



Vergelijkend onderzoek betreffende *Haemophilus coryzae*, *Haemophilus influenzae* en andere haemophiele bacillen

<https://hdl.handle.net/1874/322568>

Agm. 192, 1936

VERGELIJKEND ONDERZOEK

BETREFFENDE

HAEMOPHILUS CORYZAE,

HAEMOPHILUS INFLUENZAE

EN ANDERE HAEMOPHIELE BACILLEN

B. H. KESSENS

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

VERGELIJKEND ONDERZOEK

BETREFFENDE

HAEMOPHILUS CORYZAE,
HAEMOPHILUS INFLUENZAE
EN ANDERE HAEMOPHIELE BACILLEN

Diss. Utrecht 1936

VERGELIJKEND ONDERZOEK

BETREFFENDE

HAEMOPHILUS CORYZAE, *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* EN ANDERE HAEMOPHIELE BACILLEN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE VEEARTSENIJKUNDE AAN DE
RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT OP GEZAG
VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS DR. W. E.
RINGER, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT
DER GENEESKUNDE, VOLGENS BESLUIT VAN
DEN SENAAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE
BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER
VEEARTSENIJKUNDE TE VERDEDIGEN OP
DONDERDAG 10 DECEMBER 1936,
DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

BERNARDUS HENDERIKUS KESSENS

GEBOREN TE MUNSTERSCHEVELD, 11 SEPTEMBER 1909

MCMXXXVI

UITGEVERS-MIJ. GEBS. VAN AELST, O. L. VR. KADE 10 MAASTRICHT

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

*Aan de nagedachtenis van mijn Ouders
Aan mijn Oom en Tante*

Nu dit proefschrift persklaar is, gaan mijn gedachten uit naar de daarin verwerkte onderzoekingen en naar de hierbij verkregen resultaten. Een bijdrage te hebben kunnen leveren tot de kennis van het geslacht „*Haemophilus*” stemt mij tot vreugde.

De voldoening die hieraan ten grondslag ligt, gaat uiteraard gepaard aan dankbaarheid jegens allen, die mij direct of indirect bij studie en arbeid behulpzaam waren.

Allen, maar vooral U, Hoogleraren, die door voortreffelijk onderwijs in mijn wetenschappelijke vorming een aandeel gehad hebben, ben ik zeer erkentelijk.

U, Hooggeleerde DE BLIECK, Hooggeachte Promotor, dank ik voor de gelegenheid tot werken, die Gij mij boodt, alsmede voor de leiding en medewerking, welke ik van U mocht ondervinden. Het was vooral Uw onderwijs — waarbij een hooge mate van zelfstandigheid geëischt was — dat bij mij een drang tot onderzoeken ontwikkelde. Aan Uw instituut juist op dit onderwerp mijn krachten te mogen beproeven, was mij een groote eer.

Voorts deelen in mijn dank medewerkers en personeel, verbonden aan het Instituut voor Parasitaire en Infectieziekten, die mij bij mijn proefnemingen van dienst waren. De aangename sfeer, aange troffen in Uw midden, en Uw aller hulpvaardigheid zullen blijvend in mijn geheugen bewaard zijn.

Ook voor de mij bij het tot stand komen van dit proefschrift verleende hulp van hen, die staan buiten het Instituut voor Parasitaire en Infectieziekten, heb ik groote waardeering.

INHOUD.

	Blz.
INLEIDING	1
I. <i>HAEMOPHILUS CORYZAE</i> IN EEN VERGELIJKEND ONDERZOEK MET <i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i>	3
LITERATUUR	3
MORPHOLOGIE, STOFWISSELING EN PATHOGENI- TEIT	5
HET KWEEKEN	16
A. Op vaste voedingsmedia	16
1. Historisch overzicht van de vaste voedingsmedia	16
2. Techniek van de vaste voedingsmedia	18
3. Isolatie van <i>Haemophilus coryzae</i>	21
4. Bloedagar en chocoladeagar van de Blicck	24
5. Kweeken in een afgesloten ruimte	25
6. De beste chocoladeagar	26
7. Groei van <i>Haemophilus coryzae</i> en <i>Haemophilus in-</i> <i>fluenzae</i> op de meest gebruikelijke influenzamedia	29
B. In vloeibare voedingsmedia	30
1. Vloeibare media met bloed	30
a. Bloedbouillon	30
b. Agar-bloed	31
c. Leverbloedbouillon	31
2. Vloeibare media met aardappel	32
a. Het winnen van steriele stukjes aardappel	32
b. Rauwe-aardappelbouillon	33
c. Rauwe-aardappelpeptonNaCl	33
d. Rauwe-aardappelbloedbouillon	33
3. Vloeibaar medium met verhit bloed	34
Levinthalbouillon	34
C. De optimum Ph	34

	Blz.
GROEIFACTOREN	36
A. Historisch overzicht	36
1. Groeibevorderende factoren	36
2. Groeiremmende factoren	48
a. In serum	48
b. In roode bloedcellen	48
3. Functie der groeibevorderende factoren	49
4. Samenvatting	52
B. Eigen onderzoek	54
1. Behoeftte aan X- en V factor	54
2. Groeifactoren in aardappel	56
a. Temperatuursproeven	56
b. Diffundeeren van de groeifactoren in aardappel naar bouillon	65
c. Aardappelpersap	66
3. Groeifactoren in serum	68
a. Van paard, rund, schaap, geit en kip	68
b. Van konijn, cavia en kat	70
c. Van duif	72
d. Filtreerbaarheid van groeifactoren in serum	73
e. Proeven met kippenserum na behandeling met carbo animale	73
f. Proeven met verhitte kippenserumbouillon	75
g. Verdunning van kippenserum in bouillon	75
4. Groeifactoren in bloed en haemoglobine	76
5. Satellitisme	78
a. Groeibevorderend vermogen van verschillende bacteriën voor <i>Haemophilus influenzae</i> en <i>Haemophilus</i> <i>coryzae</i>	78
b. Oorzaak van de groeibevordering van <i>Haemophilus</i> <i>coryzae</i> door verschillende bacteriën	80
6. Samenvatting	81
FILTREERBAARHEID	82
SEROLOGIE	86

	Blz.
AETIOLOGISCHE BETEKENIS	90
A. Van <i>Haemophilus influenzae</i>	90
B. Van <i>Haemophilus coryzae</i>	94
CORYZA INFECTIOSA GALLINARUM	100
A. Proefdieren	100
B. Ziekte	101
II. ANDERE HAEMOPHIELE BACILLEN	104
1. Vertegenwoordigers, die X- en V factor noodig hadden	104
2. Vertegenwoordigers, die alleen X factor noodig hadden	109
3. Vertegenwoordigers, die alleen V factor noodig hadden	110
4. Vertegenwoordigers, waarvan de groeifactoren onbekend waren	111
III. SYSTEMATIEK	114
IV. SAMENVATTING	117
LITERATUURLIJST	120

INLEIDING.

Coryza infectiosa gallinarum is een meestal enzoötisch voorkomende kippenziekte, die gekenmerkt wordt door een muceuse of mucopurulente neusuitvloeïing en in ons land algemeen bekend is onder de naam „snotziekte”.

In 1931 ontdekte DE BLIECK een haemophile bacil als oorzaak van deze ziekte. Met reïnculturen van deze bacil, die hij noemde *Bacillus haemoglobinophilus coryzae gallinarum*, kon hij coryza opwekken bij kippen na intranasale indruppeling.

De bedoeling van dit onderzoek was bij te dragen tot de kennis van deze nog onvoldoende onderzochte bacil van de Blicck in het bijzonder en tot de kennis der haemophile bacillen in het algemeen.

Het onderzoek van de coryzabacil van de Blicck was in de eerste plaats een vergelijkend onderzoek van deze bacil met *Haemophilus influenzae*, het type van het geslacht *Haemophilus*, om hierdoor 1e. een juiste plaatsing van genoemde bacil ten opzichte van *Haemophilus influenzae* te verkrijgen in het bacteriologische systeem en 2e. te kunnen profiteren van de door vele onderzoekingen verworven kennis van *Haemophilus influenzae*. In dit werk werden beide bacillen daarom gezamenlijk behandeld.

Voor *Bacillus haemoglobinophilus coryzae gallinarum* werd de juister gebleken naam *Haemophilus coryzae* gebruikt.

Door het regelmatig voorkomen van de namen *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus coryzae* en *coryza infectiosa gallinarum* werden deze afgekort respectievelijk als *Hi*, *Hc* en *coryza*.

I. HAEMOPHILUS CORYZAE IN EEN VERGELIJKEND ONDERZOEK MET HAEMOPHILUS INFLUENZAE.

LITERATUUR.

Volgens DE BLIECK 1931, 1934 was *Bacillus haemoglobinophilus coryzae gallinarum* een gramnegatieve, pleomorfe bacil, met ovoïde vormen, plumpe staafjes, korte en lange draden. De koloniën van *Bacillus haemoglobinophilus coryzae gallinarum* waren — behalve de grootste, die iets wazig waren — rond, glad, glanzend, doorschijnend en steeds kleiner dan de koloniën van *Haemophilus influenzae*. Waarschijnlijk had de bacil X- en V factor noodig. Het beste groeide ze op 25% paardenbloedagar tot 65° C. verhit. Op Fildesagar vormde ze geen duidelijke koloniën. Met gistextract werd geen groeivermeerdering verkregen. Op agar, serumagar, in bouillon en serumbouillon groeide ze niet. Zonder andere bacillen was het moeilijk de culturen aan te houden. De bacil was niet pathoog voor muizen en konijnen.

Verschillende Amerikaansche onderzoekers beschreven eveneens haemophiele bacillen bij coryza. NELSON in New Jersey 1933, DELAPLANE, ERWIN en STUART in Rhode Island 1934, MISS ELIOT en MISS LEWIS in Maryland 1934, SCHALM en BEACH in California 1934 toonden bacillen bij deze ziekte aan, waarmede zij coryzaverschijnselen konden opwekken. DELAPLANE en MISS ELIOT gaven beiden aan hun bacillen de naam *Haemophilus gallinarum*.

Ongetwijfeld zullen deze Amerikaansche bacillen onderling en met de bacil van de Blicck nauw verwant zijn. Daar

echter geen vergelijkend onderzoek van genoemde bacillen had plaats gehad en ze tevens onvolledig onderzocht werden, leek het mij juist deze Amerikaansche bacillen voorloopig als niet identiek met *Haemophilus coryzae* te beschouwen. (Zie blz. 112).

Doordat toegezonden Amerikaansche stammen dood aankwamen, konden deze niet onderzocht worden.

MORPHOLOGIE, STOFWISSELING EN PATHOGENITEIT.

Morphologisch deed *Hc* zich bij mijn onderzoek, evenals *Hi*, steeds voor als een zeer pleomorfe bacil. Er bestond enig verband tusschen zijn vorm en het medium van groei. In bloedbouillon varieerde *Hc* van cocco-bacil tot lang staafje. Hierbij lagen de bacillen vaak twee aan twee achter elkaar of in korte ketens. Lange draden en ketens waren zeldzaam. In bijzondere media als aardappelbloedbouillon en leverbloedbouillon (zie blz. 31) overwogen lange ketens van bacillen, die zich konden uitstrekken over meerdere gezichtsvelden. Op vaste media waren de bacillen vaak regelmatig van vorm met neiging tot keten- en draadvorming.

Hc kleurde zich goed met Löfflers Methyleenblauw 2 minuten en was gramnegatief. Bij oude culturen werd de kleuring onregelmatig. Er traden veel vervalvormen op. De bacillen waren niet meer duidelijk omlijnd. Op vaste media vertoonden de bacillen reeds vanaf de derde dag deze veranderingen.

In een bepaald percentage werden hier en daar intensief gekleurde bolletjes waargenomen, soms verbonden aan het eind van een staafje. Deze lichamen kwamen overeen met door KRISTENSEN beschreven vormen van *Hi*. (Zie foto).

Hc vormde geen sporen en was onbeweeglijk.

In verhouding tot *Hi* was *Hc* iets plomper van vorm.

De koloniën waren dauwdruppelachtig, glad, glanzend, volkomen doorschijnend en gaafrandig. Alleen de grootste koloniën konden centraal iets wazig zijn. Deze laatste werden gevormd op chocoladeagar in gesloten ruimte en waren ruim 1 mm. groot (*Hi* 2-3 mm.).

