slechts verwarrend kan werken speciaal wat betreft gewichts- en volumeprocenten.

Men dient aequimoleculaire hoeveelheden te gebruiken en dit bij vergelijkende proeven uit te laten komen.

Het ligt voor de hand deze groote resistentie tegenover zuren te zoeken in de bijzondere samenstelling van het ectoplasma van de tuberkelbacil, een lipoid wasachtige laag.

Het aantasten van deze laag wordt duidelijk gedemonstreerd door het verdwijnen van de zuurvastheid na een voorbehandeling met een zuur, een verschijnsel dat zeer eenvoudig te controleeren is door microscopisch onderzoek.

Volgens *Hohn* is er correlatie tusschen de zuurresistentie en het karakter van het tuberculeuze proces.

Bij oude processen waar zeer veel bacillen in voorkwamen, gelukte het Hohn soms niet de bacillen cultureel aan te toonen en hij spreekt hier van „bacillenlijken" of bacillen die zoodanig verzwakt zijn, dat de zuurinwerking direct doodend werkt.

Misschien kan hier de theorie van *Bergel* tusschen gevlochten worden, volgens welke granulaire vormen ontstaan, door de inwerking van een lipase, afkomstig van lymphocyten. Door die lipase wordt een groot gedeelte der waschitinelaag opgelost en het is te verwachten dat dergelijke bacillen minder weerstand tegenover chemicalien i.c. zwavelzuur zullen bezitten dan de gewone niet granulaire vormen. Behalve *Hohn*, verkrijgen ook *Dimtza* en *Bârta* minder goede resultaten bij secreta waarin vele granulaire vormen voorkomen.

Seelemann en *Klingmüller* vonden een virulentievermindering na zuurinwerking.

Zij spoten melk, geinfecteerd met tuberkelbacillen, na behandeling met 15 % H_2SO_4 en 15% HCl, intramusculair in bij drie caviae.

Na 70 tot 90 dagen trad pas gegeneraliseerde tuberculose op, terwijl de contrôle caviae reeds na 30 tot 35 dagen algemeene t.b.c. vertoonden.

De lymphklierzwelling in eerst bedoelde gevallen trad pas op na 30 tot 35 dagen.

Wat de behandelingsduur aangaat, zijn er enkele schrijvers die dezen tijd verlengen tot 1 uur en zelfs wel een 24-urige inwerkingsduur onschadelijk achten, doch *Sawelieff* toonde aan, dat met het verlengen der tijdsduur de negatieve uitkomsten sterk toenemen.

Als meest geschikte en practische tijdsduur is 20 minuten aangenomen.

§ 2. Eigen proefnemingen met sterke concentraties.

Ten einde nu de invloed van de verschillende concentraties na te gaan, werd het hierna volgende verricht.

Om een overzicht van het te verwerken materiaal te verkrijgen werd na sedimenteeren, een Ziehl-Neelsen preparaat gemaakt en hiervan in een aantal gezichtsvelden zoo mogelijk het aantal tuberkelbacillen geteld.

Bij zeer bacillenrijk materiaal moest dit aantal wel eens geschat worden, of werd volstaan met de qualificatie „veel".

In andere gevallen werden 10—25 velden geteld, afhankelijk van het aantal bacillen, en hiervan het gemiddelde genomen.

Vooraf werd getracht een zoo homogeen mogelijke verdeeling in het sediment te verkrijgen. Indien grove vlokken in de uiersecreta aanwezig waren, werden deze door filtreeren verwijderd.

Daarop werd het te onderzoeken secretum of sediment gevoegd bij een aantal c.c. verdund zwavelzuur van de laagst bruikbare concentratie en goed in een mortier vermengd.

Van dit goed verwreven mengsel werden met een gegradueerde pipet afgepaste hoeveelheden (½ c.c.) in steriele centrifugebuisjes gebracht. Deze werden voorzien van een vooraf in water uitgekookte en gedroogde gummistop.

Daarna werden de centrifugebuisjes gevuld met de gewenschte hoeveelheden H_2SO_4 van bepaalde concentratie.

De behandeling vooraf in het mortier met zwavelzuur dient, om het ontstaan van grove stolsels door het uitvlokken der caseine bij de latere toevoeging van het sterkere zwavelzuur te voorkomen. De grove vlokken zouden een gelijkmatige inwerking van het zuur kunnen verhinderen.

Men moet er voor zorgen, dat de binnenwand van het centrifugebuisje op de plaats waar later de gummistop komt, niet bevochtigd wordt met zwavelzuur; de stop glijdt er in dat geval gedurende het schudden meestal af. Men legt de buisjes horizontaal neer, zoodat zich geen dikke laag bezinksel in het onderste nauwe gedeelte der buis kan vormen.

Gedurende 20 minuten worden de buisjes nu en dan krachtig geschud. Indien een schudapparaat aanwezig is, kan men dit natuurlijk gebruiken.

Na afloop wordt 5 minuten gecentrifugeerd, afgegoten, waarna de buisjes omgekeerd op een filtreerpapiertje worden gezet, zoodat het overtollige zuur afloopt.

Zoo spoedig mogelijk wordt het sediment op de voedingsbodem gebracht.

Bij het enten werd dezelfde öse gebruikt om steeds gelijke hoeveelheden op de ei oppervlakte te brengen.

Het uitstrijken moet zorgvuldig geschieden, speciaal op de Petragnani bodems.

Het geschiedt zoodanig, dat er een innig contact ontstaat van materiaal en voedingsbodem; het sediment moet er als het ware ingewreven worden, het is het beste, als men 3 of 4 maal met de öse over de geheele oppervlakte heen en weer strijkt.

In vele publicaties kan men vinden dat in het begin de cultures niet aanslaan en dat dit euvel later bij zorgvuldiger werken en verkregen routine niet meer voorkomt.

Voor de Petragnani bodem speelt een andere factor nog een belangrijke rol.

Hier wordt meestal materiaal op verwerkt, dat nog met banale kiemen verontreinigd is, welke dan door het malachietgroen gedood of in hun ontwikkeling geremd worden. Blijft nu evenwel een vlokje sediment op de oppervlakte liggen, zoodat het met malachietgroen niet of onvoldoende in contact komt, dan zal uit dat vlokje groei, respectievelijk verontreiniging van den geheelen bodem plaats vinden. Deze hinderlijke factor is zeer gemakkelijk te demonstreeren, door niet zorgvuldig uit te strijken.

Als voorbehandelingsmiddel is zwavelzuur gebruikt. De vele gegevens pleiten bijna eenstemmig voor zwavelzuur en zooals is aangetoond, berust de meening, volgens welke aan zoutzuur de voorkeur gegeven zou moeten worden, niet op

deugdelijke gronden. In het begin zijn evenwel korte proeven genomen met zoutzuur, doch de resultaten, die hiermede verkregen werden, waren — hoewel niet ongunstig — toch niet zoo goed als die met zwavelzuur. Andere chemicalien (salpeterzuur, chroomzur, melkzuur, natronloog) worden eveneens, voor zoover onderzocht, achtergesteld bij zwavelzuur.

De sterkte van het gebruikte zuur:

In navolging van Korthoff is deze in normaliteiten aangegeven; dit kan geen verwarring stichten.

Soms werden zeer hooge normaliteiten gebruikt, daar in veel gegevens in de literatuur deze hooge concentraties vermeld en aanbevolen werden en zelfs geconstateerd werd, dat deze geen invloed op de bacil uitoefenden. Hierdoor kon dan de waarde dezer gegevens nagegaan worden.

De concentratie hangt samen met de gebruikte voedingsbodems en de aard van het materiaal. Als regel werd hier slechts gewerkt met uiersecreta. Bij bodems waaraan een antiseptische stof is toegevoegd, zal men met lagere concentraties kunnen volstaan. *(Petragnani, Petroff).*

Als milieus werden gebruikt de Dorset-bodem en de glycerine-vrije bodem volgens Petragnani.

De bodems werden tweemaal per week nagezien, eventueel met loupe en één reeks werd regelmatig microscopisch onderzocht.

Groei ontstaat bijna altijd het eerst dicht bij het condensvocht en daar werd dan ook speciaal aandacht aan besteed.

Na een bepaalden tijd, wanneer dit op alle te vergelijken bodems mogelijk was, werd het aantal koloniën geteld.

Bezien we eerst de reeksen waarbij gewerkt is met 3, 5 en 7 N. zwavelzuur (tabel VII).

Er is bij deze gegevens een ontbrekende schakel, n.m.l. die gegevens welke verkregen zouden zijn zonder voorbehandeling, of bij een voorbehandeling met indifferente stoffen. Dit is door het verontreinigd zijn van het uitgangsmateriaal onmogelijk. Slechts in één geval is het gelukt een directe cultuur

TABEL VII.

No.	Aantal bacillen in materiaal	Aantal dagen waarna macroscopische groei waarneembaar was				
		1 N.	3 N.	5 N.	7 N.	Opmerkingen.
1	veel	14	14	18	30	
2	veel	v [1]	18	28	30	
3	± 50	v	18	18	24	
4	± 50	v	16	16	24	
5	± 50	30	30	30	48	
6	± 50	28	28	28	49	
7	veel	14	14	30	30	
8	veel	14	21	30	41	
9	veel	12	12	12	12	heftige acute mastitis
10	± 9	v	60	n [2]	n	
11	± 10	60	60	n	n	
12	8	v	49	n	n	
13	± 10	v	n	50	n	
14	—	32	32	n	n	
15	2 a 3	v	44	n	n	
16	± 2	44	n	n	n	
17	± 2	35	n	50	n	
18	± 2	42	42	57	n	
19	3 a 4	16	24	—	—	niet beh. 16 dagen
20	8	v	—	76	n	
21	± 4	36	36	70	n	
22	0.1	v	32	n	n	
23	0.3	28	n	n	n	
24	—	17	17	—	—	
25	—	16	23	—	—	
26	—	v	24	24	24	afkomstig v. caviae
27	—	v	v	24	24	
Verontreinigd .		11=41%	1= 4%	0	0	
Positief. . . .		16=59%	21=81%	16=67%	11=46%	Nos. 1—27
Negatief . . .		0	4=15%	8=33%	13=54%	
Gem. aant. dagen		27	29	35	33	
Verontreinigd .		3	0	0	0	
Positief. . . .		6	9	9	9	Nos. 1—9
Negatief . . .		0	0	0	0	
Gem. aant. dagen		19	19	23	32	
Verontreinigd .		8=45%	1= 6%	0	0	
Positief. . . .		10=55%	12=70%	7=47%	2=13%	Nos. 10—27
Negatief . . .		0	4=24%	8=53%	13=86%	
Gem. aant. dagen		32	32	51	—	

[1]) v = verontreinigd.
[2]) n = negatief.

te verkrijgen, n.m.l. no. 19. Wij kunnen dus niet den invloed nagaan van het 1 N. zwavelzuur en moeten de „1 N culturen" als vergelijkingsmateriaal nemen.

Bij het beschouwen van tabel VII blijkt direct de groote invloed van het aantal bacillen in het uitgangsmateriaal, een waarneming welke m.i. te verwachten is.

Nemen wij de Nos. 1 tot en met 9, dan blijken deze vrij groote verschillen te geven met de overige monsters.

Bij de eerste ziet men een snelle groei en zelfs na een behandeling van 7 N. zwavelzuur krijgen wij geen negatieve resultaten.

De gemiddelde duur van het zichtbaar worden der kolonien op de bodems geënt met secreta, voorbehandeld met 1, 3, 5 en 7 N. H_2SO_4 bedraagt hier resp. 19, 19, 23 en 32 dagen en hoewel een geringe tendenz tot stijging aanwezig is, is deze in verband met de sterkte van het gebruikte zuur (tot 7 N.) zeer gering.

De groei is hier in deze negen gevallen snel, en het aantal dagen totdat macroscopisch groei werd waargenomen is gering, zelfs geringer dan sommige gegevens voor het humane type.

Let men op het *aantal* gegroeide kolonien (tabel VIII), dan is hier een duidelijker, hoewel ook nog geringe invloed te bespeuren. Duidelijk demonstreert zich de invloed in de 5 N. en 7 N. kolom; men ziet een belangrijke vermindering van het aantal kolonien, zelfs kan dit teruggaan tot 40 en 18 kolonien, terwijl op de overeenkomstige culturen na de 1 en 3 N. behandeling zeer veel kolonien (IV) aanwezig zijn. Bij de 5 N. kolom vinden wij cijfers, die tusschen die van de 3 N. en van de 7 N. kolom inliggen.

Blijkt dus de invloed van de zuurbehandeling op het groeitempo zeer gering te zijn, uit de volgende tabel VIII blijkt duidelijk, dat zeer veel bacillen zijn gedood, of zoodanig verzwakt, dat ze niet tot kolonien uitgroeien.

Het is dan ook onjuist bij het verwerken van dergelijk sterk veranderd en veel bacillen bevattend materiaal van „melk" te

spreken. Evenzeer is het onjuist dergelijke tuberkelbacillenhoudende uiersecreta als norm te nemen en als bij een bepaalde voorbehandeling met sterk zuur een positief resultaat bereikt wordt, dit zonder voorbehoud op andere secreta of melk te willen toepassen.

TABEL VIII.

No.	Aantal Koloniën					Opmerkingen
	Aantal bact.	1 N	3 N	5 N	7 N	
1	veel	IV	IV	IV	I (30)	
2	veel	v [1]	IV	II (60)	I (40)	
3	± 50	v	IV	IV	III (150)	
4	± 50	v	IV	IV	III (180)	
5	± 50	IV	IV	IV	I (40)	
6	± 50	IV	IV	II (50)	I (40)	
7	veel	IV	IV	III (100)	III (200)	
8	veel	IV	IV	II (60)	I (18)	
9	veel	IV	IV	IV	III	acute t.b.c.
10	± 9	I (45)	I (30)	n	n	mastitis
11	± 10	v	III (160)	n	n	
12	8	v	I (2)	n	n	
13	± 10	v	n [2]	I (1)	n	
14	—	IV	IV	n	n	
15	2 a 3	v	I (35)	n	n	
16	± 2	I (46)	n	n	n	
17	± 2	IV	n	I (2)	n	
18	± 2	I (32)	I (40)	I (1)	n	
19	3 a 4	IV (350)	II (180)	—	—	niet beh: V
20	8	v	—	I (10)	n	
21	± 4	I (20)	I (25)	I (8)	n	
22	0.1	v	IV	n	n	
24	—	III (180)	II (100)			
25	—	IV	IV			
Gem. v. nos. 10-25		2.4	1.7	0.5		

[1]) v = verontreinigd. [2]) n = negatief.

Dit blijkt ten duidelijkste als wij de andere nos. nagaan.

Hoewel het aantal tuberkelbacillen in het uitgangsmateriaal ook nog vrij groot is, is het toch belangrijk minder dan bij de Nos. 1—9.

Het voornaamste verschil is het vinden van negatieve uitkomsten.

Beschouwen wij de monsters 10—25, dan blijkt, dat het aantal negatieve uitkomsten met het stijgen der concentratie regelmatig toeneemt, n.l. van 0%—24%—53% tot 86% en indien wij de monsters afkomstig van caviae uitschakelen, zelfs tot 100%.

Wij zien hier direct dat de concentratie begrensd moet worden en de 5- en 7 N. niet voor practische toepassing in aanmerking kunnen komen.

7 N. doodt, bij weinig bacillenhoudend materiaal, alle bacterien en na de 5 N. behandeling tellen wij op alle gegroeide bodems in het geheel slechts 22 kolonien. (tabel VIII).

Het gemiddelde aantal dagen waarna macroscopisch groei waarneembaar is, wordt hier verlengd van 32 tot 51 dagen.

Blijven over de 1 en 3 N. kolom.

Er treedt bij het vergelijken van deze kolommen een storende factor op, n.l. het aantal verontreinigde culturen.

Dit bedraagt bij beide groepen nos. 1—9 en nos. 10—25 respectievelijk na 1 N. 33% en 45% en na 3 N. 0% en 6%.

Bij de gebruikte concentratie van 1 N. zwavelzuur is dit dus zoodanig dat ongeveer de helft der culturen niet voor het vergelijkend onderzoek geschikt is.

Dit doet de waarde der methode in dezen vorm toegepast zeer sterk dalen, ongeveer 50% verontreinigingen is voor een geregeld onderzoek te hoog. Hier staat tegenover, dat geen negatieve uitkomsten waargenomen werden, wat er dus op zou wijzen, dat deze normaliteit onschadelijk is voor tuberkelbacillen.

Later zal evenwel blijken, dat dit niet het geval is en bij stoffen die nog minder bacillen bevatten ook 1 N. zwavelzuur een nadeelige invloed kan uitoefenen.

Om het aantal verontreinigingen te reduceeren tot een gering aantal, kan men het 3 N. H_2SO_4 toepassen.

Zooals vermeld, bedraagt het aantal verontreinigde bodems dan slechts gemiddeld 5%, dus een zeer aanmerkelijk verschil, doch hier openbaart zich de nadeelige invloed van een te hooge concentratie; op 4 van de 17 culturen geënt met

secreta welke in ruime mate tuberkelbacillen bevatten, krijgen wij een negatief resultaat. Hier heeft dus het zuur of alle bacillen gedood of zoodanig aangetast, dat zij niet meer tot ontwikkeling komen.

Het totale aantal juiste uitkomsten bedraagt hier 70%.

Het geheel overziende blijkt, dat met een 3 N. behandeling meer positieve en meer juiste resultaten verkregen zijn dan na 1 N.; n.l. respectievelijk 70% en 55%.

Het geringe percentage juiste uitkomsten na 1 N. behandeling tegenover de 3 N. behandeling wordt veroorzaakt door de na de 1 N. behandeling optredende verontreigingen. Dit percentage is grooter, dan dat der negatieve dus foutieve uitkomsten na de 3 N. behandeling; het is dus hier een kiezen tusschen twee methoden met vrij veel onbevredigende uitkomsten.

Vergelijken wij het aantal kolonien, dan blijkt dat er bij gebruik van een lagere concentratie meer kolonien uitgroeien. Als wij de gemiddelden mogen nemen, dan vinden wij respectievelijk 2.4, 1.7, 0.5 en 0.

Tellen wij het aantal gegroeide kolonien op van alle correspondeerende culturen in elke kolom van de nos. 10—25, na uitschakeling der verontreinigde culturen, dan krijgen wij in deze volgorde 1573, 975, 11 en 0 kolonien (voor klasse IV is gemiddeld 300 kolonien genomen).

Hoewel dus hier betrekkelijk gunstige resultaten verkregen zijn bij 1 en 3 N. zwavelzuur behandeling, moet niet vergeten worden, dat hier zeer veel bacillen in het sediment aanwezig waren.

Een juister inzicht zou men kunnen krijgen, indien men deze monsters ging verdunnen, b.v. 100-voudig met steriele melk.

Deze proef is met een viertal uiersecreta genomen, zoodanig dat na verdunning microscopisch geen tuberkelbacillen meer aangetoond konden worden.

Hoewel een verschil merkbaar was — het aantal kolonien was geringer dan bij het origineele materiaal — was dit toch lang niet in die mate het geval als verwacht werd.

Bij een drievoudige verdunning was geen merkbare invloed te bespeuren.

Bij een tienvoudige verdunning van no. 18 was het aantal kolonien ongeveer op de helft teruggeloopen, n.l. 24 en 20 (orig. 32 en 40).

Bij een vijfvoudige verdunning van no. 17 kregen wij III en I (12) orig. IV en n. De positieve cultuur verkregen uit de verdunde melk, terwijl uit de onverdunde melk geen groei werd waargenomen, is een niet te verklaren onregelmatigheid. Wellicht heeft het 3 N. H_2SO_4 een te groote onbekende invloed.

Bij de tienvoudige verdunning van No. 22 resp. III en III (orig. v en IV).

Hoewel dus een zeer geringe verandering valt waar te nemen, is dit niet in evenredigheid met de verdunning. Na het afsluiten van het onderzoek, bleek uit een bespreking met *Bosgra*, die eveneens een onderzoek in deze richting instelde, dat deze uitkomsten eigenlijk verwacht kunnen worden. Het verdunnen van de melk gaat niet parallel met het verdunnen van het sediment, maar de verhouding der sedimenten van het te onderzoeken materiaal tot dat der melk die voor de verdunning gebruikt wordt, speelt een groote rol; misschien zijn nog enkele andere factoren van invloed.

Bij een tienvoudige verdunning van melk bevattende een sediment van 1.8 met melk waarvan het sediment 0.2 bedraagt, is het sediment van het nieuwe mengsel $0.18 + 9 \times 0.02 = 0.36$, waarvan de helft afkomstig is van het oorspronkelijke monster. Indien de sedimenten bedragen resp. 3.6 en 0.2, ontstaat bij een tienvoudige verdunning $0.36 + 9 \times 0.02 = 0.54$. In dit geval is 2/3 van het nieuwe sediment afkomstig van het uitgangsmateriaal.

Wij zouden dus in deze twee gevallen resp. de helft en twee derde van 't aantal koloniën kunnen verwachten ondanks een tienvoudige verdunning met melk.

Enkele bezwaren kunnen hier nog wel tegen ingebracht worden, doch het principe verdient alleszins nadere studie,

in het bijzonder wegens de beteekenis die het heeft bij het onderzoek van mengmelk. Practisch zal het wel niet zoo precies zijn als theoretisch berekend en het microscopisch onderzoek van de origineele en verdunde melk zullen hier wel een aanwijzing geven.

Resumeerende kunnen wij zeggen:

Een voorbehandeling met 5 en 7 N. zwavelzuur doodt alle of bijna alle tuberkelbacillen in uiersecreta welke niet sterk bacillen houdend zijn, of geeft althans geen groei op de daarmede geënte voedingsmedia. Bij secreta, welke zeer veel tuberkelbacillen bevatten, kan men met deze behandeling nog wel positieve culturen verkrijgen.

Ook 3 N. zwavelzuur geeft bij enting uit weinig t.b.c.-bacillen houdende uiersecreta nog een vrij hoog percentage negatieve uitkomsten.

Bij 1 N. is dit niet meer het geval, doch het groote aantal verontreinigingen bij den Dorsetbodem maakt deze methode ongeschikt voor practisch gebruik.

Dat 1 N. niet geheel onschuldig is, blijkt reeds ten deele uit No. 19, waarbij het gelukte een reincultuur zonder voorbehandeling te verkrijgen. Bij deze zien wij een duidelijk beslag waarbij geen geisoleerde kolonien voorkomen, terwijl bij de „1 N. cultuur" het aantal kolonien ong. 350, d.w.z. aanmerkelijk minder bedroeg.

De invloed van 1 N. blijkt uit de latere proeven.

Bij het verstrekken van gegevens dient dus het aantal bacillen in het uitgangsmateriaal in acht genomen te worden.

Tenslotte kan opgemerkt worden, dat hoewel het groeitempo eenigszins afhankelijk is van de gebruikte concentratie zwavelzuur, toch uit de gemiddelden blijkt, dat dit niet omgekeerd evenredig hiermede is. (*Korthoff* e.a.)

§ 3. Onderzoek met zwakkere concentraties.

De mogelijkheid om resultaten met zwakkere zuurconcentraties te verkrijgen was uitgesloten blijkens het groot aantal verontreinigingen op den Dorsetbodem.

Dit veranderde echter met het ingebruik nemen van den bodem van Petragnani.

Met dezen bodem was het volgens den auteur in een aantal gevallen mogelijk, zonder voorafgaande behandeling met zuur of alcali, een reincultuur uit infectieus materiaal te verkrijgen. Dit berust, zooals begrijpelijk, op de antiseptische werking van het malachietgroen. Bij zeer sterk verontreinigd materiaal paste *Petragnani* soms een voorbehandeling toe met 4% NaOH.

Doordat het materiaal van dierlijke origine wellicht iets meer verontreinigd is dan het van den mensch afkomstige, en door het weglaten van de glycerine uit de voedingsbodem, waren de uitkomsten, verkregen met dierlijk materiaal, ongunstig; slechts een enkele maal gelukte het een reincultuur te verkrijgen.

Glycerine werkt toch in zekere mate desinfecteerend en de toevoeging hiervan aan den voedingsbodem zal, zij het misschien in geringe mate, toch wel eenige invloed uitoefenen.

Ter verkrijging van betere resultaten, ligt het voor de hand, deze cultuurmethode te combineeren met de vinding van Löwenstein Sumiyoshi.

Van een aantal uiersecreta, gedeeltelijk dezelfde die voor andere proeven zijn gebruikt, werden op de reeds bekende manier de vorige proeven herhaald, doch nu werd het verkregen sediment behandeld met physiol. NaCl, 0.1, 0.5, 1 en 2 N. zwavelzuur.

De contrôle geschiedde op dezelfde manier, alleen kan opgemerkt worden dat het macroscopisch zichtbaar zijn der kolonien beinvloed zal worden door de groene kleur der bodem omdat de gele tuberkelbacillen kolonien hier iets eerder zichtbaar zullen zijn dan op den gelen Dorset of Lubenau bodem.

Bezien we eerst die reeks, waarbij de voorbehandeling geschiedde met physiol. NaCl. (Tabel IX, kolom I, blz. 73).

Het aantal verontreinigde culturen is, ondanks de genomen voorzorgen, vrij groot, n.m.l. 52%.

De voorbehandeling met steriele physiol. NaCl. solutie — in plaats van een directe enting uit het sediment — geschiedde, om een vergelijking met de met 10 c.c. zwavelzuur behandelde sedimenten te kunnen maken. Deze behandeling met physiol. NaCl. zal wellicht het aantal verontreinigers doen toenemen, zelfs meer dan indien direct uit het sediment geënt wordt.

Het groeitempo wordt, — blijkens kolom 3, 4 en 5 van tabel IX, niet of in zeer geringe mate beinvloed door de voorbehandeling met 0.1 en 0.5 N. zwavelzuur; het gemiddelde aantal dagen tot dat macroscopisch groei werd waargenomen bedraagt respectievelijk 22, 23 en 26; daar staat zelfs tegenover dat, zooals de nos. 18 en 22 te zien geven, na de indifferente voorbehandeling met physiol. NaCl. sol. geen groei werd waargenomen, terwijl de correspondeerende culturen aangelegd met materiaal voorbehandeld met 0.1 en 0.5 N. duidelijk positief zijn. Een waarneming waarvoor geen verklaring gegeven kan worden. Later zal dit feit nog even besproken worden.

Ook na een voorbehandeling met 1 en 2 N. zwavelzuur is er geen duidelijke vertraging in groei te constateeren.

Het gemiddelde aantal dagen waarna groei macroscopisch waarneembaar werd, blijft ook hier vrijwel gelijk, zelfs is dit na een voorbehandeling met 1 N. nog een dag korter dan na een voorbehandeling met 0.5 N.

Alleen de gevallen 3, 4, 9 en 12 geven met het stijgen der concentratie van 't gebruikte zuur een duidelijke verlangzaming en later waarneembaar zijn der kolonien, van resp. 21 tot 60 dagen, van 11—18, van 21 tot 38 en van 16 tot 24 dagen.

Dat het gemiddeld aantal dagen zoo zeer constant blijft, en zelfs lager wordt na een hoogere concentratie, hangt samen met de b.v. ongunstige uitkomst van No. 17 na de voorbehandeling met 0.5 N., terwijl deze factor geen invloed uitoefent op de gemiddelden in de overige kolommen.

Uit tabel IX blijkt, dat na 0.1 N. zwavelzuur behandeling geen onjuiste uitkomsten verkregen worden en dat het aantal

TABEL IX.

No.	Aantal bac. per gez.veld	Physiol.Nacl.		0.1 N.		0.5 N.		1 N.		2 N.		Aantal dagen micr. waarn. groei
		I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	
1	veel	23	IV	23	IV	29	IV	23	IV	29	IV	13
2	veel	18	III	18	III	v	v	14	I (20)	14	I (20)	11
3	veel	v	v	v	v	21	III	60	II	60	II	14
4	15	v	v	11	IV	11	IV	18	IV	18	IV	—
5	8	24	IV	24	IV	24	IV	24	IV	24	IV	14
6	8	28	V	24	IV	28	IV	28	IV	28	IV	18
7	4	22	V	22	IV	22	III	22	III	22	III	15
8	4	22	IV	26	IV	22	IV	22	III	22	III	—
9	2	v	v	21	III(200)	21	III (200)	25	I (35)	38	I (40)	16
10	2	18	IV	14	III	14	III	14	III	14	III	—
11	0.3	v	v	v	v	27	2 (55)	n	n	n	n	20
12	2	v	v	16	III	16	III	26	III	24	III	11
13	0.5	v	v	22	III (175)	22	III (175)	—	—	n	n	—
14	0.1	v	v	29	I (10)	n	n	n	n	n	n	21
15	0.2	v	IV	30	IV	25	IV	v	v	—	—	—
16	0.2	18	—	18	—	18	—	18	—	18	—	11
17	—	v	v	v	v	58	I (25)	n	n	n	n	—
18	—	n	n	35	I (10)	—	—	—	—	—	—	25
19	—	v	v	v	v	48	I (25)	n	n	n	n	28
20	—	v	v	35	I (25)	35	I (25)	35	I (40)	n	n	—
21	—	v	v	24	I (45)	21	I (30)	21	II (65)	—	—	—
22	—	n	—	p	—	p	—	n	—	—		44
23	—	p	—	p	—	p	—	n	—	—		38
Gem. aantal dagen		22		23		26		25		26		
Verontr.		52 %		17 %		5 %		5 %		0		
Negatief		9 %		—		5 %		29 %		34 %		
Positief		39 %		83%		90 %		66 %		66 %		

I = aantal dagen waarneembare groei.

II = aantal ontwikkelde koloniën.

De nos. 17—23 bevatten bij microscopisch onderzoek slechts spaarzaam bacillen.

n = negatief.

p = positief, doch alleen microscopisch.

v = verontreinigd.

positieve uitkomsten slechts gedrukt wordt door het aantal verontreinigingen, resp. 83% en 17%.

Bij de voorbehandeling met een 0.5 N. zwavelzuur komt de invloed reeds in geringe mate voor den dag.

Door de behandeling met 0.5 N. H_2SO_4, is de positieve cultuur, die verkregen werd bij no. 14 na een behandeling met 0.1 N. zwavelzuur, negatief geworden.

Er valt bij op te merken, dat het aantal groeikrachtige bacillen in dit monster gering is geweest, daar slechts 10 kolonien op den correspondeerenden bodem van 0.1 N. tot ontwikkeling gekomen zijn.

Gaan wij de resultaten na, verkregen bij een 1 en 2 N. zwavelzuur behandeling, dan zien wij de grootere invloed van het sterkere zuur op de uitkomsten.

Het aantal negatieven stijgt hier tot *resp. 29 en 34%*. Deze steriliseerende werking van het 1 en 2 N. zwavelzuur blijkt ook uit het minder worden van het aantal kolonien op de correspondeerende bodems, naarmate de sterkte van het zuur hooger wordt.

Dit zien wij speciaal bij de nos. 2, 8 en 9.

In tegenstelling hiermede wijzen no. 20 en 21 een iets betere — zij het slechts in geringe mate — groei aan; het is echter de vraag of dit werkelijk een gevolg is van de gevolgde techniek of dat hier sprake is van een schommeling binnen natuurlijke grenzen.

Bij de genoemde nos. 2, 8 en 9 is het aantal kolonien met 40—80% verminderd; (bij no. 2 van 200 tot 20 en bij no. 9 van 200 tot 35.)

In denzelfden lijn liggen de in deze kolom vermelde negatieve uitkomsten.

Na de behandeling met 1 N. wordt bij 6 onderzoekingen of 29% een negatieve uitkomst verkregen; en het valt op, dat daarbij juist met secreta gewerkt is, waarin zeer weinig tuberkelbacillen voorkomen. Hetzelfde zien wij in iets sterkere mate na de 2 N. zwavelzuur behandeling. Ook hier slechts negatieve bevindingen bij bacillenarme secreta.

Berekenen we het percentage negatieve uitkomsten, waarbij de nos. 1 tot 8 buiten beschouwing worden gelaten, dan stijgt dit door het 1 en 2 N. zwavelzuur tot ongeveer *50%*, hetwelk zeer hoog is.

Daarentegen is geen opmerkelijk verschil waar te nemen tusschen behandeling met 0.1 N. eenerzijds en 1 of 2 N. anderzijds bij die secreta, waar veel, i.c. meer dan 2 bacillen per gezichtsveld aanwezig zijn.

Clarenburg wijst er nadrukkelijk op, dat de 1 N. behandeling onschadelijk is voor tuberkelbacillen en hij beveelt het gebruik van deze concentratie aan. Wellicht is deze meening gebaseerd op feiten verkregen bij secreta waarin veel tuberkelbacillen aanwezig waren of zooals hij zegt: „als regel waren de bacillen in de gebruikte monsters gemakkelijk microscopisch aan te toonen". Voor onderzoek van gewone melk is de 1 N. concentratie dus zeer zeker te hoog en onbruikbaar, wat ook nog nader zal blijken.