In verhouding tot *Hi*-koloniën waren *Hc*-koloniën nog kleiner, nog glanzender, nog helderder en nog regelmatiger. *Hi*-koloniën waren in verhouding tot *Hc*-koloniën flauweelachtig zacht. Evenals *Hi*-koloniën konden *Hc*-koloniën een enigszins conisch centrum hebben.

Aan de biochemische activiteit van de haemophile bacillen werd in de literatuur veel aandacht besteed. Deze activiteit had vooral betrekking op de vergisting van koolhydraten, de vorming van indol en de vorming van haemolysine.

Er bestond een groote onregelmatigheid in de vergisting van koolhydraten door *Hi* (LEVINTHAL, 1918, STILLMAN en BOURNE, 1920, RIVERS en KOHN, 1921). Het gelukte niet met deze suikervergisting *Hi* te typeeren of hiermee een constante onderverdeeling te verkrijgen. De vergisting bleek zeer afhankelijk van de gebruikte media. Bouillon voldeed slecht.

De koolhydraatvergisting van *Hi* werd geheel ontkend door het nauwkeurig onderzoek van KRISTENSEN, 1922. KRISTENSEN kon noch in vloeibare noch op vaste media het geringste vermogen van *Hi* aantonen tot vergisting van koolhydraten. Hij toonde aan, dat de zuurvorming van *Hi* in glucoseagar en glucosebouillon niet grooter was dan in dezelfde media zonder glucose. De glucosevrije media werden verkregen door colifermentatie. Door colivergisting werden de wisselende hoeveelheden spijsuiker uit bouillon verwijderd. Dezelfde resultaten werden verkregen voor andere koolhydraten.

Deze onregelmatigheid van koolhydraatvergisting kwam echter niet in de geheele groep tot uiting. RIVERS en LEUSCHNER, 1921 gaven aan, dat *Bacillus haemoglobinophilus canis* een sterke suikervergister was en KRISTENSEN kon dit bevestigen.

Voor de koolhydraatvergisting van *Hc* werd uitgegaan van bouillon. Bouillon werd gebruikt, omdat in andere

media de groei van *Hc* onvoldoende was. Er werden 2 rijen proeven genomen voor iedere stam. In totaal werden 6 stammen onderzocht.

- I. Bouillon (Ph 7,4) + 1% van verschillende koolhydraten, respectievelijk glucose, lactose, galactose, dextrine, maltose, saccharose of inuline, + 5% lakmoes, werden gesteriliseerd en daarna werd hieraan toegevoegd 10% gedefibrineerd paardenbloed.
- II. Geheel als I, maar in plaats van lakmoes Andrades indicator.

In de onder I en II beschreven media gaf *Hc* geen kleurverandering en geen gasvorming, zelfs niet na 10 dagen bebroeden. Microscopisch was in de proefmedia hetzelfde aantal bacillen aanwezig als in contrôlebloedbouillon zonder kleurstof en zonder suiker. De negatieve resultaten waren dus niet toe te schrijven aan een groeiremmende werking.

Uit de beoordeeling van de resultaten was echter niet zonder meer tot een onvermogen van *Hc* om koolhydraten te vergisten te besluiten. Steeds was de groei van *Hc* in bloedbouillon matig en het bleef mogelijk, dat door dit beperkt aantal bacillen de omzetting te gering was om een kleurverandering te geven.

Naar de vorming van indol kon *Hi* verdeeld worden in indolpositieve en in indolnegatieve stammen. Deze indolvorming was een constante eigenschap van de stammen. Indolpositieve stammen behielden hun indolvormend vermogen, ook na lang voortkweken. Indolnegatieve stammen vormden nooit indol. (o.a. RHEIN 1919, RIVERS en KOHN 1921, YABE 1921, KRISTENSEN 1922).

De indolvorming van bacteriën berust hoofdzakelijk op een omzetting van tryptophaan en kan worden aangetoond door de reactie van Ehrlich-Böhme. KRISTENSEN gebruikte bouillon(+ haemoglobine)-culturen voor zijn indolproeven. Bij 1 volume bouilloncultuur deed hij ½ volume van

het volgende mengsel: paradimethyl-amido-benzaldehyde 4, 96% alcohol 380, geconcentreerd zoutzuur 80. Na zacht schudden werd $\frac{1}{2}$ volume van een verzadigde oplossing van kaliumsulfaat toegevoegd. Bij aanwezigheid van indol ontstond een purperroode kleur. De kleur kon langzaam ontstaan en daarom moest het resultaat eerst na 10 tot 15 minuten worden afgelezen. KRISTENSEN beval aan, het kaliumsulfaat niet geheel weg te laten, zooals verschillende onderzoekers deden, daar anders de reactie niet altijd even scherp was.

Volgens de boven beschreven methode werden door mij 6 *Hc*-stammen onderzocht. In de bovenstaande vloeistof van bloedbouillonculturen van deze stammen kon na 1, 2, 3, 4 en 5 dagen bebroeden geen indol worden aangetoond. Ook in een aetherextract van deze culturen — zooals gebruikt werd door RIVERS en KOHN 1921 om indol te concentreren — kon geen indol worden aangetoond met het reagens van Ehrlich.

De vorming van haemolysine, kenbaar door de daarmee samenhangende haemolyse van bloed, was voor *Hi* uitzondering. *Bacillus „X”* van Pritchett en Stillman, die in tegenstelling tot *Hi* wel haemolysine vormt, moest om zijn afwijkende groeivoorwaarden (zie „Andere haemophile bacillen”) een afzonderlijke plaats in deze groep worden toegekend. Eerst FILDES 1924 en later VALENTINE en RIVERS 1927 beschreven haemolytische stammen, die in groeivoorwaarden met *Hi* (X- en V factorbehoefte) overeenstemden. Consequent blijvend kwam aan deze stammen de naam *Hi* var. *haemolytica* toe en niet aan *Bacillus „X”*. *Hc* was in dit onderzoek steeds een niet haemolytische bacil.

De levensduur van *Hi* (eigenlijk van *Hi*-cultuur) bleek te varieeren tusschen één maand en langer. De gegevens hieromtrent waren echter uitermate schaarsch. RIVERS en KOHN 1921 vonden een levensvatbaarheid van één maand

en meer voor *Hi* in bloedbouillon bij kamertemperatuur. Andere onderzoekers beperkten zich tot een vermelding van de levensduur zonder meer. Het leek daarom gewenscht tevens een onderzoek in te stellen naar de levensduur van *Hi* (gebruikt werd een sputumstam).

Levensduur <i>Hi</i> en <i>Hc</i>										
Aantal weken :		1	2	3	4	5	6	7	8	
Bloed- bouil- lon	0°	<i>Hi</i>	++	++	++	+	+	+	±	—
		<i>Hc</i>	+	+	+	—	—	—	—	—
	16°	<i>Hi</i>	++	++	++	+	±	—	—	—
		<i>Hc</i>	+	±	—	—	—	—	—	—
	37°	<i>Hi</i>	++	++	++	++	++	++	++	+
		<i>Hc</i>	+	+	+	+	±	—	—	—
Choco- lade- agar	0°	<i>Hi</i>	++	++	++	+	—	—	—	—
		<i>Hc</i>	+	+	+	+	—	—	—	—
	16°	<i>Hi</i>	++	++	+	±	—	—	—	—
		<i>Hc</i>	+	±	—	—	—	—	—	—
	37°	<i>Hi</i>	++	++	++	++	++	++	++	+
		<i>Hc</i>	+	+	+	+	+	+	±	—

++ : goede groei *Hi*.

+ : goede groei *Hc*; matig koloniën of bacillen voor *Hi*.

± : enkele *Hi*- respectievelijk *Hc*-koloniën of bacillen.

— : geen groei.

Bovenstaande teekens geven de groei op de contrôlemedia aan.

De bloedbouillon en chocoladeagar werden 2 dagen bebroed, daarna respectievelijk geplaatst bij 0° C. in de ijskast, bij 16° C. in het donker of bij 37° C. in de broedstof. De chocoladeagar was in buisjes, die om het uitdrogen te voorkomen gedurende de geheele proef met gummikurken afgesloten waren. Deze maatregel werd genomen, omdat mij gebleken was, dat *Hi* en *Hc* op chocoladeagar zonder kurken

zeer spoedig doodgingen. *Hc* was dan in de meeste gevallen reeds na 5 dagen afgestorven, terwijl *Hi* hierbij varieerend tusschen 7—14 dagen na enting niet meer levensvatbaar bleek. Iedere week werden de proefbuisjes gecontroleerd op levensvatbaarheid. Deze contrôle bestond uit het enten ervan op de volgende nieuwe media: 1. bloedbouillon, 2. chocoladeagar en 3. serumagar. Hierbij werd gelet voor 1 op de ontwikkeling van typische bacillen, voor 2 op de vorming van typische koloniën, terwijl 3 nooit groei mocht vertoonen.

Uit de tabel blijkt:

1. dat *Hi* onder alle omstandigheden een langere levensduur had dan *Hc*;
2. dat de levensduur van *Hi*, zoowel als van *Hc*, het kortst was bij het bewaren van de media bij 16° C. in het donker, langer bij het bewaren der media bij 0° C. in de ijskast en het langst bij voortdurend verblijf van de media in de broedstoof van 37° C.

Chocoladeagar en bloedbouillon gaven overeenkomstige resultaten.

Mag voor *Hi* onder wisselende omstandigheden op een levensduur van 4 weken gerekend worden, voor *Hc* is deze levensduur op zijn hoogst beperkt tot 2 weken.

Deze resultaten werden verkregen met van te voren regelmatig overgeënte culturen. Regelmatig in dien zin te verstaan, dat *Hc* wekelijks en *Hi* om de twee weken overgeënt werd. Werd bij deze proef echter uitgegaan van oude culturen, d.w.z. voor *Hc* 2 weken oude culturen en voor *Hi* 4 weken oude culturen, dan waren de leeftijden veel korter. Deze oude culturen bleken dus niet meer volwaardig.

Deze mindere vitaliteit van oude culturen kwam ook nog tot uiting door het optreden van een groeivertraging. Van regelmatig overgeënte *Hi*- en *Hc*-culturen ontwikkelden zich reeds na 24 uren mooie koloniën, die na 48 uren hun groeimaximum bereikten. Bij gebruik van oudere culturen waren na 24 uren vaak nog geen koloniën te bespeuren, ter-

wijl zich in de volgende 24 uren vele koloniën ontwikkelden. Deze groeivertraging trad niet op bij gebruik van culturen, die voortdurend in de broedstoof bij 37° C. waren gehouden.

Lang gold *Hi* als een streng aërobe bacil (PFEIFFER). LOEWENTHAL 1918, KONDO 1922, KNORR 1925 e.a. verkregen ook groei van *Hi* in media die geschikt waren voor het kweken van streng anaërobe bacillen. Hierdoor ontstond twijfel omtrent de zuurstofbehoefte van *Hi*. De groei onder anaërobe omstandigheden van *Hi* was echter minder goed (SCHELLER 1921). Degeneratievormen traden meer op de voorgrond, vooral bij passageënting (FILDES 1921). Tevens waren absoluut anaërobe omstandigheden voor *Hi* niet te verwezenlijken, omdat zuurstof absorberende (zich dehydroërende vlg. WIELAND) weefselbestanddeelen niet konden worden uitgesloten. De mogelijkheid bleef bestaan, dat *Hi* zijn zuurstof kon onttrekken aan die weefselbestanddeelen. De zuurstofaffiniteit van *Hi* moest dan grooter zijn dan de zuurstofabsorptiekracht van de weefselbestanddeelen (FILDES 1921, LOEWENTHAL 1918).

Resultaten verkregen bij het onderzoek naar de behoefte aan zuurstof van *Hc*:

1. In de vacuümklokken van Zeissler waren de *Hc*-koloniën — op chocoladeagarplaten — slechts weinig kleiner dan in de buitenlucht. Ook de tweede overenting was goed gegroeid in vacuüm.
2. In leverbloedbouillon (zie blz. 31), afgesloten door vaseline, groeide *Hc* ook in de eerste en tweede overenting. Microscopisch was het aantal bacillen in de met vaseline afgesloten buizen als in de open buizen. In de afgesloten buizen traden spoedig vervalvormen op, soms reeds na 24 uren. Vaseline werd gebruikt als afsluiting om haar reduceerend vermogen (OLITSKY en GATES 1921). Leverbloedbouillon + 0,1 cc. van een waterige oplossing van Methyleenblauw, afgesloten door vaseline, was na 2 uren ontkleurd.