Zooals uit andere gevallen blijkt, kan zelfs 0.1 N. zwavelzuur een ongunstige invloed uitoefenen op de groei van het aantal kolonien. Bij de nos. 6 en 10 is de invloed van deze geringe concentratie bemerkbaar, het aantal kolonien daalt hier van resp. V en IV tot IV en III.

Het geheel overziende, blijkt, dat wij binnen de grenzen van 0.1 en 0.5 N. moeten blijven. Het aantal positieve uitkomsten is hier het hoogst, n.m.l. 83 en 90%.

Het is jammer, dat één negatieve uitkomst verkregen werd na een behandeling met 0.5 N. zwavelzuur, wat natuurlijk twijfel wekt aan de geschiktheid van deze concentratie.

Gezien de iets betere uitkomsten zal de voorkeur gegeven moeten worden aan de 0.5 N. De latere onderzoekingen met gewone melk hebben deze conclusies bevestigd. Ook daar vindt men bij 1 N. behandeling foutieve uitkomsten, tegenover gunstige bij 0.5 en 0.1 N. behandeling.

Wij moeten echter rekening houden met een geringe kans op miswijzingen tengevolge van het feit dat ook 0.1 en/of 0.5 N. zwavelzuur een ongunstige invloed op de groei kan uitoefenen.

§ 4. Het microscopisch onderzoek der culturen.

Het voornaamste doel hiervan is een verkorting van het experiment te verkrijgen.

Gemiddeld bedraagt deze verkorting 10 tot 20 dagen, wat dus een aanzienlijke verkorting van den tijdsduur beteekent. Schakelen wij de nos. 19, 22 en 23 uit, dan is al reeds na twee tot drie weken een positieve bevinding te constateeren. Men zal echter — gezien enkele afwijkende gevallen (19, 22 en 23) — niet kunnen volstaan met een microscopisch onderzoek na drie weken. Van meer beteekenis is echter het microscopisch onderzoek ten einde een bodem definitief als negatief te registreeren.

Er deden zich twee verrassingen voor bij de twee laatst vermelde gevallen, n.l. nos. 22 en 23.

Bij het microscopisch onderzoek na 44 en 38 dagen, waren deze buizen duidelijk positief, terwijl nog geen groei met het bloote oog of de loupe waarneembaar was.

Bebroeding tot na 120 dagen gaf geen zichtbare kolonien, alleen op alle buizen een licht gele weerschijn.

Men dient derhalve, voordat een definitieve uitspraak gedaan wordt, een microscopisch onderzoek in te stellen, tot na zes weken bebroeding.

Deze termijn is zeer lang, doch alleszins gemotiveerd; dergelijke gevallen zullen zich speciaal daar voor doen, waar het gehalte aan tuberkelbacillen gering is.

Van Riemsdijk vermeldt, dat het microscopisch onderzoek spoediger tot een resultaat voert, als men het bezinksel van het condensvocht in dit onderzoek betrekt.

Door de facultatieve anaerobie zou de bacil zich daar sneller vermeerderen. Door *Korthoff* is hierop reeds kritiek geleverd.

Bij een veertigtal buizen werd hier een onderzoek naar ingesteld. Bij een duidelijke groei op de eioppervlakte, vindt men als regel in 't condensvocht gemakkelijk de tuberkelba-

cillen; deze zakken daar bij overvloedige groei als het ware in en vormen een soort sediment.

Indien echter nog geen groei op de bodems zichtbaar is, vindt men in het uitstrijkje van het diepste gedeelte van 't condensvocht niets of slechts enkele bacillen.

Veel spoediger kan men de tuberkelbacillen microscopisch aantoonen, indien men een uitstrijkje maakt van de ei oppervlakte *dicht* bij het condensvocht. Ter plaatse zien wij ook als regel de eerste kolonien verschijnen. Laatstgenoemde plaats verdient verre de voorkeur boven het condensvocht.

Na het slechte resultaat van een veertigtal preparaten is de onderzoekingsmethode volgens *van Riemsdijk* achterwege gelaten.

§ 5. Groeibevorderende werking van „hoogere" concentraties.

Clarenburg e.a. is het opgevallen, dat een enkele maal die secreta, welke voorbehandeld zijn met 1 N. of 2 N. zwavelzuur, een beter en duidelijker cultuur geven dan de met een lagere zuurconcentratie of geheel niet voorbehandelde secreta.

Ook de gegevens in tabel IX nos. 20 en 21 wijzen in deze richting; terwijl toch het aantal gegroeide kolonien na de 1 N. behandeling resp. 40 en 65 bedroeg, was het overeenkomstige aantal na behandeling met 0.1 en 0.5 N. zwavelzuur resp. 25, 25, 45 en 30, dus ongeveer de helft van het eerste aantal. Veel sterker spreekt dit in de gevallen 18 en 22. Hierbij blijft elke groei op de contrôle bodems geënt met secreta, welke met een indifferente stof behandeld zijn, geheel achterwege, terwijl elders duidelijke groei optreed. Deze bevindingen zijn eenigszins onbegrijpelijk. Bij de twee laatste gevallen is een physische oorzaak niet geheel uit te sluiten (coaguleeren door zuurinwerking, welke bij physiol. keukenzoutsol. achterwege blijft, enz.).

Wij kunnen hier twee veronderstellingen maken:

1. Bij het enten wordt behalve het sediment een geringe hoeveelheid zuur op het voedingsmedium gebracht, waardoor

een geringe verandering van den bodem ter plaatse mogelijk is. Deze verandering hangt natuurlijk samen met de normaliteit van 't gebruikte zuur en wordt duidelijk gedemonstreerd door de optredende kleurverandering naar groen tot donkergroen; bij 0.1 N. treedt een geringe, bij 1 N. zuur een duidelijke kleurverandering op.

Deze verandering zou zoodanig gunstige omstandigheden voor de groei kunnen scheppen, dat de achterstand door de zuurinwerking ingehaald en voorbijgestreefd wordt.

Het is mogelijk, dat door de vele variaties in tuberkelbacillenstammen, slechts enkele deze afwijkende reactie prefereeren.

TABEL X.

Aantal dagen waarneembare groei bij de proef met opgebracht zwavelzuur.

No.	Physiol.	0.1 N.	0.5 N.	1 N.
1	11	11	13	13
2	12	12	12	12
3	10	10	10	14
4	12	12	12	9
5	12	12	17	17
6	21	21	17	21
7	13	13	13	16
8	18	16	18	18
9	19	15	15	15
10	18	18	18	18
11	24	21	21	21
12	18	18	18	18
Gemidd.	16	15	15	16

2. Als tweede mogelijkheid kan gedacht worden aan een soort „anreichern" door de zuurbehandeling en inderdaad is de hoeveelheid sediment die men krijgt na het sedimenteeren van het mengsel zuur en materiaal verschillend, afhangend van de normaliteit. Immers de s.g. van 0.1, 0.5, 1 en 2 N. H_2SO_4 loopen zoodanig uiteen, dat zulks te verwachten is.

Met 0.1 N. verkrijgt men veel meer sediment dan bij 1 N. bij centrifugeeren gedurende denzelfden tijd.

Een duidelijk verschil in bacillenrijkdom der sedimenten van de met 0.1 en 1 N. zuur voorbehandelde secreta is echter bij microscopisch onderzoek nimmer geconstateerd.

Ten einde eveneens de eerste mogelijkheid te onderzoeken werden van een aantal beschikbare stammen emulsies gemaakt met physiol. NaCl. De emulsies werden gedurende 20 minuten flink geschud om een zoo homogeen mogelijk mengsel te verkrijgen. Daarna werden deze emulsies door een steriel fijn filtreerpapier gefiltreerd, zoodat eventueele resten en vlokken verwijderd werden.

Vervolgens werd nogmaals gedurende 10 minuten geschud. Van de emulsies werd één öse geënt op verschillende voedingsmedia, waarbij dezelfde manipulaties werden verricht, door tweemaal met de öse over het oppervlak te strijken.

Na afloop hiervan werd een öse 1 N., 0.5, en 0.1 N. zwavelzuur en physiol. NaCl. over de verschillende geënte bodems verwreven.

Na elke week werd regelmatig nagegaan of eenig verschil in groei te bemerken was.

Het aantal kolonien bleek voor de correspondeerende bodems vrij constant, hetgeen tevens een aanwijzing is voor de juiste uitvoering der proef.

Het aantal dagen, waarna de groei met de loupe voor het eerst waarneembaar was, werd genoteerd, terwijl tevens nagegaan werd of eventueele verschillen duidelijker aan den dag traden na langer bebroeden.

Er wordt hierbij opgemerkt, dat in dit geval gewerkt is met culturen.

Volgens tabel X blijkt dat slechts in één geval, n.l. no. 4 de met 1 N. H_2SO_4 bestreken bodem een sneller groei te zien gaf, afwijkende van alle andere 11 stammen.

Ter controle werd met deze stam de proef herhaald. De met 1 N. H_2SO_4 bestreken bodem gaf tegenover de andere weer een duidelijke groeiverbetering. De stam was snelgroei-

end, geisoleerd uit normaal uitziende melk en cavia pathogeen.

De andere 11 stammen vertoonen evenwel zonder onderscheid een minder snelle groei op de 1 N. bodem.

Ook de nabehandeling met physiol. NaCl. heeft schijnbaar niet gunstig gewerkt op de ontwikkeling van de tuberkelbacillen kolonien.

Het gunstigst zijn die culturen waar 0.1 N. en 0.5 N. zuur op den bodem verwerkt is.

Voor enkele stammen schijnt dit tegelijk opgebrachte zuur gunstig te werken. Of hiermede echter het bovenaangehaalde feit van duidelijker groei bij sterkere zuren, voldoende verklaard is, is nog een vraag .

TWEEDE AFDEELING.

PRACTISCHE TOEPASSING VAN DE BIJ DE STUDIE DER CULTUURMETHODEN VERKREGEN RESULTATEN.

HOOFDSTUK V.

ONDERZOEK VAN VLEESCH VAN TUBERCULEUZE DIEREN.

Het ligt voor de hand, dat aan de mogelijkheid gedacht werd om door middel van deze cultuurmethode tuberkelbacillen in vleesch in engeren zin (musculatuur) aan te toonen.

Hiervoor kwam natuurlijk dat vleesch, hetwelk krachtens thans algemeen geldend inzicht geacht moet worden tuberkelbacillen te bevaten, het eerst in aanmerking.

Bij dit onderzoek is het niet in de eerste plaats de bedoeling geweest vast te leggen bij welke dieren en bij welke vormen van tuberculose wel en bij welke geen tuberkelbacillen in de musculatuur voorkomen, m.a.w. criteria te vinden waardoor een scherpe grens getrokken zou kunnen worden omtrent het al of niet aanwezig zijn van bacillen; daartoe is de cultuurmethode nog te weinig toegepast.

Alleen is getracht uit te maken, of het, evenals dit gelukte bij de later te vermelden monsters melk, mogelijk was, in vleesch van dieren met bepaalde vormen van tuberculose, tuberkelbacillen cultureel aan te toonen.

Het is bekend, dat het aantal bacillen in de musculatuur

zeer gering kan zijn. Bij echte septichaemien van niet tuberculeuzen aard, waar men massa's bacillen in de parenchymateuse organen en ev. in het bloed aantreft, vindt men cultureel in het spierweefsel slechts zeer weinig of zelfs geen bacteriën, zoodat het zelfs voor kan komen, dat een klein stukje vleesch blijkens bacteriologisch onderzoek steriel is, terwijl een overeenkomstig stukje uit de naaste omgeving bacteriehoudend blijkt te zijn.

Dit heeft er toe geleid, ten einde juiste uitkomsten te verkrijgen, bij het bacteriologisch onderzoek van vleesch relatief groote stukken (ong. 1 c.M.^{3}) in of op een bepaald voedingsmedium te brengen.

Enkele gegevens welke hierop betrekking hebben, vermelden getallen beneden honderd per c.M.^{3}

Er zijn nog geen aanwijzingen, welke het tegengestelde doen vermoeden bij de acute vormen van algemeene tuberculose, integendeel wijst het aantal en de verspreiding der haardjes bij haematogene niertuberculose toch wel in dezelfde richting.

Men zou als bezwaar kunnen aanvoeren, dat de oorzaak van de verschillen in bacterierijkdom in organen en musculatuur niet voldoende bekend is en dat men een tuberkelbacil niet vergelijken mag met elke andere willekeurige bacil; doch dit is geen argument tegen het gehalte.

Men kan natuurlijk bij dit onderzoek niet een stukje vleesch van ong. 1 c.M.^{3} nemen en op de daarvoor bestemde voedingsbodem brengen en nagaan of na eenige weken tuberkelbacillen aan te toonen zijn. De chemische en enzymatische omzettingen in vleesch maken groei voor tuberkelbacillen onmogelijk.

Men dient derhalve iets anders te nemen en in navolging van de gebruikelijke methoden is het uitgeperste spiersap als uitgangsmateriaal gebruikt. Dit spiersap is dan te vergelijken met melk, en kan op overeenkomstige wijze onderzocht worden.

Het is zeer waarschijnlijk te achten, dat bij het bereiden van vleesch- of spiersap lang niet alle eventueel in het vleesch

aanwezige tuberkelbacillen in het perssap zullen overgaan. Een groot gedeelte zal in het vooraf zoo fijn mogelijk gemaakte vleesch (gehakt) achterblijven; verhoudingen van het aantal bacillen, dat uitgeperst wordt tot dat hetwelk in het vleesch achterblijft, zijn niet bekend.

Als wij nu hierbij nog in aanmerking nemen, dat volgens Prof. *Klein* voor het verkrijgen van een tuberkelbacillencultuur minstens 250 bacillen noodig zijn, blijkt wel, dat wij een „Anreicherungsverfahren" moeten toepassen.

Het meest voor de hand liggend is de centrifuge te gebruiken, zooals dit bij melk geschiedt en het ontstane sediment verder te verwerken.

Het is echter zeer twijfelachtig of dit werkelijk het verwachte resultaat geeft en de tuberkelbacillen naar de periferie geslingerd worden.

Bij melk is het ook niet zoozeer de tuberkelbacil, die naar binnen of naar buiten wordt geslingerd, doch de in de melk aanwezige vetbolletjes, respectievelijk cellen, welke door het verschil in s.g. uitgeslingerd worden. Deze vetdeeltjes en cellen nemen de tuberkelbacillen mede.

Bij spiersap is de toestand geheel anders; de eventueel voorkomende tuberkelbacillen zullen vrij in het uitgeperste sap zweven, en het is zeer goed mogelijk, zelfs waarschijnlijk, dat hier van een opeenhooping, d.w.z. een uitslingeren van de tuberkelbacillen geen sprake is.

Het s.g. van de tuberkelbacillen is niet van dien aard, dat wij dit hier mogen aannemen.

Van deze methode is derhalve geen gebruik gemaakt.

Een betere methode zou zijn het filtreeren van het spiersap, door een filter welke de tuberkelbacillen niet doorlaat.

In de eerste plaats komt hier een porceleinen kaars (Chamberland) voor in aanmerking, maar deze is meer geschikt om bacterievrije filtraten te verkrijgen en met deze filtraten te experimenteeren, dan om het achtergeblevene op de kaars als uitgangsmateriaal te gebruiken.

De bacillen dringen in het buitenste laagje en men zou

derhalve genoodzaakt zijn dit af te schrappen en uit dit afschraapsel te cultiveeren en/of in te spuiten bij proefdieren.

Technisch stuitte dit op zooveel moeilijkheden dat ook hiervan moest worden afgezien.

Prof. Eykman (11) heeft bij het bacteriologisch onderzoek van leidingwater een filtratie door een agarlaag toegepast.

In leidingwater komen zeer weinig micro-organismen voor en om deze te concentreeren filtreerde hij een bepaalde hoeveelheid leidingwater door een agarlaag van bepaalde dikte. Hierbij bleven de kiemen op de agar achter.

Dit principe is bij het onderzoek van vleeschsap toegepast. De voordeelen tegenover de kaarsmethode zijn belangrijk. Na het doorfiltreeren van een vrij groote hoeveelheid spiersap zijn alle bacillen in of op de agarlaag verzameld, dus sterk geconcentreerd aanwezig. Nu is de kans grooter dat deze bacillen hetzij cultureel of op andere wijze aangetoond kunnen worden. Vooraf dient nagegaan te worden of deze methode bruikbaar is voor spiersap en of alle tuberkelbacillen tegengehouden worden.

In het begin leverde de werkwijze eenige moeilijkheden op, doch tenslotte is een goede werkmethode gevonden, welke aan de gestelde eisch van tegenhouden der tuberkelbacillen voldeed, terwijl tevens de agarlaag cultureel kon worden onderzocht.

Misschien kan deze filtratiemethode ook voor andere stoffen gebruikt worden, b.v. melk.

Bij het verwerken van de agarlaag op een Petragnani bodem, deden zich veel storende factoren voor, welke echter na lang zoeken alle weggenomen konden worden.

De werkwijze is als volgt:

Er wordt gebruik gemaakt van een porceleinen trechter met vaste zeefplaat.

Men kan zoowel het cylindrische- als kegelvormige model gebruiken, doch het cylindrische model heeft de voorkeur, daar hier de middellijn der zeefplaat evengroot is als die van den

cylinder. Bij het kegelvormige model krijgt de trechter, wil men een behoorlijk groote zeefplaat hebben, ongewenscht groote afmetingen.

De middellijn van de vaste zeefplaat varieerde van 10 tot 14 c.M. Een aantal dezer trechters wordt met doorboorde gummistoppen op zuigkolven geplaatst, welke door vacuumslangen in verbinding staan met een waterstraalluchtpomp.

Tusschen de waterstraalluchtpomp en de zuigkolf is als reservoir een tweede kolf geplaatst, waarop een kwikmanometer met gesloten been is aangebracht.

Tusschen de zuigkolven en 't reservoir zijn driewegkranen ingeschakeld, zoodat elke zuigkolf met de buitenlucht in verbinding kan worden gebracht of geheel uitgeschakeld kan worden. Met behulp van de waterstraalluchtpomp kan de spanning der lucht in de kolven tot een kwikdruk van ong. 2 c.M. verlaagd worden. Het drukverschil bedraagt dan bijna 1 atmospheer, hetgeen voldoende is voor snelle filtratie.

Men moet zorgen, dat de afvoerslang van de waterstraalluchtpomp voldoende lang is en het water ongehinderd kan afvloeien.

Rest nu nog het gereedmaken van het filter.

Vooraf wordt met waterpassen gecontroleerd, dat de porceleinen filters zooals zij bevestigd zijn op de kolven, horizontaal staan, daar anders de later opgebrachte agar zich ongelijkmatig over het filter verdeelt en men dunne en dikke gedeelten zou krijgen.

Daarna wordt een dik schijfje filtreerpapier op de zeefplaat gebracht en hierop een schijfje van gehard filtreerpapier. *Eykman* gebruikt voor zijn filtratie van leidingwater Schleicher No. 591 en Schleicher No. 575; ook andere soorten van ongeveer dezelfde qualiteit voldoen. De schijfjes worden nat gemaakt en het overtollige water even afgezogen. Na dit afzuigen opent men de kraan, zoodat de druk onder en boven het filtreerpapier gelijk wordt. De filtreerpapiertjes komen nu plat op de porceleinen zeefplaat te liggen. Blijft eventueel nog lucht tusschen of onder de filtreerpapiertjes, dan moet deze

verwijderd worden, teneinde alle oneffenheden in het oppervlak te voorkomen, zoodat later een gelijkmatige verdeeling van de agar verkregen wordt. Men zou bij een ongelijkmatige verdeeling dunne gedeelten in den agarlaag verkrijgen, en wellicht zou deze daardoor lekken of niet voldoende filtreeren.

De vooraf opgesmolten en tot 60° C. afgekoelde 3% wateragar (dus agar alleen vermengd met leidingwater) wordt nu voorzichtig hierop gebracht. Men doet dit eerst druppelsgewijs, zoodat een dun laagje ontstaat, dat snel stolt. Indien de geheele vereischte hoeveelheid agar ineens op het filter gegoten wordt, loopt een gedeelte hiervan door het filter heen, wat in verband met de nauwkeurig afgemeten hoeveelheid een onjuiste en onregelmatige dikte der laag zou geven. Speciaal treedt dit euvel op, wanneer de agar nog onvoldoende is afgekoeld. Is het gestolde, dunne laagje aanwezig, dan giete men snel de rest hierop, zoodat de agar zich door zijn goed vloeibare toestand gelijkmatig over de geheele oppervlakte verspreidt.

De hoeveelheid op te brengen agar is natuurlijk afhankelijk van de grootte van de zeefplaat en als juiste hoeveelheid is in overeenstemming met *Eykman* gevonden r^2 c.c. (r = straal zeefplaat). De dikte van de agarlaag is dan $\frac{1}{3.14}$ c.m. $= \pm 3$ m.m.

Bij het gebruik van de aldus zorgvuldig klaargemaakte toestellen bleek, dat in een groot aantal gevallen de filtratie zeer snel geschiedde, sneller dan overeenkwam met de verwachting, maar tevens was in die gevallen het filtraat niet steriel. Ons filter werkte dus onvoldoende. De oorzaak kon een iets loslaten van den agar aan den rand zijn, waardoor misschien fijne porien ontstonden, welke het vleeschwater bij een drukverschil van 1 atmospheer zeer snel laten doorloopen.

Een enkele maal was het duidelijk zichtbaar dat de agar iets van den porceleinen trechterwand losgelaten had.

Ten einde dit euvel te verhinderen werd een glazen cirkelvormige ring van ong. 1 c.m. hoogte, verkregen door uitsnijden uit het deksel van een Petrischaal, op de agarplaat

geplaatst. De straal van de glazen ring moet ongeveer ½ c.m. kleiner zijn dan die van de zeefplaat. Tusschen trechterwand en glazen ring giet men nu langzaam druppelsgewijs gesmolten en tot 60° afgekoelde 3% wateragar.

Dit laatste dient zeer langzaam te geschieden, zoodat de agar niet onder de glazen ring door loopt. Men krijgt nu een dikke agar laag welke de rand van het agarfilter neerdrukt. Storingen door het niet steriel zijn van het filtraat kwamen nu niet meer voor.

Vóór het opgieten van de agar moet de druk in de kolf gelijk zijn aan één atmospheer, daar anders geringe hoeveelheden agar doorgezogen worden.

Na 2 à 3 uur is het filter klaar voor gebruik.

Het filtreeren geschiedt zeer langzaam. Indien men op een filtreerend oppervlak met een straal van ong. 4 à 5 c.m. 40 tot 50 c.c. vleesch-perssap giet, is bij een drukverschil van 1 atmospheer deze hoeveelheid na gemiddeld 24 uur doorgeloopen.

Het verdient aanbeveling het vleeschperssap vooraf door filtreeren door gewoon filtreerpapier van de grovere onreinheden en vleeschdeeltjes te zuiveren.

Men kan het filtratieproces bespoedigen door òf de concentratie van de wateragar, òf de dikte van het agarlaagje te verminderen.

Enkele proeven werden in deze richting genomen. Bij gebruik van 2% wateragar bleken evenwel de tuberkelbacillen het filter te passeeren. Eveneens was dit het geval, indien de opgegoten hoeveelheid wateragar werd verminderd tot resp. 3/4 r^2 en 2/3 r^2 c.c.

De contrôle van de agarfilter geschiedde door 40—50 c.c. vleeschperssap van normaal vleesch, na vermenging met een emulsie van een tuberculeuze lymphklier of tuberkelbacillenhoudende secreta, te filtreeren.

Het filtraat werd dan met behulp van de caviaproef onderzocht op tuberkelbacillen.

In die gevallen waarin minder agar op het filter werd ge-

bracht of een 2% agar oplossing gebruikt werd, was de dierproef met het filtraat positief.

Voorafgaande oriënteerende proeven kunnen door cultureel-bacteriologisch onderzoek van het filtraat geschieden.

Twee monsters vleeschsap, waarin veel tuberkelbacillen voorkwamen, werden gefiltreerd door precies volgens het aangegeven schema bereide filters.

In het filtraat waren volgens de caviaproef geen tuberkelbacillen aanwezig. Het filtraat bleek bij bacteriologisch onderzoek door middel van een agarplaat geen of slechts enkele bacterien te bevatten.

Het is bij elke filtratieproef noodig het filtraat bacteriologisch te onderzoeken, daar een kleine fout of lekken van het filter de proef onbetrouwbaar maakt. Dit bacteriologisch onderzoek wijst binnen 24 uur uit of ons filter goed gefunctioneerd heeft en dus of de proef voortgezet kan worden.

Dit laatste sluit in dat de zuigkolf met filter en papier vooraf geheel gesteriliseerd moeten worden; dit geschiedt het eenvoudigst door het geheel gewikkeld in filtreerpapier te steriliseeren, zoodat ten allen tijde het geheel klaar is voor 't gebruik.

Het bereide vleeschsap is ondanks alle genomen voorzorgen niet meer steriel, maar meestal sterk verontreinigd. Door de lange duur der filtratie krijgt men in dit vleeschsap een sterke vermeerdering dezer micro-organismen, zoodat op het agarlaagje zich een laag bacterien ontwikkelt, welke zeer storend werkt bij het verdere onderzoek. Indien getracht wordt met voorafgaande zuurbehandeling uit de agarlaag te cultiveeren, treedt in bijna alle gevallen een verontreiniging op. Een proefdier met deze agarlaag ingespoten sterft meestal intercurrent.

Getracht werd een methode te vinden waardoor dit euvel achterwege bleef.

In het begin werd de agarfilter vermengd met een hoeveelheid malachietgroen, welke zooals voldoende gebleken is, geen nadeelige invloed uitoefent op de tuberkelbacil en de vermeer-

dering van banale kiemen tegengaat. Dit loste het vraagstuk evenwel onvoldoende op. Er ontstond in het op het filter aanwezige vleeschperssap nog een zoodanige vermeerdering van kiemen, dat de reeds vermelde nadeelen niet werden opgeheven.

Toen werd malachietgroen in dezelfde concentratie toegevoegd aan het vleeschperssap en op deze wijze werden behoorlijke resultaten verkregen. Een vermeerdering van de reeds aanwezige micro-organismen bleef door de antiseptische werking van het malachietgroen vrijwel achterwege.

Toch bevredigde dit systeem niet geheel en al. Het malachietgroen is hier in een vloeistof aanwezig en het bezwaar is zeer zeker gegrond, dat de werking van deze stof in een vloeistof intensiever, althans niet gelijk is aan de werking zooals we die kennen in een vaste voedingsbodem.

Ten slotte werd de volgende wijziging aangebracht, die zeer goed voldeed.

Op het sluitstuk van de zuigkolf waaraan de vacuumslang verbonden wordt, werd een kraan aangebracht.

Is de lucht door de waterstraalluchtpomp weggezogen en het vleeschsap op het filter gebracht, dan wordt de kolf door middel van de kraan afgesloten, de vacuumslang verwijderd en het geheel, d.w.z. de luchtledige kolf met filter en vleeschsap, in de ijskast geplaatst. Bij de daarin heerschende temperatuur blijft vermeerdering van bacterien practisch achterwege en de nadeelige gevolgen werden niet meer waargenomen. De genoemde werkwijze heeft 2 voordeelen:

a. De slechts tendeele bekende factor van het malachietgroen is geheel geëlimineerd.

b. Men heeft evenmin nadeelige gevolgen te wachten van het inspuiten bij een proefdier van een niet geringe hoeveelheid malachietgroen.

Het filtreeren in de ijskast heeft bovendien nog dit voordeel, dat de temperatuur waarbij men filtreert, constant is; eventueele consistentieverandering van de agar, ontstaan door temperatuurwisseling, is uitgesloten.

Na 24 uur is meestal het op het filter gegoten vleeschsap doorgefiltreerd en zoo dit nog niet het geval is, kan men de termijn ongehinderd met een dag verlengen. Men doet evenwel goed met zoo nu en dan te controleeren of de kolf nog luchtledig is, door deze even aan het leeggepompte reservoir met de kwikmanometer aan te sluiten. Het kan voorkomen, dat door minder goed sluiten van de gummistop of van de kraan lucht toegetreden is, welke men dan opnieuw moet wegzuigen. Bij toetreden van de lucht is het drukverschil geringer en de filtratiesnelheid verminderd.

Is alles doorgefiltreerd, dan blijft een dun agarschijfje ter dikte van 1 à 2 m.m. over, waarop en waarin zooals de contrôle proeven hebben uitgewezen, alle eventueel aanwezige tuberkelbacillen achtergebleven zijn. Dit laagje is dunner dan het theoretisch zou moeten zijn; wellicht is dit een gevolg van iets uitdrogen, als de kolf nadat alle vloeistof doorgeloopen is, nog eenigen tijd blijft staan; dit laatste is natuurlijk niet altijd te vermijden.

De bedoeling is nu het agarfilter zoo goed en volledig mogelijk op den daarvoor geschikten voedingsbodem te brengen. Het bleek niet mogelijk direct deze agarlaag te enten op de Petragnani bodem. Het aantal aanwezige kiemen was zoo groot of van dien aard, dat regelmatig alle bodems binnen korten tijd overgroeid waren met banale kiemen.

Het eenige mogelijke was derhalve ook hier weer de zuurbehandeling toe te passen, hoewel dit een niet te ontkomen nadeel heeft.

De bacillen zijn door een vrij ingewikkeld proces op een agarlaagje geconcentreerd en nu moest, ter bereiking van het gestelde doel, deze concentratie gedeeltelijk weer opgeheven worden door vermenging, en dus verdunning met een geheel nieuwe vloeistof i.c. zwavelzuur.

Om deze verdunning zoo gering mogelijk te maken, werd het agarlaagje vermengd met een slechts zeer geringe hoeveelheid zwavelzuur.

In vooraf klaargezette steriele mortiertjes werd ongeveer 1 c.c. zwavelzuur van de vereischte concentratie gedaan en hierbij de gewenschte hoeveelheid agar. De agar wordt door het zuur eenigszins taai en moet met behulp van een stamper zoodanig fijn gewreven worden, dat het zwavelzuur op alle deelen kan inwerken.

Indien de agar direct met het zwavelzuur in een centrifugebuisje gebracht wordt, wordt de agar tot een vast klompje en is de inwerking van het zwavelzuur onvoldoende. Ook schudden helpt hier niet.

Na voldoende lange inwerkingsduur (20 minuten) wordt het mengsel overgebracht in een centrifugebuisje, 5 minuten gecentrifugeerd en het sediment verwerkt op den eibodem.

Het is zeer waarschijnlijk, dat de tuberkelbacillen zich blijven hechten aan de eenigszins grofvlokkige agar en dat derhalve de groote hoeveelheid bacillen met de gesedimenteerde agar meegenomen wordt en op het voedingsmedium overgebracht.

Door het vele sediment was het onmogelijk cultuurbuizen te gebruiken (het oppervlak hiervan is te klein), derhalve werd op platen geënt.

Bijzondere voorzorgen dienen genomen te worden ten einde het uitdrogen van de eiplaat tijdens het lange verblijf in de broedstoof te voorkomen.

Doozen van geslepen glas, in den vorm van Petrischalen, werden hiervoor gebruikt. In het deksel bevindt zich een gleuf, waarin de rand van de doos precies past.

Deze afsluiting, hoewel beter dan van een gewone Petrischaal, is evenwel nog onvoldoende. Om een volledige afsluiting te verkrijgen, werd aan de rand een dun laagje paraffine aangebracht.

Indien men de platen evenwel wil bezien of een microscopisch onderzoek instellen, waarbij dit laagje paraffine weggenomen moet worden, blijkt, dat de platen de volgende dagen zeer dikwijls verontreinigd zijn. Ook gaat het verwijderen van

de paraffine als regel gepaard met een besmeuren van de ingeslepen gleuf.

Beter is het gebruik van leucoplast, dat om de buitenwand gewikkeld wordt; dit laatste waarborgt een volkomen afsluiting en is zeer gemakkelijk te verwijderen.

Bij het onderzoek van vleesch, afkomstig van een aantal dieren met miliaire en andere ernstige vormen van tuberculose, werd de beschreven methode toegepast.

Het is de bedoeling, na te gaan, of met deze methode, waarbij meestal 50 c.c. vleeschsap werd doorgefiltreerd en de eventueel aanwezige tuberkelbacillen dus sterk werden geconcentreerd op de agarlaag, deze bacillen zijn aan te toonen met behulp van den glycerinevrijen Petragnani bodem.

De voorbehandeling met 0.1, 0.5 en 1 N. zwavelzuur duurde, zooals bij alle andere experimenten, 20 minuten.

De platen werden tot na 90 dagen gecontroleerd op eventueel optredende groei van tuberkelbacillen.