3. Chocolateagarplaten — voor de eene helft geënt met *Hc* en voor de andere helft met *Serratia marcescens* — afgesloten door boetseerklei, gaven goede groei van *Hc* (Anaërobemethode volgens Fortner).

De anaërobe groei van *Hc* kon niet bewezen worden. De minder goede groei van *Hc* in anaërobe media, de gunstige werking van meer zuurstof, het niet kunnen uitsluiten van weefselbestanddeelen in de media, wezen in de richting van een permanente zuurstofbehoefte voor de groei van *Hc*.

De pathogeniteit voor proefdieren varieerde sterk bij de verschillende *Hi*-stammen. Zoowel pathogene als apathogene stammen werden beschreven. De meeste onderzoekers schreven de pathogeniteit van *Hi* toe aan een endotoxine-werking (PFEIFFER e.a.), daar met gedooide bacillen dezelfde verschijnselen verkregen werden en in bloed en organen geen vermeerdering der ingebrachte bacillen kon worden vastgesteld. Door een bijzondere pathogeniteit vielen de meningitisstammen van COHEN 1909 op. Deze gaven nl. bacteriaemie bij konijnen na intraveneuze injectie. MARTHA WOLLSTEIN 1919 en KAPSENBERG 1929 konden met een groot gedeelte van hun meningitisstammen ook bacteriaemie bij konijnen veroorzaken. Na COHEN werd ook met sputumstammen bacteriaemie opgewekt. Er was dus virulentiewillekeur van *Hi* bij proefdieren. MARGARET PITTMAN 1931 e.a. brachten eenige regelmaat in deze willekeur, doordat zij aantoonde, dat bacteriaemie bij konijnen veroorzakende *Hi* anders groeide dan gewone sputumstammen, nl. met een sterke lichtschifting van jonge culturen bij schuindoervallend kunst- of zonlicht. (Zie ook „Andere haemophile bacillen”).

Een virulentieverandering werd aangetoond in de proeven van BLAKE en CECIL, 1920. Door passageënting van 11 muizen en 13 caviae werd een virulentievermeerdering verkregen, waardoor *Hi* pathogeen werd voor apen. Bij voortkweeken in kunstmatige media verdween deze virulentie

weer buitengewoon snel. ISHIWARA 1923 toonde een teruggang in virulentie aan bij *Hi* na kunstmatig voortkweken. Stammen, die aanvankelijk een bacteriaemie bij de muis veroorzaakten, werden avirulent. TWORT 1931 toonde aan, dat op verse lever en nier gekweekte *Hi* voor konijnen toxischer waren dan bacillen, die op bloedagar of bloedbouillon waren gekweekt.

Voor *Hi* nam het pathogeniteitsonderzoek bij proefdieren steeds een groote plaats in om vooral hierdoor meer van de beteekenis van *Hi* voor de influenza van de mensch te achterhalen. Meer om het pathogeen karakter dan om de aetiologische beteekenis van *Hc* te kennen, werd de reactie van een beperkt aantal proefdieren op *Hc* nagegaan. Hierbij bleken konijnen en duiven niet te reageeren. Ze verdroegen groote hoeveelheden pas geïsoleerde bacillen, subcutaan of intraveneus, zonder ziek te worden. Ook muizen, intraperitoneaal ingespoten, bleven gezond. Kippen, die intraveneus of intraperitoneaal pas geïsoleerde bacillen kregen toegediend, vertoonden geen verschijnselen. Indien pas geïsoleerde *Hc*-bacillen subcutaan werden aangebracht, vertoonden kippen in sommige gevallen een locale zwelling zonder ziek te worden. Bij één dier, dat pas geïsoleerde *Hc*-bacillen subcutaan onder het oog kreeg toegediend, ontwikkelde zich binnen 48 uren coryza.

Overeenkomstige resultaten verkreeg NELSON met zijn coryzabacil bij kippen na extranasale toediening. Behalve een locale ontsteking na subcutane inspuiting en in enkele gevallen geringe veranderingen aan het omentum na intraperitoneale inspuiting, kon hij door subcutane, intraperitoneale en intraveneuze injectie geen verschijnselen opwekken. Evenwel was na intraperitoneale inspuiting zijn bacil dikwijls in de neus terug te vinden zonder coryza te veroorzaken. Er konden dus dragers gevormd worden. Bij vele van die dragers waren met *Hc*-cultuur tevens geen coryza-verschijnselen op te wekken.

Geheel afwijkend hiervan waren de resultaten bij kippen van DELAPLANE, ERWIN en STUART. Zij gebruikten 24 uren oude pas geïsoleerde culturen. Werden deze in een hoeveelheid van $\frac{1}{4}$ cc., verdund met $\frac{1}{4}$ cc. physiologische NaCl, onder de huid van een poot ingespoten, dan ontstond na 24 uren een zwelling op de plaats van inspuiting. De behandelde dieren vertoonden gedurende eenige dagen depressieverschijnselen en een zeker percentage was verlamd in de ingespoten poot, doch herstelde nadien. Circa 20 dagen na de inspuiting kregen de dieren coryzaverschijnselen. Ook injectie in de lel veroorzaakte een locale zwelling. Zonder dat verdere verschijnselen waren opgetreden ontwikkelde zich binnen 3 dagen coryza. Intraperitoneale inspuiting gaf geen huidreactie, alleen ontstond daarbij coryza na \pm 9 dagen.

Nu zijn deze laatste resultaten weer niet opvallend vreemd, indien het volgende in aanmerking wordt genomen:

1. dat de door DELAPLANE, ERWIN en STUART onderzochte ziektegevallen opvielen door een groote mortaliteit;
2. dat ook hun bacil naast een rhinitis in de meeste gevallen een zwelling van de kop en hals gaf;
3. dat kippen, immuun voor de bacil van Nelson, slechts gedeeltelijk immuun bleken voor de bacil van Delaplane, terwijl omgekeerd kippen, welke immuun voor de coryzabacil van Delaplane waren, dit eveneens bleken te zijn voor de bacil van Nelson.

Ook uit deze aangehaalde punten blijkt een bijzondere virulentie en toxiciteit van de bacil van Delaplane.

Van beteekenis leek het mij van *Hc* de virulentieverhoudingen bij coryza te kennen. Door NELSON werd reeds op een apathogeen worden van zijn coryzabacil na kunstmatig kweken gewezen. Ook DELAPLANE wees op een achteruitgang in virulentie van zijn stamculturen. Hieronder wordt weergegeven de virulentieafname van twee *Hc*-stammen, die wekelijks overgeënt werden op bloedbouillon.

Stam I: pas geïsoleerd: incubatie 1 dag; ziekte 8-9 dagen.
 na 4 weken . . : incubatie 1 dag; ziekte 3-4 dagen.
 na 7 weken . . : geen ziekte.

Stam II: pas geïsoleerd: incubatie 2 dagen; ziekte 6 dagen.
 na 3 weken . . : incubatie 1 dag; . . . ziekte 4 dagen.
 na 5 weken . . : geen ziekte.

„Stam I: na 7 weken” werd tevens geënt op rauwe-aardappelbloedbouillon en hierbij was deze cultuur wel in staat coryza op te wekken: incubatie 1 dag; ziekte 8 dagen.

„Stam I: na 9 weken” werd geënt op: 1. bloedbouillon; 2. rauwe-aardappelbloedbouillon; 3. rauwe-aardappelbouillon; 4. rauwe-aardappelpeptonNaCl. Met deze culturen werden van ieder 2 kippen geënt (met de vorige slechts 1). Alleen de versche-aardappelpeptonNaCl was pathogeen, waarbij:

kip I: incubatie 1 dag; ziekte 14 dagen.

kip II: incubatie 2 dagen; ziekte 5 dagen.

Hc bleek dus reeds spoedig avirulent te worden in bloedbouillon. Dit was het geval met alle stammen. Het medium van groei bleek tevens van invloed te zijn op de virulentie.

HET KWEEKEN.

A. OP VASTE VOEDINGSMEDIA.

1. HISTORISCH OVERZICHT VAN DE VASTE VOEDINGSMEDIA.

Na veel mislukte pogingen gelukte het PFEIFFER *Hi* te kweeken op schuingestolde agar, waarop enkele druppels steriel bloed waren aangebracht. Bij voorkeur gebruikte hij hierbij duivenbloed, dat op de agaroppervlakte met het entmateriaal uitgestreken werd.

PFEIFFER en zijn medewerkers hielden aan deze kweekmethode vast. Vele onderzoekers gingen er echter toe over het bloed met de nog vloeibare agar te mengen. Aan deze modificatie is in de literatuur meest de naam VOGES 1894 verbonden, hoewel dit niet geheel juist is. Reeds BORCHARDT roemde, in het begin van het jaar 1894, deze methode als technisch eenvoudiger en met beter te beoordeelen groei. Toch kreeg deze bloedagar volgens BORCHARDT reeds spoedig andere media naast zich, die in sommige opzichten beter voldeden. Voor het beoordeelen van het haemolytisch vermogen van de haemophiele bacillen bleef het hèt aangewezen medium.

Verhitting van het bloedagarmengsel werd ook reeds vroeg toegepast. VOGES 1894 voegde agar van 100° C. bij enkele druppels menschenbloed in een petrischaal, waarna hij het mengsel goed schudde. In zijn tweede publicatie gebruikte de Weensche onderzoeker GRASSBERGER 1898 deze methode. Hij nam versch bloed of gedefibrineerd bloed. De goede groei, die hij hiermede verkreeg, schreef hij toe aan de 100° C. heete agar.

Het agarbloedmedium op die manier bereid behield zijn roode kleur.

Een langduriger verhitting van het agarbloedmengsel werd toegepast door COHEN en FITZGERALD 1910. Ze verhitten het agarbloedmengsel 3 minuten bij 80° C. in een waterbad, waardoor het medium een chocoladebruine tint verkreeg. Het was de eerste bijdrage voor de bereiding van chocoladeagar.

In 1912 ontdekte POVITZKY eveneens de waarde van chocoladeagar.

Eerst later vond de chocoladeagar algemeen ingang in Europa door toedoen van HUNDESHAGEN 1918. In Amerika werd ze toen reeds veel gebruikt.

Van 1918 tot 1920 dateeren meerdere goede media. Bij alle worden de bloedcellen aangetast en vernield, waardoor de voor *Hi* actieve stoffen vrijkomen en in het agarmedium beter kunnen diffundeeren.

LEVINTHAL 1918 liet het agarbloedmengsel boven de vlam koken. Door deze intensieve inwerking van warmte ontstonden bruine stolsels. Een helder optimaal medium voor *Hi* bleef over.

HUNDESHAGEN 1918 maakte eveneens gebruik van verhitting van het agarbloedmengsel. Hij voegde bloed bij de agar van 95-100° C. en zette daarna het agarbloedmengsel nog eenige minuten in een waterbad van 100° C. Het medium kreeg een chocoladebruine tint. HUNDESHAGEN nam deze chocoladeagar van de Amerikanen over in 1915 en noemde ze ook „Amerikanische Nährboden”.

TOCUNAGA 1919 behandelde bloed met alcali, FLEMMING met sterk zuur. Echter noch met alcali, noch met zuurbehandeling van bloed waren media te bereiden die speciale aanbeveling verdienden.

MATTHEWS 1918 was de eerste, die bloed tot een bepaalde graad liet verteren en het daarna met succes gebruikte voor de bereiding van een influenzamedium. Hij liet trypsine inwerken op bloed. Daar echter trypsine andere bloedsoorten niet ver genoeg verteerde, was hij aangewezen op menschenbloed.

FILDES 1919 maakte gebruik van pepsinevertering. Pepsine werkte op alle bloedsoorten. Hij liet bloed verteren door pepsine en HCl. Dit principe was al oud en reeds door CANTANI 1901 — echter zonder succes — gebruikt. CANTANI gebruikte te weinig pepsine (KRISTENSEN) en kreeg daardoor slechte resultaten.

2. TECHNIEK VAN DE VASTE VOEDINGSMEDIA.

Mijn onderzoek had alleen betrekking op de meest gebruikelijke influenzamedia. Deze zijn hier uitvoeriger besproken.

B l o e d a g a r. Bloed wordt toegevoegd aan de nog juist vloeibare agar (40° C.). Het bloedgehalte kan variëren.

Voor het gebruik verdient het aanbeveling versch bereide bloedagarplaten en -buisjes 24 uren in de broedstof te plaatsen. Hierdoor heeft men niet alleen een contrôle op steriliteit, maar in die 24 uren krijgen de voor *Hi* actieve stoffen tevens beter gelegenheid uit de bloedcellen in de omgeving over te gaan. Volgens LEVINTHAL zou op versche platen *Hi* vaak geremd worden. De bloedagarplaten worden in die 24 uren tevens bevrijd van overtollig condensvocht, waardoor het gemakkelijker is de culturen rein te houden.

L e v i n t h a l a g a r. Dit is een van de media, die als influenzamedium optimaal genoemd kunnen worden. Volgens voorschrift van LEVINTHAL, 1921 wordt dit medium als volgt samengesteld:

2—2½% Agar wordt vervloeid en tot 70° C. afgekoeld in een kolf. Hierna wordt bloed toegevoegd en het geheel goed gemengd. Men kan zoowel bloed van mensch als van dier nemen. LEVINTHAL gebruikte reeds sinds jaren gedefibreerd paardenbloed, dat eventueel eenige tijd in de ijskast bewaard kon worden. Het bloedpercentage kan tusschen bepaalde grenzen schommelen. Aanbevolen wordt 5%.

Worden slechts kleine hoeveelheden van 100-200 cc. gemaakt, dan kan de kolf op een gaasje boven de vlam verhit

worden. De bloedagar wordt steeds donkerder bruin, begint dan te koken en stijgt omhoog in de hals van de kolf. Het mengsel wordt nu vlug van de vlam afgezet en onmiddellijk daarna onder omschudding opnieuw opgekookt. Vervolgens wordt dit verhitte mengsel gefiltreerd door glaswol. Van het filtraat wordt de Ph bepaald met lakmoes, waarbij een geringe blauwkleuring gewenscht is. De agar is daarna voor gebruik gereed. Men kan er eventueel buisjes mee vullen, die voor het gebruik dan vervloeid worden door ze 1—2 minuten in een reeds kokend waterbad te plaatsen.

Voor grootere hoeveelheden moet men in plaats van de vlam waterdamp van 100° C. (Koch) gebruiken, evenwel niet langer dan 5—10 minuten al naar de hoeveelheid, die men maken wil.

Chocolade agar. Onder chocoladeagar kunnen verschillende media schuil gaan, die alleen de kleur en de bereiding onder verhitting gemeen hebben. Wisselen kunnen: de tijd van inwerking der temperatuur, de temperatuursgraad en het bloedpercentage. Chocoladeagar dient daarom steeds nader te worden aangeduid. Hundeshagenagar moet steeds nader te worden aangeduid. Hundeshagenagar moet eenige minuten in een waterbad van 100° C. verhit worden. Er ontstaat dan een optimaal medium.

Een voordeel van de Levinthalagar boven de Hundeshagenagar is zijn doorschijnendheid. Als nadeelen van de gefiltreerde Levinthalagar ten opzichte van Hundeshagenagar en ten opzichte van ongefiltreerde Levinthalagar worden aangegeven:

- a. de kortere levensduur van *Hi* hierop. HUNDESHAGEN gelukte het vaak niet meer 3 dagen oude culturen op gefiltreerde Levinthalagar over te enten.
- b. het groote materiaalverlies bij filtreren.

Voor het voortkweken van *Hi* in reïncultuur, waarbij de doorschijnendheid van weinig betekenis is, geeft HUNDESHAGEN de voorkeur aan een medium, dat de bloedbestanddeelen in zijn geheel bevat.

Een karakteristiek verschil tusschen Levinthal- en chocoladeagar in het algemeen is, dat bij de eerste een intensievere inwerking van warmte heeft plaats gehad.

F i l d e s a g a r. FILDÉS gaf hiervoor de volgende bereiding aan:

Een mengsel van 150 cc. physiologische NaCl-oplossing, 6 cc. pure HCl, 50 cc. gedefibrineerd (schapen)bloed, 1 gr. pepsine, B.P., gekorrelt, wordt geschud tot het is opgelost. Daarna wordt het gedurende 2—24 uren in een waterbad van 55° C. geplaatst, waarbij het in het begin nu en dan wordt geschud. De preciese tijd is niet van belang. Hierna worden 12 cc. van een 20% NaOH-oplossing toegevoegd. De reactie met cresolrood (0,2% oplossing) wordt bepaald. Indien geen rood-violette kleur ontstaat, dient meer NaOH te worden toegevoegd, tot die kleur bereikt is (Ph 7,6). Hiervoor neemt men met een pipet kleine hoeveelheden en verdunt deze met aqua destillata totdat de kleur licht genoeg is om de verandering met cresol te kunnen zien. Wanneer de Ph 7,6 bereikt is, wordt pure HCl toegevoegd, druppel voor druppel, totdat cresolrood practisch geen verandering van kleur meer geeft, maar phenolrood een roode kleur geeft (Ph 7-7,2).

Ter conserveering wordt 0,25% chloroform toegevoegd. Voor het gebruik worden met een steriele pipet hoeveelheden van 2—5% bij vloeibare agar gedaan. Het is daarbij niet noodig de chloroform te verwijderen.

Fildesagar werd veel gebruikt door KRISTENSEN en in zijn standaardwerk (1922) aanbevolen voor het aanhouden van reïnculturen. Ze gaf een goede groei van *Hi*. Voor de grootst mogelijke massacultuur zou een verhit agarbloedmengsel misschien beter zijn.

Fildesagar is iets donkerder van kleur dan Levinthalagar, doch eveneens helder.

Steeds werd uitgegaan van 2% agar, tenzij dit anders werd aangegeven.

3. ISOLATIE VAN *HAEMOPHILUS CORYZAE*.

Voor het isoleeren van *Hc* werd regelmatig de volgende methodiek angewend. Een weinig materiaal (zie hieronder) werd gebracht op een chocoladeagarplaat en zig-zag hierop uitgestreken met een steriele spatel van Drigalsky. Hierbij werd er voor gezorgd, dat niet tweemaal dezelfde plaats van het medium bestreken werd. Op dezelfde manier werden twee verdunningsplaten geënt. Na 24 uren bebroeden van de geënte platen (afgesloten in Weckflesschen) bij 37° C. werd hiervan de geschiktste plaat uitgezocht voor het overenten van typische glasheldere *Hc*-koloniën. Dit overenten was eenvoudig te doen met een scherpe entnaald onder een binoculair microscoop.

Indien geënt werd met materiaal, afkomstig van jonge coryzagevallen, was deze regelmaat ternauwernood vereischt, daar, vooral op de verdunningsplaten daarbij, vaak al een bijna reincultuur van *Hc* aanwezig was. Anders was dat met materiaal van oudere coryzagevallen en in vele gevallen ook met materiaal van spontane coryzagevallen, in hetwelk in verhouding tot andere bacteriën maar weinig *Hc*-bacteriën bleken voor te komen. Op platen hiermede geënt waren na 24 uren zig-zag-banden van een mengsel van bacteriënkoloniën gegroeid. Op de bijbehorende verdunningsplaten bleken deze banden veel dunner bezet met koloniën, hetgeen ook afhankelijk was van de hoeveelheid opgebracht materiaal. Platen, die dun bezet waren met koloniën, vertoonden meestal geen *Hc*-koloniën en kwamen daardoor niet in aanmerking om ervan over te enten. Op platen met goed begroeide banden, met toch nog afzonderlijke koloniën, boden juist de open plekken tusschen de zig-zag-banden mooie gelegenheid om *Hc* in reincultuur over te brengen. Het was als het ware of in de banden *Hc*-koloniën overwoekerd werden, terwijl zij aan de randen onbelemmerd en geïsoleerd opdoken. Aan de ruimten tusschen de banden werd daarom steeds bijzondere aandacht besteed.

De uitgezochte koloniën werden overgebracht in bloedbouillon. Vervolgens werd nagegaan of de aldus verkregen culturen *Hc*-stammen waren. Hiertoe werden ze intranasaal ingedruppeld bij kippen. Alleen culturen, die coryza veroorzaakten, werden als *Hc*-stammen aangehouden. Toen bleek, dat alle coryza veroorzakende stammen in bloedbouillon karakteristieke cultureele eigenschappen hadden (zie „Bloedbouillon”), waren deze reeds hierdoor met vrij groote zekerheid te onderkennen. Toch werd het pathogeniteits-onderzoek bij de kip ook nu niet nagelaten.

Keuze van materiaal. Overeenkomstig de methode van de Blicck werden, vooral bij oude gevallen en bij spontane gevallen van coryza, zoo steriel mogelijk stukjes slijmvlies en slijm, uit neus en infraorbitale ruimten van de meest aangetaste zijde van de kop, genomen. Deze deelen werden met een weinig physiologische NaCl goed fijnge-wreven in een steriele mortier. Een druppel hiervan werd op een plaat gebracht.

Was er bezwaar, dat een kip werd opgeofferd, dan werd uit de neus gedrukt materiaal voor het isoleeren gebruikt. Hiertoe werd vooraf de neus gereinigd van vuil.

Met materiaal, gewonnen volgens eerstgenoemde methode, werden de beste resultaten bereikt. Goed fijn wrijven van het slijmvlies was hierbij gewenscht. Misschien komen hierdoor *Hc*-bacillen vrij en wordt het gehalte daarvan dientengevolge verhoogd.

Desalniettemin gelukte het mij ook in den regel uit materiaal, verkregen volgens de laatste methode, *Hc* te isoleeren. Op de met zulk materiaal geënte platen waren evenwel andere koloniën in grooter getal aanwezig. Soms was slechts van enkele koloniën over te enten.

Slijm, gewonnen met een entnaald door de geopende bek, via de gehemeltespleet, bleek weinig geschikt. Hoewel dit slijm gemakkelijk bij een levende kip verkregen werd en er ook niet teveel bacteriën in voorkwamen van andere soort,

ontwikkelden zich uit de overgeënte glasheldere koloniën vaak haemophile stammen met van *Hc* afwijkende eigenschappen, waarmede ook geen coryzaverschijnselen waren op te wekken. Mogelijk was het voorkomen van dergelijke afwijkende stammen toe te schrijven aan de methode van materiaalwinning via de keel. In de keel treft men immers ook bij de mensch dikwijls veel haemophile bacillen aan.

Methode van Delaplane. Bij dieren met oedeemateuze zwellingen aan de kop, kon DELAPLANE zijn coryzabacil uit het oedeemvocht in reincultuur isoleeren. Nu traden, zooals reeds gezegd werd, bij de door DELAPLANE onderzochte ziektegevallen in den regel zwellingen op en kreeg deze bevinding daarom voor hem beteekenis voor het regelmatig isoleeren van zijn bacillen. Later bleek hem nog, dat hij de eerste 24 uren nadat de zwellingen ontstaan waren, moest benutten, daar later het isoleeren van zijn coryzabacil steeds minder vaak gelukte.

Daar bij mijn gevallen sporadisch zwellingen optraden, konden in totaal slechts enkele oedeemvochten onderzocht worden. In één geval werden de zwellingen aangetroffen bij een spontaan coryzageval. Hierbij, evenals bij een kunstmatige infectie, waarbij de zwellingen 48 uren aanwezig waren, kon *Hc* niet uit het oedeemvocht geïsoleerd worden. Wel gelukte het *Hc* uit het oedeemvocht te isoleeren bij een cultuurcoryzageval met zeer op de voorgrond tredende zwellingen, die 24 uren aanwezig waren. Enkele ösen oedeemvocht, steriel gewonnen, werden bij mijn onderzoek in bloedbouillon gebracht. Tevens werden met oedeemvocht chocoladeagarplaten geënt. Op chocoladeagarplaten, geënt met oedeemvocht van het laatste geval, ontwikkelde zich een reincultuur van *Hc*.