No. 1. 50 c.c. rundvleesch perssap na 24 uur doorgefiltreerd.

	macroscopisch	*microscopisch.*
0.1 N.a:	fijne groenglanzende kolonien?	negatief.
0.1 N.b:	??	negatief.
0.5 N.a:	geen groei	negatief.
0.5 N.b:	??	negatief.
1 N.a:	geen groei	negatief.
1 N.b:	idem	negatief.

No. 2. 40 c.c. varkensvleesch perssap.

0.1 N.a:	negatief	negatief.
0.1 N.b:	granuleus uiterlijk bodem .	negatief.
0.5 N.a:	idem	negatief.
0.5 N.b:	idem	negatief.
1 N.a:	idem	negatief.
1 N.b:	idem	negatief.

No. 3. 50 c.c. rundvleesch perssap na 2 × 24 uur doorgefiltreerd.

	macroscopisch	*microscopisch.*
0.1 N.a:	grootste deel verontreinigd	bacillen.
	klein gedeelte geen groei .	bacillen.
0.1 N.b:	klein gedeelte verontreinigd	bacillen.
	groot gedeelte geen groei .	negatief.
0.5 N.a:	negatief	negatief.
0.5 N.b:	verontreinigd	bacillen en coccen.
1 N.a:	negatief	negatief.
1 N.b:	negatief	negatief.

No. 4. 50 c.c. rundvleeschsap, na 1 × 24 uur doorgefiltreerd.

niet behandeld:	verontreinigd . . .	bacillen.
0.1 N.a:	verontreinigd over grootste gedeelte der plaat . . .	coccen.
0.1 N.b:	negatief	negatief.
0.5 N.a:	negatief	negatief.
0.5 N.b:	groei over grootste gedeelte der plaat	coccen.
1 N.a:	verontreinigd	coccen.
1 N.b:	steriel	negatief.

No. 5. 0.1 N.a: na 40 dagen steriel, met 2 kol op geheele plaat; na 54 dagen geheel overgroeid bacillen.

0.1 N.b:	verontreinigd	bacillen.
0.5 N.a:	veel witgrijze fijne kolonien	bacillen.
0.5 N.b:	negatief	negatief.
1.- N.a:	idem	negatief.
1.- N.b:	idem	negatief.

No. 6. 45 c.c. vleeschsap rund, na 36 uur doorgefiltreerd.

onbeh. a:	verontreinigd	lange bacillen.
onbeh. b:	verontreinigd	lange bacillen.
0.1 N.a:	verontreinigd	lange bacillen.

	macroscopisch	*microscopisch.*
0.1 N.b:	steriel	steriel.
0.5 N.a:	steriel	steriel.
1 N.a:	idem	steriel.
1 N.b:	idem	steriel.

0.5 N.b: gebroken.

No. 7. varkensvleeschsap, 50 c.c. na 2 4uur doorgefiltreerd.

onbeh. a:	verontreinigd door bruin beslag plaat	lange staven
onbeh. b:	verontreinigd door bruin beslag plaat	lange staven
0.1 N.a:	verontreinigd	coccen en staven.
0.1 N.b:	verontreinigd	coccen en staven.
0.5 N.a:	verontreinigd	coccen.
0.5 N.b:	steriel	steriel.
1 N.a:	steriel	steriel.
1 N.b:	steriel	steriel.

No. 8. vleeschsap paard, 40 c.c. na 24 uur doorgefiltreerd.

0.1 N.a:	¼ oppervl. verontreinigd, rest steriel	bacillen.
0.1 N.b:	verontreinigd	bacillen.
0.5 N.a:	grootendeels verontreinigd	bacillen.
0.5 N.b:	steriel, klein gedeelte enkele coccen kolonien.	
1 N.a:	steriel	negatief.
1 N.b:	steriel	negatief.

Op 0.5 N.a zouden kolonien van tuberkelbacillen op het niet verontreinigde gedeelte zeer goed waarneembaar zijn geweest.

No. 9. rundvleeschsap, 50 c.c. na 36 uur doorgefiltreerd.

0.1 N.a:	grootste gedeelte verontreinigd	bacillen.
	klein gedeelte negatief .	negatief.
0.1 N.b:	geheel verontreinigd . .	lange staven
0.5 N.a:	negatief	negatief.

	macroscopisch	*microscopisch.*
0.5 N.b:	enkele groote witte kolonien (5)	bacillen.
	rest steriel	negatief.
1 N.a:	steriel	negatief.
1 N.b:	steriel	negatief.

No. 10. varkensvleeschsap, 50 c.c. na 24 uur doorgefiltreerd.

0.1 N.a:	fijn granuleus uiterlijk bodem	negatief.
0.1 N.b:	idem	negatief.
0.5 N.a:	idem	negatief.
0.5 N.b:	idem	negatief.
1 N.a:	idem	negatief.
1 N.b:	kolonien? groen glanzend!	negatief.

No. 11. 40 c.c. rundvleeschsap na 36 uur doorgefiltreerd.

0.1 N.a:	steriel	negatief.
0.1 N.b:	steriel	negatief.
0.5 N.a:	3 witgrijze kolonien . . .	coccen.
0.5 N.b:	steriel	negatief.
1 N.a:	steriel	negatief.
1 N.b:	steriel	negatief.

No. 12. 35 c.c. rundvleeschsap na 24 uur doorgefiltreerd.

0.1 N.a:	vrij veel grijs slijmige kolonien, die helft oppervlakte bedekken . . .	lange staven en sporevormers
	rest	negatief.
0.1 N.b:	zelfde beeld als 0.1 N.a .	idem.
0.5 N.a:	enkele grijsslijmige kolonien ¾ bodem geen groei . .	als 0.1 N.a.
1 N.a:	steriel	negatief.
1 N.b:	steriel	negatief.

Op de 0.1 N. en 0.5 N. bodems zouden tuberkelbacillen kolonien nog zeer goed waarneembaar zijn geweest .

		macroscopisch	*microscopisch.*
No. 13. 45 c.c. rundvleeschsap na 2 × 24 uur doorgefiltreerd.			
0.1	N.a:	hier en daar groenglanzende kolonien?	negatief.
0.1	N.b:	??	negatief.
0.5	N.a:	??	negatief.
0.5	N.b:	??	n gatief.
1	N.a:	geen groei	negatief.
1	N.b:	??	negatief.
No. 14. 50 c.c. rundvleeschsap na 2 × 24 uur doorgefiltreerd.			
0.1	N.a:	8 witgrijze scherp gecontoureerde kolonien . .	groote staven.
		rest oppervlakte steriel .	negatief.
0.1	N.b:	geheel verontreinigd . .	staven en coccen.
0.5	N.a:	steriel	negatief.
0.5	N.b:	steriel	negatief.
1	N.a:	verontreinigd	coccen.
1	N.b:	verontreinigd	coccen en bacillen.
No. 15. 35 c.c. rundvleeschsap na 24 uur doorgefiltreerd.			
0.1	N.a:	geheel verontreinigd . .	lange staven en coccen.
0.1	N.b:	idem	idem.
0.5	N.a:	enkele geelwitte scherp gecontoureerde kolonien . .	coccen.
		rest bodem steriel . . .	negatief.
0.5	N.b:	negatief	negatief.
1	N.a:	negatief	negatief.
1	N.b:	negatief	negatief.
No. 16. 40 c.c. rundvleeschsap na 2 × 24 uur doorgefiltreerd.			
0.1	N.a:	geheel verontreinigd . . .	lange bacillen.
0.1	N.b:	idem	lange bacillen.
0.5	N.a:	negatief	negatief.

	macroscopisch	*microscopisch*
0.5 N.b:	negatief	negatief.
1 N.a, b:	negatief	negatief.

No. 17. 45 c.c. rundvleeschsap na 2 × 24 uur doorgefiltreerd.

0.1 N.a, b:	steriel	negatief.
0.5 N.a:	3 witte fijne kolonien scherp afgegrensd	coccen.
0.5 N.b:	steriel	negatief.
1 N.a, b:	verontreinigd	lange staven

Van het aantal aangelegde platen blijkt 65% geen groei te vertoonen en speciaal het aantal platen geënt met materiaal, waarbij de voorbehandeling met 0.5 N. is geschied, is zeer gunstig.

Overzicht.

0.1 N.	steriel	14;	gedeeltelijk verontreinigd	7;	geheel verontr.	13
0.5 N.	„	22;	„	„	8;	„	„ 2
1.- N.	„	29;	„	„	0;	„	„ 5

De resultaten zijn wat het gestelde doel betreft, n.l. het cultureel aantoonen van tuberkelbacillen, teleurstellend.

Het is niet gelukt met deze techniek de aanwezigheid van tuberkelbacillen in vleeschsap vast te stellen.

In hoeverre dit overeenstemt met de werkelijkheid, kan hier niet beoordeeld worden, alleen wordt opgemerkt, dat een eventueele groei van tuberkelbacillen en uitgroeiing tot kolonien zeer zeker niet aan de waarneming ontsnapt zouden zijn.

Betreffende de bodems, geënt met materiaal, dat voorbehandeld is met 1 N. zwavelzuur, moet, gezien de invloed van het zwavelzuur in deze concentratie op de tuberkelbacil, het negatieve resultaat niet als beslissend aangemerkt worden.

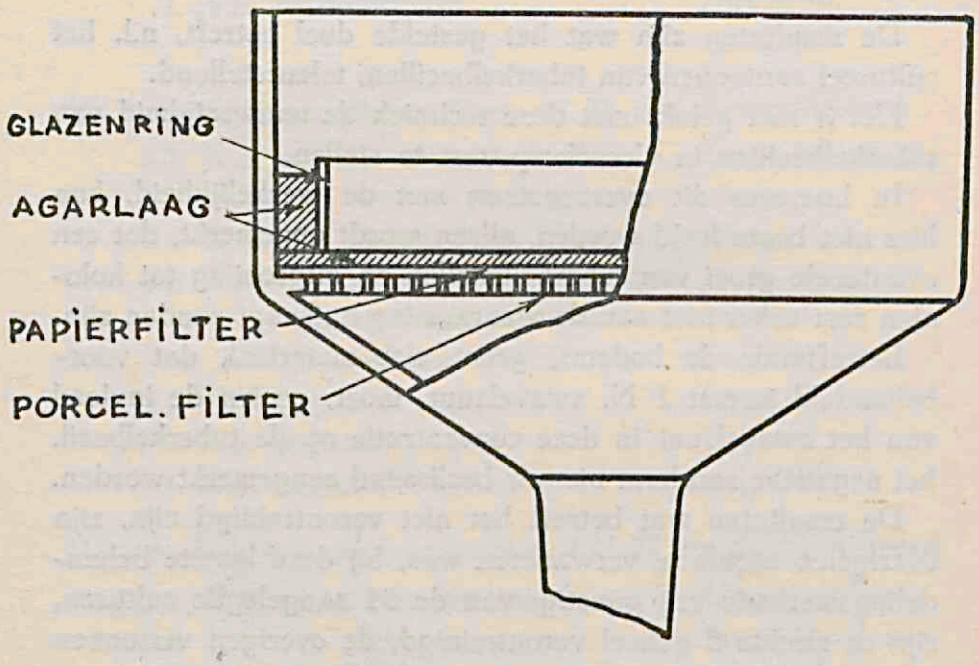
De resultaten wat betreft het niet verontreinigd zijn, zijn overigens, zooals te verwachten was, bij deze laatste behandelingsmethode vrij gunstig; van de 34 aangelegde culturen, zijn er slechts 5 geheel verontreinigd, de overigen vertoonen geen enkele groei.

In tegenstelling hiermede is het resultaat, verkregen na de behandeling met 0.1 N. zwavelzuur. Hier toch zijn 20 van de 35 bodems geheel of gedeeltelijk verontreinigd; op de overige bodems is evenmin een aanwezigheid van tuberkelbacillen geconstateerd. Indien aanwezig, zouden deze toch in de allereerste plaats op een van deze bodems aangetoond moeten zijn.

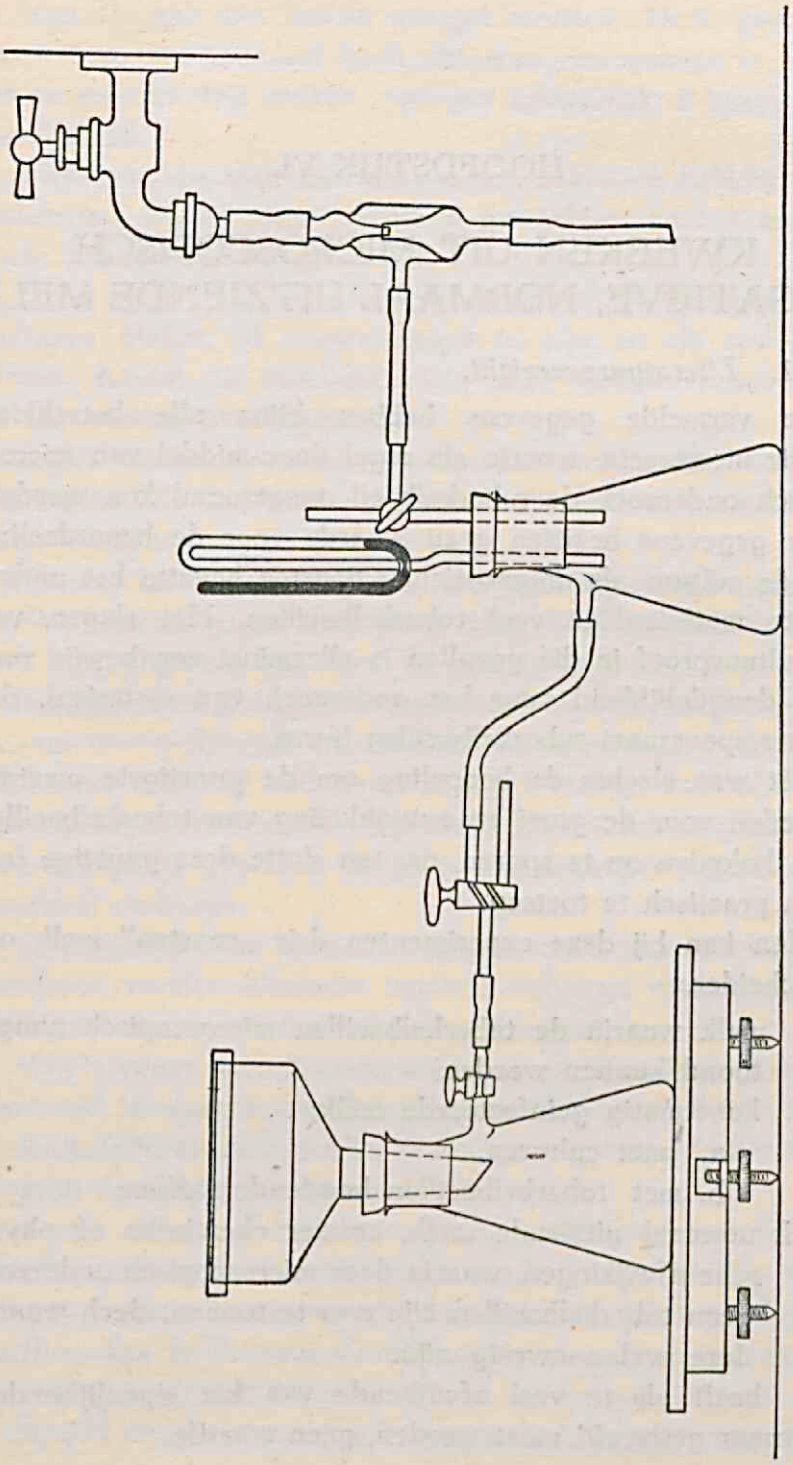
Evenmin zijn positieve resultaten verkregen na een voorbehandeling met 0.5 N. zwavelzuur.

Het aantal geheel verontreinigde platen bedraagt slechts twee en van de overige 30 platen, zijn er slechts 8 gedeeltelijk verontreinigd. Kolonien van tuberkelbacillen zouden zeer goed waar te nemen geweest zijn.

De conclusie blijft dus, dat, ondanks de toegepaste techniek en ondanks het betrekkelijk groote aantal niet verontreinigde bodems, de aanwezigheid van tuberkelbacillen in vleesch van dieren met ernstige vormen van tuberculose niet kon worden geconstateerd.



Trechter met agarfilter.



Filtreerapparaat.

HOOFDSTUK VI.

KWEEKEN UIT MICROSCOPISCH NEGATIEVE, NORMAAL UITZIENDE MELK

§ 1. Literatuuroverzicht.