De methode van Delaplane zou slechts gebruikt kunnen worden voor genoemde specifieke gevallen en dan nog alleen, indien de zwellingen niet ouder dan 24 uren zijn. Tevens bleek mij, dat deze methode moeilijk van toepassing

kon zijn bij een levend dier. Ook bij deze specifieke gevallen lijkt mij daarom de beschreven plaatmethode meer geschikt.

Ik wil er hier nog op wijzen, dat alleen materiaal, afkomstig van coryzagevallen met korte incubatie, te gebruiken is om *Hc* te isoleren. (Zie verder blz. 97).

4. BLOEDAGAR EN CHOCOLADEAGAR VAN DE BLIECK.

De bedoeling was in de eerste plaats een goed medium voor het kweken van *Hc* te vinden. Hiertoe werden verschillende proeven genomen.

DE BLIECK gebruikte voor het isoleren en kweken van *Hc* 25% bloedagar en 25% chocoladeagar. De chocoladeagar werd 10 minuten op 65° C. verhit in een waterbad. Steeds werd gedefibrineerd paardenbloed gebruikt. Beide media werden onderzocht.

De chocoladeagar gaf betere groei van *Hc* dan de bloedagar. Chocoladeagar gaf in den regel goede groei, die echter niet steeds constant was. Soms was de groei veel minder goed en waren de koloniën niet grooter dan speldepunten. Bij goede groei waren de koloniën ruim ½ millimeter groot. Op bloedagar was de groei vaak niet meer dan juist zichtbaar. In de buurt van satellieten ontwikkelden zich in sterke mate reuzenkoloniën. Zoowel op chocoladeagar als op bloedagar waren de koloniën steeds glashelder.

Evenals voor *Hi* was dus de groei van *Hc* op chocoladeagar veel beter. Voor *Hi* was daarvan de oorzaak, dat groeibevorderende stoffen uit de bloedcellen door het medium verspreid waren en in nauw contact konden treden met de bacillen. Daarbij werden nog eventueele groeibelemmerende stoffen door de verhitting vernietigd. Bij bloedagar viel steeds de aanwezigheid van een dun licht-gekleurd laagje aan de oppervlakte op, waardoor het contact van *Hi* met de bloedcellen bijna geheel uitgesloten moest zijn en de bron van levensnoodzakelijke stoffen voor *Hi* hoofdzakelijk moest ontstaan door het diffundeeren van deze uit de bloed-

cellen. Uit latere proeven werd duidelijk, dat de betere groei van *Hc* op chocoladeagar eveneens toegeschreven moest worden aan het betere contact met noodzakelijke bloedcelbestanddeelen.

5. KWEEKEN IN EEN AFGESLOTEN RUIMTE.

NELSON 1933 verkreeg voor de door hem geïsoleerde coryzabacil veel betere groei in afgesloten petrischalen. Hij plaatste de geënte petrischalen zonder deksel op platen klei, waarop een steriel papier was aangebracht. Onderzocht werd, of door afsluiting ook betere groei van *Hc* te verkrijgen was.

Geënte petrischalen met chocoladeagar, zonder deksel, werden op steriele glasplaten geplaatst, waarna afsluiting volgde met boetseerlei. Ter vergelijking werden eveneens geënte open chocoladeagarplaten in de broedstoof gezet. Het bleek, dat de gewijzigde methode Nelson goed was. In de gesloten platen waren de koloniën aanmerkelijk grooter dan in de open platen en de groei was steeds constant goed. Ze verkregen in de gesloten platen een grootte van ruim 1 millimeter. Bij de grootste koloniën was soms in het centrum een geringe witte troebeling opgetreden.

Getracht werd uit dit principe van afsluiting een praktische methode op te bouwen voor het kweken van *Hc*. De methode Nelson moest als weinig praktisch zoo gauw mogelijk vervangen worden, temeer daar het moeilijk was op die manier de culturen rein te houden. Een praktische methode, gebaseerd op het principe Nelson, werd gevonden door toepassing van Weckflesschen. Gebruikt werden Weckflesschen, die voldoende ruim waren om 6 petrischalen te kunnen herbergen en voorts goed afgesloten konden worden met gummiring, deksel en beugel. Hierin werden geënte petrischalen omgekeerd geplaatst.

Bij vergelijkende proeven tusschen open platen, platen die afgesloten werden volgens gewijzigd Nelson en platen

die in Weckflesschen werden afgesloten, was de groei in beide laatste groepen evengoed, terwijl open platen kleinere koloniën vertoonden.

Door de goede resultaten en de eenvoudige toepassing werd deze Weckafsluiting in volgende proeven steeds toegepast. Ook voor het isoleeren van *Hc* beteekende deze methode een vooruitgang.

De oorzaken van deze betere groei onder afsluiting bleven onbekend. Mogelijk spelen CO_2 en vochtigheidsgraad hierbij een rol.

DELAPLANE wees op de betere groei van zijn *Haemophilus gallinarum* in een „vochtige kamer”. SCHALM en BEACH verkregen betere groei in een atmosfeer, die 10% CO_2 bevatte. Duidelijk werd echter niet of hun toevoegingen van vocht en CO_2 noodig waren.

6. DE BESTE CHOCOLADEAGAR.

Zooals reeds gezegd werd, kan de samenstelling van chocoladeagar verschillen. De vraag was daarom, welke chocoladeagar het meest geschikt was voor het kweken van *Hc*. Hiertoe werden verschillende proeven genomen.

Uitgegaan werd van chocoladeagar van de Blicck, waarbij één van de factoren — 1. tijd van inwerking van temperatuur (temperatuurstijd), 2. temperatuursgraad en 3. bloedpercentage — systematisch veranderd werd.

Proef 1. Verschillende hoeveelheden chocoladeagar werden bereid met temperatuursgraad 65°C . en bloedpercentage 25 als constanten, temperatuurstijd als veranderlijke component. De temperatuurstijd van de verschillende hoeveelheden was respectievelijk 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 en 30 minuten. De verhitting van de chocoladeagar vond plaats in een waterbad van 65°C . Van iedere hoeveelheid werden 100 cc. gemaakt, uitgegoten tot 6 platen. De groei na 24 uren bebroeden werd vergeleken.

De chocoladeagar 9 t/m 15 minuten gaf een goede en

gelijkmatige groei van *Hc*. De groei op 7 en 8 minuten was slechter. Door het optreden van veel stolsels kwam de hoeveelheid van 30 minuten niet als medium in aanmerking en kon verder buiten beschouwing gelaten worden. Waarschijnlijk was de groote hoeveelheid stolsels veroorzaakt door het groote percentage bloed. Chocoladeagar 5% bloed 30 minuten gaf een goed medium, echter met onvoldoende groei.

De keuze van de beste chocoladeagar lag dus tusschen 9 en 15 minuten. Hierbij gaf 9 tot 10 minuten een gelijkmatig bruin medium, 11 minuten en hooger een ongelijkmatig grauw gekleurd medium (stolsels), 7 en 8 minuten een rood tot roodbruin gekleurd medium.

De kortste tijd van verhitting — noodig voor een goede groei van *Hc* — voor 25% chocoladeagar 65° C. was dus 9—10 minuten. Hierbij werd een gelijkmatig bruin gekleurd medium verkregen. Een hoogere temperatuur kon die groei niet verbeteren.

Na eenige ervaring was bijna met zekerheid na het beoordeelen van chocoladeagarplaten of -buisjes te zeggen of de 25% chocoladeagar 65° C. te kort of te lang verhit was. Bij te korte verhitting was het medium te rood, terwijl te lange verhitting een ongelijkmatig grauw medium gaf.

Proef II. Opzet geheel als bovenstaande. Temperatuurstijd 10 minuten en bloedpercentage 25, constanten; temperatuursgraad, wisselende component. De temperatuur van de verschillende hoeveelheden was: 55°, 60°, 65°, 70°, 75°, 80°, 85°, 90°, 95° en 100° C.

Bij verhitting op 80° en hooger werd het uitgieten bemoeilijkt door het spoedig optreden van stolsels. De groei bij verhitting op 65°, 70° en 75° was goed en gelijkmatig; bij verhitting op 55°, 60°, 80° en hooger was de groei minder goed. Van 65°, 70° en 75° gaf alleen 65° een gelijkmatig bruin medium, terwijl 70° en 75° een ongelijkmatig grauw medium te zien gaven.

De temperatuur 65° C. van chocoladeagar met 25% bloed, 10 minuten verhitting, was dus de eenigste temperatuur die met goede groei van *Hc* een gelijkmatig gekleurd medium gaf. Reeds een temperatuur van 67° C. bleek een minder gelijkmatig gekleurd medium te geven.

Door het veranderen van een der factoren temperatuurstijd of temperatuursgraad was de chocoladeagar van de Blicck dus niet te verbeteren als medium voor *Hc*.

P r o e f I I I. Temperatuursgraad 65° C. en temperatuurstijd 10 minuten, constanten; bloedpercentage varieërend. Hoeveelheden met 5, 25, $33\frac{1}{3}$ en 40% bloed. Percentage berekend in volumeprocenten, waarbij het agargehalte werd beschouwd als van geen beteekenis te zijn, daar steeds werd uitgegaan van 200 cc. 2% agar.

Op 25% was de groei goed, op $33\frac{1}{3}\%$ was ze nog iets beter, op 40% als op $33\frac{1}{3}\%$, op 5% minder goed dan op 25%.

Door het bloedpercentage van 25 op $33\frac{1}{3}$ te brengen kon de chocoladeagar van de Blicck dus nog een geringe verbetering ondergaan als medium voor *Hc*.

De bij bovenstaande proeven verkregen resultaten waren aanleiding om de bereiding van chocoladeagar voor *Hc* als volgt te doen geschieden:

Bij 200 cc. 2% agar — hoeveelheden, die in kolven in voorraad werden gehouden — vloeibaar gemaakt en afgekoeld tot 65° C., werden gevoegd 100 cc. voorverwarmd gedefibrineerd paardenbloed. Na voorzichtig mengen der bestanddeelen werden deze 10 minuten verhit in een waterbad van 65° C. onder langzaam wentelen (voorkomen van schuim) van de kolf. Daarna was de massa voor gebruik gereed. Gedefibrineerd paardenbloed werd in hoeveelheden van 100 cc. in steriele fleschjes bewaard in de ijskast. Na één maand bewaren was het nog goed te gebruiken.

7. GROEI VAN *HAEMOPHYLUS CORYZAE* EN *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* OP DE MEEST GEBRUIKELIJKE INFLUENZAMEDIA.

Een vergelijkend onderzoek werd ingesteld tusschen de groei van *Hi* en *Hc* op influenzamedia. Het was de vraag, hoe de groei van *Hc* op de verschillende media zou zijn. De resultaten van dit onderzoek werden vastgelegd in onderstaande tabel.

Medium :	% bloed	<i>Hi</i>	<i>Hc</i>
Bloedagar	5	+	±
	25	++	+
Chocoladeagar	5	+++	++
	25	+++	+++
Levinthalagar ¹⁾	5	+++	—
Fildesagar	5	+++	—
	25	+++	—

¹⁾ Levinthalagar 25% was niet meer te gebruiken door de vele stolsels. Het aantal kruisjes geeft de mate van groei aan, waarbij voor *Hi* en *Hc* een eigen maatstaf werd aangelegd. +++*Hi* beteekent een weelderiger groei en grootere koloniën dan +++*Hc*.

De bereiding der media was geheel volgens de op blz. 18 aangegeven methodes. Fildes pectic digest werd 6 uren bij 55° C. in een zelfregelend waterbad verhit. Chocoladeagar was 10 minuten verhit op 65° C. De geheele proef werd gelijktijdig genomen.

Uit deze proef bleek:

1. dat *Hc* beter groeide op 25% chocoladeagar dan op 5% chocoladeagar. *Hi* kon reeds op 5% chocoladeagar zijn optimale groei ontwikkelen.
2. dat chocoladeagar, Levinthalagar en Fildesagar, zoowel 5 als 25%, een optimale groei van *Hi* gaven. Opvallend was daarentegen het uitblijven van de groei van *Hc* op Levinthal- en Fildesagar. Om zeker te zijn, dat dit een constant verschijnsel was, werden meermalen andere hoeveelheden Levinthal- en Fildesagar onderzocht,

waarbij steeds hetzelfde resultaat werd verkregen. Soms werd hier en daar een verdwaalde kolonie aangetroffen, meer niet.

Er was dus een karakteristiek verschil tusschen de groei van *Hi* en *Hc* op influenzamedia. Als oorzaak daarvan moet worden gewezen op de behoefte van *Hc* aan een zeer thermolabiele substantie, zooals nog zal blijken.

B. IN VLOEIBARE VOEDINGSMEDIA.

Terwijl *Hi* in vloeibare media met voldoende X- en V factor goed — en steeds in dezelfde vorm — groeit en de bereiding van deze vloeibare media, met inachtneming van de aanwezigheid van bestanddeelen met voldoende X- en V factor, geen bijzondere eischen stelt, was voor *Hc* een nader onderzoek noodig. Een goed vloeibaar medium moest van beteekenis geacht worden voor het aanhouden van *Hc*-culturen.

Achtereenvolgens zullen enkele onderzochte vloeibare media voor *Hc* besproken worden.

1. VLOEIBARE MEDIA MET BLOED.

a. **Bloedbouillon.** Bouillon, waaraan 10% gedefibrineerd paardenbloed werd toegevoegd. Zoowel Liebig- als vleeschextractbouillon werden gebruikt. Toen echter bleek, dat *Hc* geen voorkeur had voor een van beide, werd Liebigbouillon in verband met het prijsverschil meer gebruikt. Het bloed werd bij de bouillonbuisjes gedaan met een steriele pipet. Als de bloedcellen bezonken waren, was in de bloedbouillonbuisjes de bovenstaande vloeistof geheel helder. Ter contrôle op steriliteit werden de buisjes 24—48 uren in de broedstoof geplaatst, waarna de bouillon volkomen helder moest blijven.

De groei van *Hc* in bloedbouillon was karakteristiek. Hij beperkte zich tot de naar de bodem gezakte bloedcellen. De bovenstaande bouillon bleef — tenminste de

eerste tijd, later was dit door haemolyse minder goed te beoordeelen — volkomen helder. In microscopische preparaten, gemaakt uit het bloed, was steeds slechts een matige hoeveelheid bacillen aanwezig. Deze bacillen waren polymorph en lagen vaak twee aan twee achter elkaar of in korte ketens. Lange ketens kwamen zelden voor. Preparaten van de bovenstaande bouillon vertoonden slechts hier en daar een verdwaalde bacil.

Een nadeel bij het regelmatig gebruik van bloedbouillon was, dat de groei van *Hc* in dit medium, door het helder blijven van de bouillon, alleen kon worden vastgesteld door het maken van een microscopisch preparaat. Een voordeel bij dat gebruik was, dat verontreinigingen, niet alleen van ongeënte, maar ook van met *Hc* geënte bloedbouillon, zich openbaarden door het troebel worden van de bouillon. De matige bacillenrijkdom bleek geen bezwaar om dit medium voor het aanhouden van *Hc* te gebruiken. Door zijn eenvoudige bereiding — in vergelijking tot de andere — had dit medium de voorkeur. Door mij werd bloedbouillon daarom regelmatig gebruikt voor het aanhouden van *Hc* en tevens veel toegepast voor andere doeleinden.

b. *Agar-bloed*. Hiermee werd bedoeld een vloeibaarvast medium, bestaande uit buisjes schuingestelde agar, waaraan op de oppervlakte met een steriele pipet $\frac{1}{2}$ cc. bloed was toegevoegd. ШОПЕ gebruikte dit medium bij voorkeur voor zijn *Haemophilus influenzae suis*.

Ook *Hc* groeide in dit medium. Het bloed aan de basis van de agar vertoonde een grotere bacillenrijkdom dan het bloed van bloedbouillon. Een nadeel was, dat noch de groei, noch de reinheid van dit medium eenvoudig gecontroleerd kon worden. Voor het aanhouden van *Hc*-stammen verdiende bloedbouillon daarom de voorkeur.

c. *Leverbloedbouillon*. Leverbouillon van Tatrozky, waaraan 10% bloed werd toegevoegd.

De formule en bereiding van leverbouillon volgens TAROTZY zijn als volgt:

Aqua communis 100, Liebig's vleeschextract 1, Pepton (Witte) 1, NaCl $\frac{1}{2}$, Runderlever 10. Voor het toevoegen der runderlever moet de Ph op 7,6 gebracht worden. Het geheel wordt 15—30 minuten verhit op 100° C., daarna gefiltreerd. De lever wordt nu in stukjes van 3—4 gr. bij 10 cc. filtraat in buisjes gedaan. De buisjes worden gedurende $\frac{1}{2}$ uur op 110° C. gehouden.

Dit medium werd hier vermeld om zijn bijzondere vorm van groei voor *Hc. Hc* groeide in dit medium uitsluitend in lange ketens of draden in matige hoeveelheid. Dit verschijnsel was steeds constant.

2. VLOEIBARE MEDIA MET AARDAPPEL.

a. Het winnen van steriele stukjes aardappel. THJÖTTA en AVERY gaven de volgende methode aan:

Gladde aardappels werden gewasschen en gedroogd. Met een steriel mes werd er een manchet afgeschild, waardoor een circulaire gladde vlakke ontstond. Deze vlakke werd gebrand met een gloei-ijzer. Daarna werden de aardappels gekliefd door de gebrande vlakke en steriele stukjes werden uit de sneevlakke gesneden. Deze stukjes werden in steriele petrischalen gedaan en op gewenschte grootte gebracht.

De bezwaren van deze methode waren, dat niet mooie uniforme stukjes verkregen werden en dat het nog niet zoo eenvoudig was op deze manier steriel te werken. Een tamelijk groot percentage verontreinigingen kwam voor.

Een betere methode werd gezocht en gevonden. Liefst groote aardappels werden gewasschen en gedroogd. Beide polen werden in de vlam geschroeid. Met een in de vlam gesteriliseerd mes werden van beide polen kapjes afgesneden. Daarna werden met een van te voren gesteriliseerde cylinderboor, doorsnede 1 cm., uit de geschroeide aardappels

steriele cilindrs geboord. Deze aardappelcilindrs werden langzaam, met een eveneens van te voren gesteriliseerde staaf — of met een in de vlam uitgegloeide staaf — uit de cilinderboor geschoven. Een helper sneed met een steriel mes stukjes van $\frac{1}{2}$ cm. af, die dadelijk in de diverse media gedeponeerd werden.

Met deze methode werden mooie uniforme aardappelcilindrs verkregen van 1 cm. doorsnede en $\frac{1}{2}$ cm. lengte. Verontreinigingen, door niet steriel werken, behoorden tot de uitzonderingen. Deze methode leek zeer ingewikkeld, doch bleek practisch goed uitvoerbaar en voldeed best.

b. R a u w e - a a r d a p p e l b o u i l l o n. Buisjes bouillon met steriele aardappelcilindrs. Na 24 uren contrôle in de broedstoof was de bouillon bijna zonder uitzondering helder.

Hc veroorzaakte een lichte troebeling in dit medium. Microscopisch waren vele bacillen aanwezig, die vaak iets fijner van vorm waren dan in bloedbouillon. Ketens en draden kwamen weinig voor.

c. R a u w e - a a r d a p p e l p e p t o n N a C l. 1% Pepton (Witte), $\frac{1}{2}$ % NaCl, aardappelcilinder.

Hc veroorzaakte in dit medium een niet duidelijk zichtbare troebeling. Microscopisch werden matig bacillen aangetroffen. Toch was *Hc* in passage voort te kweken. Na 3 overentingen waren kippen met een dergelijke cultuur te infecteeren.

d. R a u w e - a a r d a p p e l b o u i l l o n. Bloedbouillon, waaraan aardappelcilindrs werden toegevoegd.

Hierin groeide *Hc* zeer weelderig. Opvallend was het groot aantal ketens en draden, dat in het meerendeel der gevallen overwegend was (zie foto).

Werd in plaats van rauwe aardappel, verhitte aardappel (100° C., $\frac{1}{2}$ uur) toegevoegd, dan ontstond een weelderige groei; de bacillen waren echter vaak iets plomper.

3. VLOEIBAAR MEDIUM MET VERHIT BLOED.

Levinthalbouillon. 10% Bloedbouillon, gedurende 5 minuten gekookt, gefiltreerd door filtreerpapier en daarna door Berkefeld N.

Het bleek een goed medium voor *Hi*; *Hc* groeide hierin niet.

C. DE OPTIMUM PH.

Om de optimum Ph te bepalen van media voor *Hc* werd een systematisch onderzoek ingesteld. Voor *Hi* was de beste Ph 7,3—7,5 (WINSHELL, en STILLMAN 1919, BELL 1920, KNORR 1925 e.a.). De vraag was tevens of met een Ph-verandering van het medium een vormverandering van

Optimum Ph <i>Hc</i> .				
Begin Ph	Groeï na :			Eind Ph (na 3 dagen)
	1 dag	2 dagen	3 dagen	
6,6	—	±	±	6,9
6,8	±	+	+	6,9
7,0	±	+	++	7,2
7,2	±	+	++	7,2
7,4	+	++	++	7,4
7,6	±	+	++	7,4
7,8	±	+	++	7,6
8,0	—	+	+	7,7
8,2	—	±	+	8,1
8,4	—	±	+	8,3
8,6	—	—	±	8,5

- ++ : matig bacillen per gezichtsveld.
 + : weinig bacillen per gezichtsveld.
 ± : enkele bacillen per gezichtsveld.
 — : geen bacillen per gezichtsveld.

Hc samenging. REED en ORR 1923 verkregen bij een Ph 7,4 steeds een regelmatige vorm van *Hi*, terwijl bij afwijkende reactie, zoowel in zure als in alcalische richting, zich morphologische variaties voordeden, als lange draden, gezwollen en onregelmatige vormen.

De Ph werd bepaald in de bovenstaande vloeistof van bloedbouillon, gereed voor gebruik, met de comparator van Walpole-Michaelis. Dagelijks werden de geënte media microscopisch onderzocht, waarbij gelet werd op het aantal en de vorm van de bacillen. Na 3 dagen bebroeden werd weer de Ph in de bloedbouillon bepaald.

Uit de tabel blijkt:

1. dat de snelste vermeerdering van *Hc* plaats had in bloedbouillon van Ph 7,4;
2. dat over een gebied van Ph 7,0 tot 7,8 de maximum groei bereikt werd na drie dagen;
3. dat er neiging van de Ph was om te veranderen in de richting van Ph 7,4.

Het optimum van groei voor *Hc* werd dus verkregen bij de Ph 7,4. Tevens bleek *Hc* over een uitgebreid Ph-gebied tot vermeerdering in staat. Vormvariëaties als aangegeven werden door REED en ORR bij *Hi* werden niet waargenomen.

Steeds werden daarom de voedingsmedia van *Hc* gebracht op een Ph 7,4.

GROEIFACTOREN.

A. HISTORISCH OVERZICHT.

1. GROEIBEVORDERENDE FACTOREN.

Bij de ontdekking van *Hi* in 1892 verkreeg PFEIFFER alleen in de eerste generatie groei op 1½% suikeragar. Kweeken in passage was op dit medium onmogelijk. PFEIFFER veronderstelde, dat stoffen uit het op de agar gebrachte materiaal — bestaande uit sputum of longetter — voor de groei van *Hi* noodzakelijk waren. Een jaar later, in 1893, gelukte het PFEIFFER *Hi* in passage voort te kweeken op schuingestolde agar met op de oppervlakte een druppel steriel menschenbloed. Hij stelde vast, dat haemoglobine vermoedelijk het werkzame bestanddeel was, door gebruik te maken van een bijna zuivere oplossing van haemoglobine in aqua destillata met 0,6% NaCl. Deze oplossing werd verkregen door bevriezen en ontdooien of door schudden van roode bloedcellen in aqua destillata met aether, waarna de gehaemolyseerde roode bloedcellen werden gefiltreerd om het stroma terug te houden.