De vermelde gegevens hebben bijna alle betrekking op die uiersecreta, waarin als regel door middel van microscopisch onderzoek de tuberkelbacil aangetoond kon worden. Deze gegevens bezitten geen waarde voor de beoordeeling van de cultuur als diagnosticum; daartoe bevatte het onderzochte materiaal te veel tuberkelbacillen. Het slagen van de cultuurproef in die gevallen is allerminst een bewijs voor hare deugdelijkheid voor het onderzoek van materiaal, dat slechts spaarzaam tuberkelbacillen bevat.

Het was slechts de bedoeling om de gunstigste omstandigheden voor de groei en ontwikkeling van tuberkelbacillen resp. kolonien op te sporen, om ten slotte deze gunstige factoren practisch te toetsen.

Men kan bij deze experimenten drie „soorten" melk onderscheiden:

I. melk waarin de tuberkelbacillen microscopisch aangetoond kunnen worden;

II. kunstmatig geinfecteerde melk;
   a. met culturen,
   b. met tuberkelbacillen houdende stoffen;

III. normaal uitziende melk, zonder chemische of physische afwijkingen, waarin door microscopisch onderzoek geen tuberkelbacillen zijn aan te toonen, doch waarin deze wel aanwezig zijn.

I. heeft als te veel afwijkende van het eigenlijke doel waarnaar gestreefd moet worden, geen waarde.

Van II. kan het zelfde gezegd worden. Deze groep is, hoewel ze het voordeel bezit dat men een onbeperkt aantal proefmonsters kan maken, van het onderzoek eveneens uitgeschakeld.

Van hen, die zich met deze onderzoekingen hebben bezig gehouden, blijken slechts enkelen gewerkt te hebben met secreta behoorende bij groep III.

Hohn onderzocht handelsmelk, maar van de 90 aangelegde culturen bleken 65 verontreinigd te zijn en de rest bleef steriel, zoodat dit resultaat niets zegt. Contrôleproeven bij caviae werden niet ingesteld.

Engel onderzocht zuivere melk, die met bacillen culturen besmet is. Uit den aard der zaak bezitten deze proeven ook geen waarde.

Kemkes kreeg geen resultaat met cultuurproeven van melk die bij microscopisch onderzoek geen bacillen bevatte, hoewel 2 proefcavia's aan t.b.c. te gronde gingen.

Seelemann en *Klingmüller* onderzochten vijf monsters, doch in vier waren rijkelijk tuberkelbacillen voorhanden, terwijl bij No. 5 het cultureel onderzoek negatief verliep, hoewel de cavia duidelijk tuberculose vertoonde. Hier werd te geconcentreerd H_2SO_4 gebruikt, hetgeen het negatieve resultaat bij voorbaat verklaart.

Bertrand heeft de normaal uitziende melk van 10 „magere" runderen zonder klinische mastitis cultureel onderzocht en tweemaal een positief resultaat verkregen.

Van bovengenoemde onderzoekers heeft dus eigenlijk alleen *Bertrand* 10 monsters melk in den eigenlijken zin onderzocht.

Seelemann en *Klingmüller* onderzochten één monster melk, waarbij de uitkomst evenwel foutief was.

In een recente publicatie vermelden *Wolthers* en *Dehmel* het resultaat van een onderzoek van 90 afzonderlijk opgevangen melkmonsters, waarbij het vijfmaal gelukte tuberkelbacillen aan te toonen. Contrôleproeven met caviae werden jammer genoeg niet verricht.

Bij 234 monsters mengmelk waren de resultaten vergeleken

met de caviaproef allerminst gunstig. In 4 gevallen stemden cavia- en cultuurproef overeen, maar in 14 gevallen was de caviaproef positief, terwijl cultureel geen tuberkelbacillen aangetoond konden worden.

Wolthers en *Dehmel* blijven aan de dierproef, zooals begrijpelijk is, de voorkeur geven.

De groote moeilijkheid bij het onderzoek van melk als bedoeld onder III is, dat het juiste materiaal niet of in zeer onvoldoende mate voorhanden is.

Men zou eventueel bacillenhoudend secretum met zuivere melk kunnen verdunnen, doch het is reeds boven gebleken, dat men dan minder juiste uitkomsten kan verkrijgen. (blz. 69.)

De eenige oplossing is, dat men melkmonsters die „verdacht" zijn op grond van klinische gegevens en waaraan microscopisch geen afwijkingen zijn te bespeuren, systematisch gaat onderzoeken.

Men stuit op het groote bezwaar, dat men vooraf niets weet omtrent het al of niet tuberkelbacillenhoudend zijn der melkmonsters. Er is een kans, dat men na het onderzoeken van een aantal monsters, alleen negatieve resultaten verkrijgt, waardoor de waarde van het werk voor de cultureele diagnostiek eveneens negatief wordt.

Verkrijgt men evenwel één of meer positieve uitkomsten, dan is de waarde hiervan, gezien de hoedanigheid van het uitgangsmateriaal, zeer belangrijk. Het bezwaar, dat het een „probeeren" is, blijft evenwel bestaan.

Bertrand nam melk van 10 „magere" runderen en vindt bij dit onderzoek 2 positieve gevallen.

Het is jammer, dat Bertrand geen caviaproef als contrôle heeft ingesteld.

§ 2. Eigen onderzoek.

Bij het door mij ingestelde onderzoek werd melk genomen van dieren, die aan een ernstige vorm van tuberculose leden (open longtuberculose, miliair t.b.c., peritoneaal t.b.c.).

De vondst van *Joest*, die onder 16 runderen, waar de tuber-

culose zich niet tot één orgaan beperkte, bij acht dieren, na zeer nauwkeurig histologisch onderzoek uiertuberculose vaststelde, wettigde deze proefneming zeer zeker.

Monsterneming:

Ten einde zooveel mogelijk storende factoren uit te schakelen, werd de melk onder aseptische voorzorgen opgevangen. De hier voor genomen maatregelen waren evenwel van dien aard, dat zij, bij een eventueele latere toepassing in de praktijk, door iedereen gemakkelijk nagedaan zouden kunnen worden.

Men dient toch ook bij het gewone microscopisch onderzoek eenige voorzorgen in acht te nemen, om vergissingen met andere zuurvaste bacillen uit te sluiten.

De voorbereidende maatregelen waren als volgt:

1e. Uier en omgeving worden met een vochtige doek goed gereinigd;

2e. uier en speciaal tepel extra schoon gemaakt met brandspiritus. Het slotgat wordt eveneens goed gereinigd; dit is mogelijk door melk naar beneden in den tepel te drukken, waardoor het slotgat a.h.w. naar buiten gedrukt wordt.

3e. eerste stralen wegmelken.

4e. opvangen in steriele kolf.

Onnoodig te vermelden, dat de handen vooraf goed gereinigd worden.

Na het schoonmaken met spiritus wordt gewacht totdat de tepel droog geworden is, zoodat bij het melken geen spiritus met huidbestanddeelen in de kolf kan komen.

Bij deze manier van monsterneming is een besmetting met tuberkel- of andere zuurvaste bacillen via de faeces wel uitgesloten te achten.

Verkrijgt men nu na enting positieve culturen of bij dierproeven caviae lijdende aan t.b.c., dan staat vast dat de tuberkelbacillen uit de melk in den uier afkomstig zijn.

Van de aldus opgevangen monsters melk werd een kort

laboratorium-onderzoek verricht, terwijl van elk sediment een Ziehl-Neelsen preparaat werd gemaakt, dat zorgvuldig op tuberkelbacillen onderzocht werd.

Het sediment van 50—90 c.c. melk — afhankelijk van de verkregen hoeveelheid melk — werd intramusculair en subcutaan ingespoten bij een cavia.

Voor de cultuurproeven werd als regel het sediment van 100—300 c.c. melk gebruikt — verkregen na centrifugeeren gedurende 15 minuten met 3000 toeren per minuut.

Van 20 dieren werd de melk onderzocht. De meeste monsters werden genomen van runderen, aanwezig in de „Kliniek voor inwendige ziekten" der Veterinaire Faculteit.

Voor het verkrijgen van meer zekerheid omtrent de hier toe te passen normaliteit, werden deze sedimenten direct uitgestreken zonder eenige voorbehandeling en na een voorbehandeling met 0.1 en 0.5 N. en 1 N. zwavelzuur. De behandelingsduur was 20 minuten.

De gebruikte bodem was de glycerinevrije Petragnani. De bodems werden gemiddeld 80 à 90 dagen bebroed, voordat een definitieve beslissing genomen werd.

Monster 1. Dier met open longtuberculose. Na 16 uur bewaren verwerkt.

caviaproef:	negatief.
cultuurproef:	negatief.
preparaat:	negatief.

	macroscopisch	*microscopisch.*
direct a, b, c:	negatief . . .	negatief.
physiol. NaCl. a, b, c:	negatief . . .	negatief.
0.1 N.a, b:	negatief . . .	negatief.
0.1 N.c:	3 gele kolonien	coccen.
0.5 N.a, b:	negatief . . .	negatief.
1.- N.	negatief . . .	negatief.

In condensvocht microscopisch geen bacillen.

Om na te gaan of een eventueel langer bewaren, na het

nemen van het monster, van invloed was op het resultaat, werd een gedeelte van de melk na 40 uur bewaren bij kamertemperatuur gesedimenteerd en op den eibodem uitgestreken.

Deze langere tusschentijd kan men verwachten, indien het monster over verren afstand vervoerd moet worden.

Op de betreffende eibodems ontstond groei van een zevental coccenkolonien, welke slechts over een klein gedeelte van den bodem verspreid waren, en dus een eventueele groei van kolonien van tuberkelbacillen niet belemmerden.

Het was opvallend, dat deze coccenkolonien geen neiging vertoonden tot verspreiding over de ei-oppervlakte.

	macroscopisch	*microscopisch.*
Monster 2. Koe met open longtuberculose.		
	caviaproef:	negatief.
	cultuur:	negatief.
	preparaat:	negatief.
direct a:	verontreinigd . . .	lange staven.
direct b:	negatief	negatief.
physiol NaCl sol:	6 kolonien	coccen.
0.1 N.a, b:	negatief	negatief.
0.5 N.a, b:	negatief	negatief.
1.- N.a, b:	negatief	negatief.
In condensvocht geen tuberkelbacillen.		
Monster 3. Koe met open longtuberculose.		
	caviaproef:	negatief.
	cultuur:	negatief.
	preparaat:	negatief.
direct a, b:	negatief	negatief.
physiol. NaCl sol.:	verontreinigd . . .	lange staven en coccen.
0.1 N.a:	5 kleine witte kol. .	coccen.
	overige gedeelte bodem negatief . . .	negatief.
0.5 N.a, b:	negatief	negatief.
1.- N.a, b:	negatief	negatief.

Condensvocht: geen tuberkelbacillen.

De witte coccenkolonien op 0.1 Na. blijven klein, en zelfs aan het eind van de proef (90 dagen) was de rest der ei-oppervlakte microscopisch steriel.

	macroscopisch	*microscopisch.*
Monster 4.	Koe met open longtuberculose.	
	preparaat:	negatief.
	cavia:	negatief.
	cultuur:	negatief.
direct a:	verontreinigd	
b:	gele weerschijn bodem .	negatief.
c:	3 bruine kolonien, niet hinderlijk voor onderzoek	coccen.
	rest negatief	negatief.
0.1 N.a:	negatief	negatief.
0.1 N.b:	1 kolonie als direct c . .	coccen.
0.1 N.c:	negatief	negatief.
0.5 N.a, b.	negatief	negatief.
1.- N.a, b, c:	negatief	negatief.
Condensvocht: geen tuberkelbacillen.		
Monster 5.	Koe met open longtuberculose.	
	preparaat:	negatief.
	cavia:	negatief.
	cultuur:	negatief.
direct a:	geheel verontreinigd . .	coccen.
„ b:	negatief	negatief.
„ c:	4 kleine kolonien . . .	coccen.
0.1 N.a, b:	negatief	negatief.
0.1 N.c:	1 kolonie, rest opper-	bacillen.
	vlakte geen groei . . .	negatief.
0.5 N.a, b, c:	negatief	negatief.
1.- N.a, b, c:	negatief	negatief.
Condensvocht: geen tuberkelbacillen.		

	macroscopisch	*microscopisch.*

Monster 6. Koe met open longtuberculose.

	preparaat:	negatief.
	cavia:	negatief.
	cultuur:	negatief.
direct a:	negatief	negatief.
„ b:	geheel verontreinigd . .	lange staven.
„ c:	4 kolonien, rest negatief .	coccen, rest neg.
0.1 N.a, b:	negatief	negatief.
0.1 N.c:	condensvocht opgedroogd	negatief.
0.5 N.a, b, c:	negatief	negatief.
1.- N.a, b, c:	negatief	negatief.

Condensvocht: geen tuberkelbacillen.

Monster 7. Koe met open longtuberculose.

peritoneaal t.b.c.
miliair t.b.c.? t. 39.5.

	preparaat:	negatief.
	cavia:	negatief.
	cultuur:	negatief.
direct a:	2 kolon., rest geen groei	coccen, rest neg.
„ b:	gele weerschijn bij condensvocht	negatief.
„ c:	negatief	negatief.
0.1 N.a, b, c:	negatief	negatief.
0.5 N.a, b, c:	negatief	negatief.
1.- N.a, b, c:	negatief	negatief.

Condensvocht: geen tuberkelbacillen.

Monster 8. Koe met open longtuberculose.

	preparaat:	negatief.
	cavia:	negatief.
	cultuur:	negatief.
direct a, b:	negatief	negatief.
„ c:	verontreinigd	bacillen.
0.1 N.a, b, c:	negatief	negatief.

	macroscopisch	*microscopisch.*
0.5 N.a, b, c:	negatief	negatief.
1.- N.a, b, c:	negatief	negatief.
Condensvocht:	. . . . .	negatief.

Monster 9. Koe met longtuberculose en streptococcenmast.

	preparaat:	negatief.
	cavia:	negatief.
	cultuur:	negatief.
direct a, b, c:	granuleus uiterlijk bodem:	streptococcen.
0.1 N.a, b:	granuleus uiterlijk bodem:	streptococcen.
0.1 N.c:	negatief	negatief.
0.5 N.a, b, c:	negatief	negatief.
1.- N.a, b, c:	negatief	negatief.

De vorm van de streptococcen blijft, zooals deze oorspronkelijk was, n.m.l. de staketovorm. Op de bodems, geënt met materiaal dat met zuur voorbehandeld was, was de groei van de streptococcen minder en weinig talrijk. Eventueele kolonien van tuberkelbacillen zouden zeer goed waarneembaar zijn geweest ondanks de groei der streptococcen.

Monster 10. Koe met open longtuberculose.

	preparaat:	negatief.
	cavia:	negatief.
	cultuur:	negatief.
direct a:	een groote witte kolonie	coccen.
	rest bodem negatief . .	negatief.
„ b:	fijne groene granula . .	negatief.
„ c:	negatief	negatief.
0.1 N.a, b, c:	negatief	negatief.
0.5 N.a, b, c:	negatief	negatief.
1.- N.a, b, c:	negatief	negatief.
Condensvocht:	. . . . .	negatief.

	macroscopisch	*microscopisch.*
Monster 11. Koe met open longtuberculose en mesenteriaalklier t.b.c.		
	preparaat:	negatief.
	cavia:	negatief.
	cultuur:	negatief.
direct a:	groene kolonien over geheelen bodem	lange staven.
„ b, c:	negatief	negatief.
0.1 N.a, b:	geheel verontreinigd . .	lange staven.
0.1 N.c:	negatief	negatief.
0.5 N.a, b, c:	negatief	negatief.
1.- N.a, b, c:	negatief	negatief.
Condensvocht:	. . . . .	negatief.
Monster 12. Koe met bronchopneumonie en tuberculeuze peritonitis.		
	preparaat:	negatief.
	cavia:	negatief.
	cultuur:	negatief.
direct a, b, c:	verontreinigd	coccen.
0.1 N.a:	ong. 25 grijze kolonien .	coccen.
0.1 N.b:	„ 6 „ „ .	coccen.
0.1 N.c:	10 „ „ .	coccen.
0.5 N.a:	5 „ „ .	coccen.
0.5 N.b:	1 „ „ .	coccen.
0.5 N.c:	8 „ „ .	coccen.
1.- N.a:	1 „ „ .	coccen.
1.- N.b:	2 „ „ .	coccen.
1.- N.c:	3 „ „ .	coccen.