GRASSBERGER 1897 verkreeg het eerst „Riesenwachstum” van *Hi* rondom *Staphylococcus aureus* en *albus*. Er ontstond een zône van „Riesenkolonien” rondom de genoemde staphylococcen op vast bloedmedium. Hetzelfde nam MEUNIER 1898 waar en noemde het „Satellitisme culturel”. GRASSBERGER en MEUNIER verklaarden deze „symbiose” door aan te nemen, dat er een omzetting van de bloedkleurstof plaats vond, bewerkt door bacteriënproducten, waarna deze kleurstof beter geassimileerd kon worden door *Hi*.

Volgens GEHLEN 1923 gaven, behoudens enkele uitzonderingen (*Bac. pyocyaneus* en *Bac. subtilis*, WOLF), waar-

schijnlijk alle pathogene en niet pathogene microörganismen „Riesenwachstum”; *Hi*-zelf echter niet.

Volgens een tweede publicatie 1898 verkreeg GRASSBERGER op haematineagar met staphylococcen reuzenkoloniën. Haematineagar alleen was niet voldoende voor de groei van *Hi* (GHON en v. PREYS 1902).

De groeibevorderende bacteriën werden na het uitstrijken van *Hi* puntvormig uitgezet. ALLEN 1910 mengde deze in geschikte hoeveelheid met het vloeibare agarmedium; *Hi* werd op het medium uitgestreken.

CANTANI, GHON en v. PREYS (1900, 1902) vonden, dat gal van sommige personen zich gedroeg als haematine. Galpigment en galzure zouten gaven geen groei van *Hi*. Daar gal van verschillende personen varieerde in ijzergehalte, dachten zij, dat dit gehalte de oorzaak van het verschillend gedrag was.

GHON en v. PREYS stelden tevens vast, dat bloed respectievelijk haemoglobine alleen toegevoegd aan een wateragar, niet voldoende was voor *Hi*, maar dat nog een bestanddeel van bouillon of melk mede noodig was (LUERSEN 1903, THALAMER 1914, DAVIS 1917, OLSEN 1920, FILDÉS 1921, KOLLATH 1924, KNORR 1924).

CANTANI 1900 en NEISSER 1903 kweekten *Hi* op bloedvrije agar bij aanwezigheid van zgn. „Ammoniakolonien” (NEISSER), b.v. *Bac. xerosis* of staphylococcen. *Hi* werd met *Bac. xerosis* gemengd en op agar uitgestreken. Groei ontstond in mengkoloniën, die tot 20 generaties voortgekweekt werden. GHON en v. PREYS, PUTNAM en GAY herhaalden deze onderzoekingen en konden ze maar gedeeltelijk bevestigen. GHON en v. PREYS verkregen met stammen, die hen toegezonden waren door CANTANI, zoo nu en dan deze groei in mengkoloniën. Ze vonden tevens, dat bestrijken van de agar met cyaanijzer deze groei begunstigde. De groei van *Hi* beperkte zich tot en in de onmiddellijke omgeving van de „Ammoniakolonien”. Een verklaring van de

„Ammenwachstum” werd gegeven door KOLLATH 1925, die tevens de begrippen „Riesenwachstum” en „Ammenwachstum” precies definieerde. (Zie pag. 43).

LUERSEN 1903—1904 verkreeg groei van *Hi* op agar met bijmenging van gedoode *Bac. prodigiosis*-culturen. *Bac. prodigiosis* kon ijzer opnemen, maar dit was niet levensnoodzakelijk. Volgens hem werden de groeibevorderende stoffen voor *Hi* in de *prodigiosis*-lichamen gevormd, om eerst na de dood in de omgeving te diffundeeren.

DAVIS 1917 was de eerste die aantoonde, dat *Hi* voor zijn groei 2 gescheiden substanties — factoren — nodig had, de een aanwezig in haemoglobine of daarvan afgeleid, de andere aanwezig in de weefsels van verschillende planten en dieren. Laatstbedoelde substantie kon gevormd worden door de meeste bacteriënsoorten, behalve door *Hi*. Ze vertoonde overeenkomst met een vitamine. Het phenomeen van Grassberger zou ontstaan door diffundeeren van de vitamineachtige stof — die de omringende bacterie vormde — in haar omgeving, waar deze stof de groei van *Hi* zou stimuleeren. Hierbij werd dus niet meer in de eerste plaats gedacht aan een inwerking van bacteriënproducten op de bloedkleurstof (GRASSBERGER, MEUNIER).

De vitamineachtige stof was betrekkelijk thermolabiel; 30 minuten 120° C. inactiveerde haar. Ze passeerde Berkefeld. (DAVIS 1921).

AGULHON en LEGROUX 1918 wezen op een „substance active” voor *Hi* in waterige of alcoholische extracten van roode bloedcellen. AGULHON en MESNARD 1920 kenden aan de „substance active” geen voedende waarde als zoodanig toe. Ze vonden de substantie ook in geautolyseerde organen. Een scheiding in tweeën werd niet gemaakt en ze spraken van „hormones croissance” (groeihormonen).

OLSEN 1920 toonde aan, dat *Hi* zonder symbiose groeide bij aanwezigheid van haemoglobine, methaemoglobine en CO-haemoglobine. Bij aanwezigheid van haematine en hae-

mine, die beide eiwitvrij en ijzerhoudend zijn, werd groei van *Hi* alleen waargenomen in symbiose met andere bacteriën. IJzervrije haematoporphyrine gaf met en zonder symbiose geen groei. Hetzelfde gold voor haemocyanine, een koperin plaats van ijzerhoudend bloedpigment van lagere dieren (*Crustaceae*), verder ook voor bilirubine, chlorophyl en pyrrol. OLSEN constateerde een hand in hand gaan van guajac-hars-reactie en thermostabiele groeifactor van *Hi*. Hij vermoedde tenslotte, evenals PFEIFFER, in de ijzerhoudende component van haemoglobine en derivaten het werkzame agens en dacht daarbij aan de werking van oxydasen of katalytische werkingen met specifieke natuur van andere soort. De globinefractie van haemoglobine zou overeenkomen met de vitamineachtige substantie (DAVIS) en zou de reuzenkoloniën geven.

OLSEN toonde dus het belang aan van de ijzerhoudende component in haemoglobine en derivaten voor *Hi*. Tevens maakte hij voor het eerst gebruik van de guajac-hars-reactie en deed daardoor een katalytische functie van het ijzer vermoeden.

TOKUNAGA 1920 schreef de groeibevorderende eigenschappen van bloed toe aan de globinefractie van haemoglobine. In het licht van de nieuwere opvattingen omtrent groeifactoren moeten deze onderzoeken echter anders worden uitgelegd.

THJÖTTA 1921 kon met slijmvormende bacteriën — *Bact. friedlander*, *Bac. ozaena* — in bouillon *Hi* in een bepaald aantal generaties voortkweken. 1 Uur 70° C. verhitting van deze bacteriën verhinderde hun groeibevorderende werking niet. Kookextracten — door centrifugeeren van bacteriënlichamen bevrijd — waren ook werkzaam. De groeibevorderende stoffen diffundeerden dus uit de bacteriënlichamen. Ook *proteus*-extracten waren werkzaam, de kapselbacteriën gaven echter betere groei. Daar door het werk van TOENIESSEN bekend was, dat de kapsels rijk waren aan een polysac-

charide nl. galacton, werden aan *proteus*-extracten verschillende suikeroplossingen toegevoegd en hiermee werd goede groei van *Hi* verkregen. Dextrose werd hierbij rood, de andere suikers bleven onveranderd. De bacteriënextracten passeerden Berkefeld N, zonder hun werkzaamheid te verliezen.

THJÖTTA en AVERY 1921 publiceerden systematische onderzoeken over de groeifactoren van *Hi*. De tweeledigheid der groeifactoren, waarop DAVIS reeds wees, werd onomstootelijk aangetoond.

Begrip X - en V factor. In bouillon, waaraan gistextract werd toegevoegd, geënt met een inoculum¹⁾ van cultuur in vloeibaar bloedmedium, groeide *Hi*. Kweeken in passage was in dit gistextract-bouillonmedium niet mogelijk. THJÖTTA en AVERY besloten hieruit, dat met het genoemde inoculum een onbekende factor overgeënt was en noemden die X factor.

Bouillon, geënt met een inoculum van een cultuur in een vloeibaar bloedmedium, gaf geen groei van *Hi*. In gistextract was dus een tweede factor aanwezig, die voor de groei van *Hi* noodzakelijk was. Deze factor had overeenkomst met de vitamineachtige factor van Davis. Zij noemden deze factor V factor.

Beide factoren hadden een zelfstandig karakter en waren onafhankelijk van elkaar.

De X factor kwam voor in bloed, vooral in bloedcellen; ook kwamen geringe hoeveelheden voor in bloedserum, waarschijnlijk door diffundeeren vanuit de bloedcellen. Kristalhaemoglobine kon als X factor fungeren. De X factor was verbonden met haemoglobine en derivaten en gelijk aan de thermostabiele factor van Davis. Tevens waren banaan en aardappel X factorhoudend.

De V factor kwam voor in bloed, hoofdzakelijk in bloed-

¹⁾ Inoculum: het materiaal waarmede een voedingsbodem geënt wordt.

cellen. Serum als zoodanig kon niet als V factor dienen. De V factor was ook aanwezig in gist, tomaten, erwten en boonen of hun extracten. Aardappel en banaan waren ook V factorhoudend.

Voor *Hi* waren beide factoren levensnoodzakelijk. Hierbij was het van geen beteekenis of X- en V factor uit verschillende bronnen betrokken werden.

De X factor was thermostabiel. Na een verhitting van 30 minuten op 120° C. kon zij nog als zoodanig dienen. De V factor was na een verhitting van 30 minuten op 120° C. vernietigd en daarom thermolabiel.

Beide factoren werkten nog in groote verdunning en juist daardoor bleek hun accessoir, in tegenstelling van voedend, karakter. Kristalhaemoglobine in de verdunning 1 : 2.000.000 kon nog als X factor fungeeren. Extracten van gist, tomaten, erwten en boonen, in verdunning 1 : 1000 waren nog als V factor werkzaam.

Carbo animale absorbeerde X- en V factor, maar vooral de X factor. Deze absorptie gebeurde vlugger onder invloed van warmte (37° C.) en was afhankelijk van de hoeveelheid kool, de X factor-concentratie en de tijd van inwerking.

De X factor uit bloed, evenals benzidine- en guajac-harsreacties gevende substanties in bloed, vertoonden een merkwaardige resistentie t.o.v. verhitting en gingen hierin parallel.

Ook aardappel gaf blauwkleuring van het benzidine-reagens. Een uitzondering vormden bananen, die X- en V factor bevatten, maar negatieve peroxydase-reacties gaven.

Nadat DAVIS reeds met plantenweefsel op vaste media reuzengroei van *Hi* had verkregen, toonden THJÖTTA en AVERY de onafhankelijkheid van *Hi* t.o.v. bloed aan bij aanwezigheid van aardappel of banaan. In een fosfaatbuffermengsel (Ph 7,5) was aardappel alleen voldoende voor *Hi*. Naast de levensfactoren konden de *Hi*-bacillen hun

voedingsstoffen uit dit medium putten, geheel onafhankelijk van stoffen van dierlijke oorsprong.

RIVERS en POOLE 1921 gebruikten gefiltreerd gistextract als V factor en in de autoclaaf verhit bloed als X factor.

Onafhankelijk van THJÖTTA en AVERY toonde FILDES 1921 de tweeledigheid der groeibevorderende factoren van *Hi* in bloed aan. Bij de bereiding van zijn „peptic digest” precipiteerde de haematine soms geheel, waarschijnlijk doordat het mengsel te zuur werd gelaten. Precipitaat en bovenstaande vloeistof waren tezamen noodig om de groei van *Hi* te verkrijgen.

In 1923 gaf FILDES een eenvoudige methode aan om bacteriën te determineeren naar hun behoefte aan X- en V factor.

Als basismedium gebruikte hij 1½% bacto-peptonwater, waarin geen V factor aanwezig was, als X factor een haematineoplossing en als V factor gistextract volgens Thjötta en Avery, gefiltreerd door Berkefeld N om sporen X factor weg te nemen, die geadsorbeerd waren aan gesuspendeerde gistpartikeltjes. Door toevoeging van haematine of gistextract, of van beide, aan het bacto-peptonwater was uit te maken welke factoren noodig waren.