Bijna alle bodems waren reeds na 12 dagen min of meer met coccenkolonien bedekt. Het ligt voor de hand, dat deze verontreiniging te wijten is aan een aanwezig zijn van een bepaalde coccus in de melk en het sediment, daar het aantal kolonien afneemt met het toenemen der zuurconcentratie. Een waarnemen van tuberkelbacillenkolonien was niet mogelijk geweest bij de buizen 0.1 Na en c.; bij 0.1 Nb, 0.5 N. en 1 N. nog wel.

macroscopisch *microscopisch.*

Monster 13. Koe vermoedelijk met tuberculeuze pneumonie?

	preparaat:	negatief.
	cavia:	negatief.
	cultuur:	negatief.
direct a:	verontreinigd	lange staven.
„ b, c:	verontreinigd	coccen.
0.1 N.a, b, c:	negatief	negatief.
0.5 N.a, b, c:	negatief	negatief.
1.- N.a, b, c:	negatief	negatief.
Condensvocht:	. . . . .	negatief.

Monster 14. Koe met longtuberculose.

	preparaat:	negatief.
	cavia:	negatief.
	cultuur:	negatief.
direct a:	verontreinigd	staven.
„ b, c:	verontreinigd	coccen.
0.1 N.a:	negatief	negatief.
0.1 N.b:	ong. 20 witte kolonien .	lange staven.
0.1 N.c:	„ 20 „ „ .	lange staven.
0.5 N.a, b, c:	negatief	negatief.
1.- N.a, b, c:	negatief	negatief.
Condensvocht:	. . . . .	negatief.

Monster 15. Dier verdacht van tuberculose.

	preparaat:	negatief.
	cavia:	negatief.
	cultuur:	negatief.
0.1 N.a, b:	negatief	negatief.
0.1 N.c:	verontreinigd	coccen.
0.5 N.a, b:	verontreinigd	coccen en lange bacillen.
0.5 N.c:	negatief	negatief.
1.- N.a, b, c:	negatief	negatief.

Dit monster werd toegezonden en ongeveer 40 uur na 't

opvangen onderzocht. De enkele optredende verontreigingen zullen wel te wijten zijn aan 't minder „zindelijk" opvangen.

Deze 15 monsters, die een eenigszins droge opsomming zijn van negatieve resultaten, hebben toch hun waarde voor het beoordeelen van optredende verontreinigingen na een voorbehandeling met zwavelzuur bij zindelijk gewonnen melk.

Als criterium voor het al of niet betrouwbaar zijn der cultuur en/of der dierproef voor het onderzoek op tuberculose missen zij natuurlijk alle waarde. Deze uitkomsten waren bij de gevolgde methode van onderzoek natuurlijk te verwachten.

Gelukkig zijn niet alle twintig monsters negatief gebleken. Onder deze monsters zijn er vijf, waarbij een positief resultaat verkregen werd.

Monster 16. Koe met open longtuberculose.

preparaat: negatief.
cavia: positief.
cultuur: positief.

Cultuur	14 dagen	20 dagen	27 dagen	35 dagen	70 dagen
			Macroscopisch.		
Direct a, b, c	v [1])	v	v	v	v
0.1 N. a	—	+	v	v	v
0.1 N. b	—	—	v	v	v
0.1 N. c	—	—	v	v	v
0.5 N. a	—	—	—	—	—
0.5 N. b	—	—	+(15)	+	+
0.5 N. c	—	—	+(10)	+	+
1 N. a. b. c.	—	—	—	—	—
			Microscopisch.		
Direct a, b, c	v	v	v	v	v
0.1 N. a	+	+	v	v	v
0.1 N. b			v	v	v
0.1 N. c			v	v	v
0.5 N. a			+	+	+
0.5 N. b	+	+	+	+	+
0.5 N. c			+	+	+
1 N. a, b. c	—	—	—	—	—

[1]) v = verontreinigd.

Een verdere ontwikkeling van kolonien komt niet tot stand. Op 0.5 N.a ontwikkelen zich geen met het bloote oog waarneembare kolonien.

De bodems geënt met sediment, dat met 1 N. zwavelzuur voorbehandeld werd, blijken bij microscopisch onderzoek na 90 dagen bebroeden steriel te zijn.

Een cavia ingespoten met een öse cultuur van „0.5 N.a" kreeg algemeene tuberculose.

Monster 17. Koe met open longtuberculose.

preparaat: negatief.
cavia: positief.
cultuur: positief.

Cultuur	Macroscopisch			Microscopisch	
	18 dagen	35 dagen	42 dagen	18 dagen	35 dagen
Direct a, b	v				
0.1 N. a	—	+ (10)		+	+
0.1 N. b	—	—	+ (10)		+
0.1 N. c	—	+ (15)			+
0.5 N. a	—	+ (20)		+	+
0.5 N. b	—	+ (8)			+
0.5 N. c	—	+ (20)			+
1 N. a	—	+ (20)		+	+
1 N. b.	—	+ (15)			+
1 N. c	—	+ (15)			+

Na 18 dagen vindt men in het condensvocht slechts hier en daar geisoleerde zuurvaste staafjes, veel minder duidelijk dan in het preparaat, gemaakt met materiaal afkomstig van de oppervlakte van den eibodem.

Bij de contrôle na 35 dagen waren de kolonien met het bloote oog juist zichtbaar. Speciaal in de omgeving van het condenswater zijn ze het eerst waar te nemen; soms ook alleen daar.

Monster 18. Toegezonden monster.

preparaat: negatief.
cavia: *negatief.*
cultuur: *positief.*

Cultuur	17 dagen	21 dagen	28 dagen	32 dagen
Direct a, b	v			
0.1 N. a, b, c	v			
0.5 N. a	—	±	±	+(50)
0.5 N. b	—	±	±	+(35)
0.5 N. c.	—	±	±	+(20)
1 N. a	—	±	±	+(40)
1 N. b	—	±	±	+(30)
1 N. c	—	±	+	+(30)

De microscopische diagnose werd gesteld na 21 dagen bebroeden; tuberkelbacillen waren in alle preparaten in groote hoeveelheid aanwezig.

Het condensvocht was na 21 dagen, blijkens microscopisch onderzoek, negatief, en daarin konden pas na 32 dagen bebroeden, vele tuberkelbacillen aangetoond worden.

De cavia ingespoten met het melksediment (50 c.c.) vertoonde na 8 weken bij de sectie geen spoor van tuberculose.

De cavia ingespoten met een emulsie van een öse cultuur van „0.5 N.a" stierf aan algemeene tuberculose.

macroscopisch *microscopisch.*

Monster 19. Koe met miliair tuberculose. t° : 41°. Ernstig ziek.

preparaat: negatief.
cavia: positief.
cultuur: positief.

na 19 dagen: negatief . . . . . negatief.
na 74 dagen: (niet eerder in de gelegenheid te bezichtigen).

direct a:	negatief	negatief.
„ b:	kleine groene kolonien .	coccen.
„ c:	*kleine kolonien*	*massa t.b. bac.*
0.1 N.a:	*kleine kolonien*	id.
0.1 N.b:	*fijn beslag*	id.
0.1 N.c:	*fijn beslag*	id.
0.5 N.a:	groote grijze kolonien .	lange staven.
0.5 N.b:	*fijn beslag*	*massa t.b. bac.*
0.5 N.c:	±	id.
1.- N.a, b, c:	negatief	negatief.

De cavia met sediment ingespoten, vertoonde na 8 weken duidelijk tuberculeuse veranderingen. Tuberkelbacillen werden microscopisch niet aangetoond, weshalve een nieuwe cavia met een suspensie van de milt werd ingespoten, welke duidelijke tuberculose kreeg.

Monster 20. Zeer mager dier met open long t.b.c.

preparaat:	negatief.
cavia:	positief.
cultuur:	negatief.

Dit materiaal is afkomstig van een rund met open long tuberculose, geslacht aan het abattoir te Amsterdam. De melk werd opgevangen in een steriel fleschje. Fleschjes werden daar in voorraad gehouden.

De bodems, geënt met onvoorbehandeld materiaal en met materiaal hetwelk met 0.1 en 0.5 N. H_2SO_4 voorbehandeld was, waren na tien dagen bebroeden volkomen verontreinigd.

Bij microscopisch onderzoek konden geen tuberkelbacillen tusschen deze verontreinigers aangetoond worden.

Het sediment, hetwelk met 1 N. zwavelzuur behandeld was, gaf tot na 90 dagen geen groei op den bodem volgens *Petragnani.*

De cavia, met sediment van deze melk ingespoten, vertoonde na 8 weken een geabscedeerde liesplooiklier en twee erwt-

groote abscesjes in de milt, waarin microscopisch tuberkelbacillen aangetoond konden worden.

Het is jammer, dat dit geval, wat de cultuurproef betreft, mislukt is, temeer daar wij blijkens het sectiebeeld van de afgemaakte cavia, met een weinig virulente stam te doen hebben en juist bij deze stammen is een waarneming over het al of niet slagen der cultuurproef van groot gewicht. Het zijn juist deze stammen, die het mogelijk maken de waarde van de proef vast te stellen. De verontreiniging van de betreffende bodems is wellicht te verklaren door het minder steriel opvangen van de melk, zooals dat aan het slachthuis te Amsterdam moest geschieden. In de praktijk zou men in dit geval over moeten gaan tot een herhaling der proef, hetgeen hier uiteraard niet meer mogelijk was.

Men kan de vraag stellen of dit geval niet pleit tegen de cultuurproef, daar immers de overige buizen (de 1 N buizen) steriel bleven.

Dit is geenszins het geval. Met de reeds vroeger vermelde resultaten is deze negatieve uitkomst in overeenstemming. Het duidelijkst blijkt dit uit de resultaten van de monsters no. 16 en 19. Hier zijn alle „1 N. buizen" negatief, terwijl de buizen geënt met het sediment behandeld met 0.5 N. H_2SO_4 alle een duidelijk positief resultaat geven.

Indien in dit geval na een voorbehandeling met 1 N zwavelzuur een positieve cultuur ware verkregen, zou dit in strijd zijn met de reeds vroeger door mij vastgelegde uitkomsten. Hierbij dient gedacht aan de door *Korthof* e.a. geuite bewering, dat bij mindere virulentie de weerstand van de bacil tegen zuren afneemt.

Het is een nieuw bewijs voor de stelling, dat men de concentratie van het zuur sterk moet limiteeren en niet hooger mag gaan dan 0.5 N.

Beschouwen wij de verkregen resultaten van de 20 melkmonsters, ten aanzien van de opgetreden verontreinigingen.

De uitkomsten verkregen met sedimenten, welke niet voorbehandeld werden, zijn allerminst gunstig.

Van de 56 aldus aangelegde cultures waren er 25, d.i. 44%, geheel en al overgroeid met banale kiemen.

Waarneming van tuberkelbacillenkolonien zou hier niet mogelijk zijn geweest. Ook microscopisch waren nimmer tuberkelbacillen aan te toonen, hoewel dit blijkens de groei op de andere bodems, met hetzelfde sediment geënt, toch het geval had moeten of kunnen zijn.

Bij een eenigszins sterke groei van banale bacteriën blijft zeer waarschijnlijk een vermeerdering van tuberkelbacillen achterwege.

Bezien wij de melkmonsters afzonderlijk, dan blijkt, dat bij 8 van de 20 monsters *alle* bodems met niet voorbehandeld materiaal geënt, verontreinigd, en in 6 gevallen van de in triplo aangelegde culturen, twee buizen steeds verontreinigd waren.

Slechts in één geval waren alle drie buizen steriel gebleven.

Bij de 5 melkmonsters, welke tuberkelbacillen bevatten, gelukte het slechts eenmaal en wel in één van de drie geënte buizen een reincultuur van tuberkelbacillen te verkrijgen, n.l. No. 19 „direct c".

Gezien de verkregen uitkomsten mogen wij wel zeggen, dat de werkwijze waarbij niet voorbehandeld sediment van onder bijzondere voorzorgen gewonnen melk, direct op den bodem van Petragnani gebracht wordt, wegens de slechte resultaten geen aanbeveling verdient.

Na een voorbehandeling met 0.1 N. zijn de resultaten gunstiger.

Bij de 62 geënte bodems bedraagt het aantal verontreinigingen 18, dat is 29%. Vergeleken met de niet voorbehandelde sedimenten is dit aantal 1/3 minder.

De waarde van de verkregen uitkomsten wordt duidelijker als wij de monsters afzonderlijk beschouwen.

In drie gevallen waren alle buizen verontreinigd, zoodat in deze gevallen het onderzoek waardeloos geweest zou zijn.

In zeven gevallen waren een of twee buizen steriel gebleven, en twee of een verontreinigd.

In de overige tien gevallen, d. i. 50%, zijn alle culturen rein of negatief gebleven; in de helft der onderzochte melkmonsters zou dus een eventueel resultaat af te lezen zijn geweest; in de overige gevallen zou dit niet mogelijk of twijfelachtig zijn.

Hoewel de resultaten dus beter zijn dan met het niet voorbehandelde sediment, zijn deze toch allerminst voldoende en zelfs onbevredigend te noemen.

Beter zijn de uitkomsten na een voorbehandeling met 0.5 N. of 1 N.

Hier is de storende factor der verontreiniging vrijwel geheel opgeheven; regelmatig zijn alle buizen of steriel of geven een reincultuur van tuberkelbacillen.

Slechts in 4 gevallen treden verontreinigingen op, n.l. bij no. 12 zoowel bij de „0.5 N". als de „1 N. buizen" en bij de nos. 15 en 20.

In deze laatste twee gevallen zijn de „1 N. buizen" niet verontreinigd.

Voor no. 12 zijn de verontreigingen slechts zeer gering en betreffen een klein gedeelte van de oppervlakte van den bodem. Hier was groei van tuberkelbacillen zeer zeker aan te toonen geweest.

In geval 15 was van de drie buizen slechts één geschikt voor waarneming; de twee overige waren geheel overgroeid.

Bij het laatst onderzochte monster (no. 20) zijn zooals reeds besproken is, zoodanige factoren van invloed geweest, dat dit buiten beschouwing gelaten kan worden.

In het algemeen kunnen wij dus zeggen, dat sediment van zindelijk opgevangen melk, voorbehandeld met 0.5 en 1 N. H_2SO_4, op den Petragnani bodem geënt, geen aanleiding geeft tot verontreinigingen; om alle mogelijke gevaar van mislukking te vermijden, ent men van elk monster 3 buizen.

Beschouwen wij nu de resultaten bij die gevallen waar een positieve cultuur en/of dierproef voorkomt.

Het onderstaande korte tabelletje geeft een goed overzicht.

Cavia proef	Monster No.	Onbehandeld	0.1 N.	0.5 N.	1 N.	Opmerkingen.
+	16	v v v	v v v	— 15 10	— — —	
+	17	v v	10 10 15	20 8 20	20 15 15	
—	18	v v	v v v	50 35 20	40 30 30	Aantal koloniën.
+	19	v veel	veel	veel	— — —	
+	20	v v	v v	v v	— —	
	16	v v v	v v v	— 27 27	— — —	
	17	v v	35 42 35	35 35 35	35 35 35	Aantal dagen waarna groei macroscopisch waarneembaar is.
	18	v v	v v v	32 32 32	32 32 32	
	19	v 74	<74 74 74	<74 74 74	— — —	
	20	v v	v v	v v	— — —	
	16	v v v	14 v v	20 20 20		
	17	v v	18 + 18	18 18 18	18 18 18	Aantal dagen waarna groei microscopisch waarneembaar is.
	18	v v	v v v	21 21 21	21 21 21	
	19	n v <74	> 20 20 20 <74	> 20 20 20 <74	— — —	
	20	v v	v v	v v	— — —	

In kolom 3 vinden wij slechts een positief resultaat, n.l. één buis van No. 19, de overige zijn alle verontreinigd.

Het is wel merkwaardig, dat eveneens een buis uit deze reeks geheel negatief gebleven is. Vermoedelijk zal hier een vergissing in het spel zijn, en is misschien op dezen bodem niet met sediment geënt.

Als we kolom 4, 5 en 6 vergelijken, zijn de betere resultaten in kolom 5 (0.5 N.) opvallend. (Wij laten hier geval 20 buiten beschouwing).

Na een behandeling met 0.1 N. verkrijgen wij slechts 2, dit is 50%, juiste uitkomsten. In één buis van No. 16 werden weliswaar zuurvaste staafjes aangetroffen, doch deze waren de volgende week geheel overgroeid door sporenvormende bacillen. Van de zuurvaste staafjes was toen niets meer terug te vinden.

Het zelfde aantal goede uitkomsten, n.l. 2 of 50%, boeken wij na de 1 N. behandeling; hier zijn het de monsters 17 en 18.

Er blijkt hier nogmaals zeer duidelijk, dat zoowel de voorbehandeling met 0.1 N. als die met 1 N. H_2SO_4 te verwerpen is, de eerste wegens te zwakke, de laatste wegens te sterke werking.

De concentratie, die hier tusschen ligt, geeft frappant goede resultaten, n.l. 100% positieve juiste uitkomsten, en ware het aantal gevallen niet zoo gering, de uitspraak, dat de cultuurproef evengoed, ja zelfs beter is dan de caviaproef, zou zeer zeker gewettigd zijn.

Elk sediment waarin blijkens de caviaproef tuberkelbacillen voorkomen, geeft op elke geënte bodem een positieve cultuur, zonder één miswijzing. Daarnaast staat nog het reeds vermelde geval waarbij een positieve cultuur werd verkregen, ondanks een negatief verloopende dierproef.

De uitspraak van vele onderzoekers, dat de cultuur niet op een lijn gesteld kan worden met de dierproef, berust m.i. op een foutieve techniek.

Indien de techniek van deze onderzoekers gevolgd was, zou de cultuurproef een aantal miswijzingen gegeven hebben van 50% en meer; in dit geval zou onze conclusie over de cultuurproef eveneens ongunstig geweest zijn.

Wat de waarnemingsduur betreft, deze is voor het microscopisch onderzoek gemiddeld drie weken.

De macroscopisch waarneembare groei treedt op na 27 à 42 dagen. Om volkomen zekerheid te hebben zal men steeds een microscopisch onderzoek moeten instellen, waarbij men in 't bijzonder de oppervlakte dicht bij het condensvocht behoort te onderzoeken.

Ook in verband met reeds vroeger vermelde gegevens moet men dit onderzoek zoo noodig uitstrekken tot na 42 dagen bebroeden, daar het voor kan komen, dat slechts een microscopisch waarneembare groei ontstaat.

CONCLUSIES

Het aantoonen van tuberkelbacillen, in onder bijzondere voorzorgen gewonnen melk en uiersecreta, is cultureel zeer goed mogelijk en bij een juist uitgevoerde techniek is de betrouwbaarheid van deze proef op een lijn te stellen met de caviaproef.

De voordeelen, welke de cultuurproef in het algemeen heeft boven de dierproef, zijn hierbij nog buiten beschouwing gelaten.

Een 19-tal melkmonsters, afkomstig van dieren met ernstige tuberculose, evenwel zonder klinische mastitis tuberculosa, werden zoowel met de caviaproef, als met de cultuurproef onderzocht.

De dierproef was driemaal positief, terwijl cultureel viermaal tuberkelbacillen aangetoond konden worden. In een geval verliep derhalve de caviaproef negatief, terwijl de cultuur een zeer rijke groei van caviapathogene tuberkelbacillen te zien gaf.

Van één monster melk mislukte de cultuurproef, wellicht door onjuiste techniek, terwijl de dierproef van deze melk positief bleek. Een herhaling der proef was jammer genoeg niet mogelijk.

Het is niet gelukt in een zeventiental stukken vleesch cultureel tuberkelbacillen aan te toonen, hoewel een bijzondere „Anreicherungsmethode" toegepast werd.

Voor het kweeken van tuberkelbacillen uit bovengenoemde voedingsmiddelen, kan men gebruik maken van het principe der voorafgaande zuurbehandeling tot het dooden van de begeleidende micro-organismen, zooals dit is aangegeven door *Löwenstein-Sumiyoshi.*

De beste resultaten worden verkregen na een behandeling met 0.5 N. zwavelzuur gedurende 20 minuten. Een hoogere concentratie geeft speciaal bij die stoffen, welke arm zijn aan tuberkelbacillen, foutieve uitkomsten. Bij in de literatuur toelaatbaar geachte hoogere concentraties is hiermede geen rekening gehouden; zij zijn derhalve te verwerpen.

De bodems volgens *Dorset* en *Lubenau* zijn voor dit onderzoek, wegens de optredende verontreinigingen, niet geschikt. Beter is de voedingsbodem volgens *Petragnani,* mits men voor het kweeken van het bovine type, geen glycerine toevoegt.

Haematine of gal, toegevoegd aan dit medium, hebben geen stimuleerende invloed op den groei van het bovine type van de tuberkelbacil.

Het toegevoegde malachietgroen in den bodem volgens Petragnani oefent geen nadeelige invloed uit op de groei van de tuberkelbacil.

Evenmin verdient het aanbeveling door toevoeging van geringe hoeveelheden zuur of alcali de reactie van den bodem te wijzigen; het gunstigst is deze als zij dicht bij het neutrale punt ligt. (pH. 6.8 - 7.2).

In een aantal gevallen is het mogelijk in de culturen reeds binnen veertien dagen de aanwezigheid van tuberkelbacillen bij microscopisch onderzoek te constateeren; in andere gevallen treedt pas na zes weken met het bloote oog waarneembare groei op.

De uitspraak dat in het onderzochte secretum geen tuberkelbacillen aanwezig zijn, mag men alleen doen, wanneer bij microscopisch onderzoek van de, gedurende zes weken bebroede cultuur, geen tuberkelbacillen worden aangetroffen.

Tabel tot herleiding van gewichts- en volumeprocenten tot normaliteiten bij zwavelzuur.

Gewichts-procenten	Normaliteiten	Volume-procenten	Normaliteiten
0	0	0	0
1	0.21	1	0.38
2	0.41	2	0.75
3	0.62	3	1.1
4	0.84	4	1.5
5	1.05	5	1.9
6	1.27	6	2.3
7	1.50	7	2.6
8	1.72	8	3.0
9	1.95	9	3.4
10	2.18	10	3.8
11	2.41	11	4.2
12	2.65	12	4.6
13	2.89	13	4.9
14	3.13	14	5.2
15	3.38	15	5.6
16	3.63	16	6.0
17	3.88	17	6.3
18	4.14	18	6.7
19	4.40	19	7.1
20	4.66	20	7.5

HOOFDSTUK VIII.

LITERATUUR.

1. *Bertrand:* L'emploi des cultures dans le diagnostic de la tuberculose. Ann. de med. vet. août-sept '28.
2. *Blechmann:* Etude comparative de la valeur des milieux de Petroff et de Petragnani pour l'isolement et la culture du bacille de Koch à partir des crachats tuberculeux. Comptes rendus de la Soc. de biol. 1927, dl. 97.
3. *Brechmann:* Tuberkelbazillennachweis mit besonderer Berücksichtigung der Kulturmethode. Centr. f. Bakt. Orig. Bd. III.
4. *Calmette:* L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et les animaux.
5. *Castelli:* Metodi e terreni per la coltura del bacillo tubercolare. (Il procedimento di Hohn quello del Petragnani). Estratto dal Bolettino del" Instituto Sieroterapico Milanese Fasciolo XI Novembre 1928.
6. *Clarenburg:* Over de waarde van nieuwere methoden tot kweeken van tuberkelbacillen voor de veterinaire pathologie. Tijdschr. v. Diergeneesk. dl. 56 afl. 19 en 20.
7. *Corper and Nao Uyei:* The isolation of tubercle bacilli from contaminated tuberculous material.
8. *Van Deinse:* Het kweeken van tuberkelbacillen uit secundair geinfecteerd materiaal volgens de methode Hohn. Ned. Maandschrift voor Geneesk. Jrg. 15.
9. *Engel:* Zum kulturellen Nachweis von Tb Bazillen. Deutsche med. Wochenschrift Jrg. 53. Nr. 24.
10. *Esscher:* Wert des Centrifugierens in Milch für T.b.c. Z. f. Infectionskrankheiten der Haustiere, 1927, Nr. 32.
11. *Eykman:* De „kleine plaatcultuur" bij het wateronderzoek. Ned. Tijdschr. voor Hygiëne, Microbiologie en Serologie. 1927. Deel 2, No. 2.

12. *Frongia:* L'influenza del verde di malachite sullo sviluppo dei bacilli tubercolari. Giorn. di batteriol e imnunol. Jg. 2. H. 10 (ref.).

13. *Harada:* Antiformin oder Schwefelsäureverfahren bei der Tuberkelbazillenzüchtung. Centr. f. Bakt. Orig. Bd. 113, Heft ¾.

14. *Hauptmann u. Burtscher:* Uber die diagnostische Verwendbarkeit der Tuberkelbazillenzüchtung nach der Methode Hohn. Wiener kl. Wochenschr. 1928, nr. 3.

15. *Hermann:* Zur Frage der Kultur der T.b. bazillen. Centr. f. Bakt. 1927, Orig. Bd. 102.

16. *Helm:* Das Vorkommen von Geflügel t.b.c. beim Schweine. Zugleich ein Beitrag zur Züchtung der T.b. bazillen nach der Methode Hohn. Archiv f. Wissensch. u. praktische Tierheilkunde. '28, Bd. 57.

17. *Hohn:* Die Kultur der Tb. bazillus. Münch. med. Wochenschrift, 1926, nr. 15.

18. *Hohn:* Die Kultur des Tb. bazillus. Centr. f. Bakt. Orig. Bd. 98. Heft ⅞.

19. *Hohn:* Vier Jahre Kultur des Tuberkelbazillus zur Diagnose der Tuberkulose. Centr. f. Bakt. Orig. Bd. 113. Heft ⅚.

20. *Huck u. Kramer:* Die Kultur des Tuberkelbazillus. Zeitschr. f. Inf. Krankheiten der Haustiere. 1928. Bd. 33. Heft ⅓.

21. *Isabolinsky und Gitowitsch:* Uber die Gewinnung von Tuberkelbazillenreinkulturen. Centr. f. Bakt. Orig. Bd. 94.

22. *Ishimori:* Uber den Einflusz der Ph des Nahrbodens auf das Wachstum der säurefesten Bakterien. Zeitschr. f. Hygiene und Inf. Bd. 102, 1924.

23. *Kemkes:* Züchtung oder Tierversuch beim Nachweis der Tb. bazillen im Urin, Punktaten oder Eiter. Deutsche med. Woch. nr. 46, 1928.

24. *Klein:* Over de polymorphie van den tuberkelbacil. Tijdschr. voor Geneesk. 73 I. 13.

25. *Knorr und Friedrich:* Der Nachweis von Tuberkelbazillen bei chir. T.b.c. Münch. med. Woch. 1930.

26. *Korthoff:* Cultureel onderzoek op tuberkelbacillen. Tijdschr. voor Geneesk. Jrg. 1928.

27. *Korthoff:* Het kweeken van tuberkelbacillen uit verdacht materiaal. Tijdschr. voor Geneesk. Jrg. 1930.

28. *Lichtenstein:* Zur Frage der Reinzüchtung der Tuberkelbazillen. Centr. f. Bakt. Orig. Bd. 108.

29. *Löwenstein:* Beitrag zur Leistungsfähigkeit der direkten Züchtung der Tuberkelbazillen aus infektiösem Material. Wien. kl. Woch. 1924, nr. 10.

30. *Löwenstein:* Beitrag zur Untersuchung von offener und geschlossener Tuberkulose. Wien. kl. Woch. 1927, nr. 5.

31. *Löwenstein:* Die Methodik der Reinkultur von Tuberkelbazillen aus dem Blute. Deut. Med. Woch. 1930 (ref.).

32. *Loewy:* Zur Vereinfachung des kulturellen Nachweises der T.b. bazillen nach Hohn. Münch. med. Woch. nr. 49. 1928.

33. *Matthis:* Praktische Ergebnisse mit T.b. Züchtung nach Hohn. Kl. Wochenschrift nr. 8. 1928.

34. *Nao Uyei:* Vitamins and tubercle bacilli. Journal of infectious diseases. Vol. 40.

35. *Orzechowski:* Vergleichende Untersuchungen über die Züchtung des Tb. bazillus nach den Methoden von Uhlenhuth und Hohn.

36. *Pesch und Simchowitz:* Züchtung der Tb. bazillen nach Löwenstein-Sumiyoshi. Münch. med. Woch. 1925, nr. 38.

37. *Petragnani:* Sul terreno al verde di malachite e sulla tecnica per l'isolamento dei bacilli tubercolari. Estratto dal Policlinico (Sezione Practica) anno 1928.

38. *Petragnani:* Alcune utili modificazioni al mio terreno ed alla tecnica per l'isolamento in coltura pura dei bacilli di Koch dagli escreati e da altri materiali tubercolari. Estratto dal Bollettino dell'Istituto Sieroterapico Milanese. Fasc. III Giugno 1926.

39. *Sawelieff:* Uber der Gewinnung von Reinkulturen der T.b. bazillen nach der Methode Hohn. Therap. Monatshefte f. Vet. med. Bd. I H. 2.

40. *Schmidt:* Tierversuch und Kulturverfahren zum Nachweis von Tb. bazillen im Sputum. Centr. f. Bakt. Orig. Bd. 1927.

41. *Schrader:* Züchtung des T.b. bazillus nach Hohn. Centr. f. Bakt. f. Bakt. 1927. Orig. Bd. 102.

42. *Seelemann und Klingmüller:* Die Züchtung von T.b. bakterien aus verschiedenen Ausgangsmaterialen mit Hilfe des sog. „Säurebehandlungsverfahren". Centr. f. Bakt. Orig. Bd. 104.
u.s.w. Bd. 39. ½ Heft.

43. *Sefer:* Die Reinzüchtung der Tuberkelbazillen (typus bovinus). Inaug. Diss. Budapest 1928.

44. *Smith:* The reaction and growth curves of cultures of tubercle bacilli.

45. *Sonnenschein:* Ergebnisse mit der T.b. Züchtung nach Hohn. Münch. med. Woch. 1927, nr. 36.

46. *Soranyi und Putnoki:* Uber die Leistungfähigkeit des directen Züchtungsverfahren nach Löwenstein-Sumyoshi. Centr. f. Bakt. Orig. 1925. Bd. 94.

47. *Sütterlin:* Züchtung der T.b.c. bazillen nach Hohn. Münch. med. Woch. 1927, nr. 28.

48. *Van Riemsdijk:* Het kweeken van tuberkelbacillen uit twijfelachtig materiaal. Tijdschr. voor Geneesk. 1929.

49. *Verdina:* Recherches sur le procédé culturel à l'acide sulfurique dans le diagnostic des procès tuberculeux. Boll. sierother Italiano.

50. *Wolthers Dessau:* Der Kulturelle Nachweis von T.b. bakterien und seine praktische Bedeutung. Tierärtz. Woch. 1928.

51. *Wolthers u. Dehmel:* Ueber das Kulturverfahren zum Nachweis von Tuberkelbakterien, besonders in Gesamtmilchproben. Zeitschr. f. Inf. u.s.w. Bd. 39. ½ Heft.

INHOUD

Hoofdstuk.		Blz.
I.	Inleiding	9
II.	Methoden voor het aantoonen van tuberkelbacillen	11
III.	De voedingsbodem volgens Petragnani en de aangebrachte wijzigingen	28
IV.	Invloed van chemicaliën in het bijzonder zwavelzuur op tuberkelbacillen	56
	§ 1. Literatuuroverzicht	56
	§ 2. Eigen proefnemingen met sterke concentraties	61
	§ 3. Onderzoek met zwakkere concentraties	70
	§ 4. Het microscopisch onderzoek der culturen	76
	§ 5. Groeibevorderende werking van hoogere concentraties	77
V.	Onderzoek van vleesch van tuberculeuze dieren	81
VI.	Kweeken uit microscopisch negatieve, normaal uitziende melk	100
	§ 1. Literatuuroverzicht	100
	§ 2. Eigen onderzoek	102
VII.	Conclusiën	120
VIII.	Literatuuropgave	123

STELLINGEN

I.

Het is gewenscht, dat de paratuberculose (Enteritis paratuberculosa bovum) in de Veewet wordt opgenomen.

II.

Bij een eenigszins uitgebreid voorkomen van mond- en klauwzeer zijn de thans gebruikelijke wettelijke maatregelen van geringe waarde.

III.

De bepalingen over den verkoop van vleesch in het klein onder toezicht dienen nauwkeuriger geredigeerd te worden.

IV.

De behandeling van de distomatose der schapen met tetrachloorkoolstof, verdient sterke aanbeveling.

V.

Een positieve alcoholproef bij versche melk kan veroorzaakt worden door een staphylococcus.

VI.

De toevoeging van chrysoidin aan den voedingsbodem volgens *Endo* verhoogt hare duurzaamheid.

VII.

De aanstelling van adjunct-inspecteurs, voor de contrôle op een juiste uitvoering der vleeschkeuringswet, verdient aanbeveling.

VIII.

Het is gewenscht wilde varkens in de Vleeschkeuringswet op te nemen.