Hierbij diende het inoculum verkregen te zijn van een cultuur in een medium, dat een minimum van bloedpigment bevatte. Tevens moest die cultuur jong zijn om adsorptie van de haematine door de bacteriën tot een minimum te beperken. De geënte hoeveelheid moest zoo klein mogelijk zijn.

Hij deed tevens duidelijk uitkomen, dat het phenomeen van Grassberger op rekening geschoven moest worden van de V factor-productie door de centrum-bacteriën. Haematineagar als zoodanig gaf geen groei, haematineagar + gistextract of + centrum-bacteriën gaven wel groei van *Hi*, waaruit moest worden besloten, dat gistextract en de omringende bacteriën dezelfde functie hadden ten opzichte van *Hi*.

KNORR en GEHLEN 1925 verkregen met nieuwe aardappels betere resultaten dan met oude. Door lange tijd drogen werd de V factor in aardappel vernietigd. Toevoeging van citroensap (V factorhoudend) maakte gedroogde aardappels weer geschikt. Bananen, benzidine-negatief buitenste en benzidine-positief binnenste vleesch van kokosnoten, kokosmelk, gele wortelen en mangelwortelen waren X- en V factorhoudend.

KNORR 1924 stelde de filtreerbaarheid van X- zoowel als van V factor in opgeloste toestand vast. Cultuurfiltraten van *Bac. coli* bevatten V factor.

KOLLATH 1924, 1925, kookte aardappel gedurende 5 minuten met water. De bovenstaande vloeistof was V factorhoudend, bevatte geen X factor. In het filtraat van de vloeistof was de V factor behouden (Berkefeld).

Met kolloïdaal opgelost ijzer (Ferrum oxydatum ammoniatum 1 : 1000) en met kaliumferrocyanide, geactiveerd door ultraviolette stralen (1926), gevoegd bij agar, verkreeg hij de door NEISSER beschreven vorm van „Ammenwachstum” indien *Bac. faecalis alcaligenes* of een lucht-coccus dienst deden als „Ammen”. Zonder „Ammen” verkreeg hij geen groei. „Ammenbacterien” moesten het ijzer geschikt maken en veranderen in een vorm, die in samenstelling met de X factor overeenkwam. Voor groei van *Hi* moesten de „Ammenbacterien” tevens geringe hoeveelheid V factor produceeren, tenzij deze, uit andere bron verkregen, toegevoegd was. De door de bacteriën gevormde X substantie diffundeerde maar weinig in de omgeving. De groei van *Hi* bleef grootendeels beperkt tot binnen de „Ammenkolonien”. Hier waren de bacteriën niet willekeurig door elkaar gemengd, maar er vormden zich *Hi*-koloniën in de „Ammenkolonien”.

Gebaseerd op dit onderzoek maakte KOLLATH een strenge scheiding tusschen de „Riesenwachstum” van Grassberger en de „Ammenwachstum” van Neisser. Terwijl de eerste

gekaracteriseerd was door de V factor-productie en aanwezigheid van de X factor noodzakelijk was, bestond de tweede in de vorming van de X factor en gelijktijdige productie van de V factor, tenzij deze laatste uit andere bron voorhanden was.

Op een „Hungernährboden”, bestaande uit wateragar met voldoende X- en V factor, zou volgens KOLLATH *Hi* in staat zijn de derde noodige voedende substantie te betrekken uit zijn doode soortgenooten. Hij noemde dit vermogen van *Hi* „Kannibalismus” en voerde er voor aan, dat *Hi* op de „Hungernährboden” alleen groeide nabij plaatsen van opgebracht materiaal. Ook KNORR deelde deze opvatting. Op wateragar met sporen X factor verkreeg hij slechts groei in mengkoloniën met andere bacteriën. Als derde voedende substantie zouden vervalproducten van de „Ammenbacterien” gebruikt worden, die slechts weinig in de omgeving diffundeerden.

Door aan te nemen, dat de agar van NEISSER en CANTANI met toevallige hoeveelheden ijzerverbindingen verontreinigd was, verklaarde KOLLATH hun positieve resultaten met „Ammenbacterien”, terwijl anderen, die hun onderzoeken herhaalden en met agar gewerkt zouden hebben, waarin geen geschikte ijzerverbindingen voorkwamen, hierdoor negatieve resultaten verkregen. GHON en v. PREYS merkten ook reeds op, dat cyaanijzer de „Ammenwachstum” begunstigde.

Merkwaardig was echter, dat KOLLATH geen groei verkreeg van *Hi* op agar, waaraan Friedlanderbacteriënemulsie was toegevoegd, dit in tegenstelling met CANTANI, GHON, en v. PREYS, alsmede WOLF, die op vaste en THJÖTTA en TINTI, die in vloeibare media zonder groeifactoren met Friedlanderbacteriën wel groei van *Hi* verkregen.

KOLLATH deed zijn proeven met gecontroleerd ijzervrije agar en voegde slechts één ijzerverbinding toe. Mogelijk is:

1. dat de Friedlanderbacteriën andere ijzerverbindingen noodig hebben om X factor te vormen en
 2. dat deze ijzerverbindingen aanwezig waren in de media, die door de andere onderzoekers gebezigd waren.
- KOLLATH gaf aan, dat bijna iedere agar ijzerhoudend was als niet bijzondere voorzorgsmaatregelen genomen werden (ijzer afkomstig van gebezigd glaswerk, enz.).

Juist dit denkbare ijzerverschil — aannemende, dat het ijzer voor de X factorvorming die beteekenis heeft, als KOLLATH aangaf — zou het mogelijk kunnen maken vele andere tot nu toe onverklaarbare onderzoekingen te doen begrijpen. Hiertoe zijn te rekenen o.a. de onderzoekingen van WILLIAMS en POVITSKY, alsmede die van KALKBRENNER.

WILLIAMS en POVITSKY 1921 verkregen in symbiose met diphteriebacillen goede groei van *Hi* op agar. Tarwebloemagar — die zeker bloedvrij was — met diphteriebacillen, gaf eveneens groei van *Hi* in mengkoloniën, meestal 2—7 generaties, soms echter tot 20 generaties. Met andere tarwebloem werd geen groei van *Hi* verkregen.

KALKBRENNER 1921 kon ijzer niet uitsluiten in diphteriebacillen, die op peptonagar — zonder bouillon — als „Ammenbacterien” konden fungeren. De diphteriebacillen bevatten geringe maar duidelijk aan te toonen hoeveelheden ijzer, evenals de peptonagar.

De capaciteiten van „Ammenbacterien” zouden dan ook een rol spelen als verschillende bacteriënsoorten verschillende ijzerverbindingen noodig hadden om X factor te vormen.

In een volgende publicatie 1925 behandelde KOLLATH o.a. de beteekenis van de X factor voor de groei van *Hi*.

Als reactie op ijzer gebruikte KOLLATH rhodaanammonium (op 3-waardig ijzer). De te onderzoeken massa werd een weinig zuur gemaakt door enkele druppels 5% HCl. Om de roode kleurstof te concentreeren werd deze met een wei-

nig aether uitgeschud. Deze reactie was gevoeliger dan de reactie met Berlijnsch-blauw en kon sporen 3-waardig ijzer aantoonen. Hiermede stelde hij vast, dat bijna iedere agar ijzerhoudend was.

De als „Ammenbacterien” bekende bacteriën, *Bac. xerosis*, staphylococcen en de aangewende luchtcoccus, gewaschen, verascht, gemengd met water en zuur gemaakt door HCl, hadden positieve ijzerreactie. *Bac. typhi*, *Bac. flexner*, *Bac. shiga* enz. gaven geen ijzerreactie. De veronderstelling, dat de „Ammenbacterien” bij het geschikt maken van het ijzer voor X factor dit opnamen, was dus gegrond, temeer daar, naast de mogelijkheid het ijzer op te nemen, het onwaarschijnlijk was, dat de X factorvorming zou ontstaan door een werking op afstand.

Hi-bacillen, gewaschen, verascht, opgenomen in water en zuur gemaakt door HCl, hadden een positieve ijzerreactie. *Hi* gebruikte voor de opbouw van zijn lichaam dus ijzer. Daar *Hi* ijzerhoudend was en de X factor ook steeds als ijzerhoudend beschreven werd, lag het voor de hand, dat KOLLATH het oude standpunt van PFEIFFER — dat ijzer in een of andere vorm (volgens KOLLATH overeenkomende met de X factor) noodig was voor de stofwisseling van *Hi* — weer naar voren bracht.

Hiermede werd afgestapt van de sedert OLSEN gehuldigde meening omtrent de katalytische werking van het ijzer, tenzij een combinatie mogelijk is, waarbij dan het ijzer door *Hi* opgenomen moet worden om genoemde katalytische werking te kunnen uitoefenen.

Opgemerkt dient nog te worden, dat de onderzoekingen van KOLLATH omtrent ijzerhoudendheid, voor zoover het negatieve resultaten betreft, slechts een betrekkelijke waarde vertegenwoordigen, daar alleen gelet werd op 3-waardig ijzer. Ook de gecontroleerd ijzervrije agar was slechts onderzocht door verkoelde monsters hiervan te laten reageren met rhodaan ammonium zonder dat hierbij eerst al het eventueel aanwezige ijzer tot ferri werd geoxydeerd.

Nu we weten, dat de X factor in groote verdunningen werkzaam is — en de theorie van KOLLATH aannemende — is zeker een gevoelige reactie noodig om ijzer in dergelijke verdunningen aan te toonen. Hieruit is te concludeeren:

1. dat bij onderzoekingen, het ijzer van de X factor betreffende, voorafgaande nauwkeurige onderzoekingen over de gevoeligheid van de toegepaste reactie gewenscht waren geweest;
2. dat onderzoekingen omtrent ijzerhoudendheid van „Ammenbacterien” met niet gevoelige reacties van weinig belang zijn geweest. De reactie met Berlijnsch-blauw is niet gevoelig genoeg om hoeveelheden ijzer, ais noodig zijn in de vorm van X factor voor *Hi*, aan te toonen. KOLLATH gaf aan, dat met zijn ijzerreactie sporen 3-waardig ijzer werden aangetoond. De verdunning van de ijzeroplossing, die nog een positieve reactie gaf, werd echter niet aangegeven.

KOPP 1927 verkreeg goede groei van *Hi* onder anaërobe omstandigheden. Onder anaërobe omstandigheden was de X factor niet noodzakelijk, wel de V factor. Hieruit concludeerde hij, dat *Hi* obligaata-anaëroob was en de X factor de taak had de voor *Hi* schadelijke zuurstof op een of andere manier onschadelijk te maken.

EIRUND 1929 bevestigde de onderzoekingen van KOPP. Hij onderzocht een groot aantal stammen en kwam tot de conclusie, dat vele *Hi*-stammen geen X factor noodig hadden onder anaërobe omstandigheden.

MEYER 1934 toonde aan, dat bijnierschors — waarvan bekend is, dat het groote hoeveelheden vitamine C bevat — niet als V factor kon dienen. Dit was in strijd met verschillende onderzoekers, die erop wezen, dat de eigenschappen en het voorkomen van de V factor overeenkwamen met die van vitamine C (KNORR e.a.). Ook kon MEYER het zuivere vitamine C, het ascorbine zuur (A. VON SZENT-GYÖRGYI) niet als V factor gebruiken.

2. GROEIREMMENDE FACTOREN.

a. In serum.

Reeds v. NESTLINGER 1918 en DAVIS 1921 wezen op een remmende werking van versch serum en ascitesvloeistof bij de groei van haemophile bacillen. DAVIS stelde vast, dat versch bloedserum het satellitisme belemmerde.

TERADA 1922 beschreef een fermentachtige werking van serum op gehaemolyseerde roode bloedcellen, waardoor de groei van *Hi* hiermee onmogelijk werd. Hij nam hierbij geen notitie van de dubbele natuur der groeifactoren. De meeste proeven deed hij met paardenserum. Enkele proeven met konijnen- en caviaeserum gaven dezelfde resultaten.

KNORR 1924 stelde vast, dat deze fermentatieve werking van versch serum de V factor vernietigde. Schapen-, konijnen-, caviae-, paarden- en rattenserum vormden een serie van verminderde activiteit in dit opzicht. Serum van mensen, duiven en katten had geen vernietigende werking. Het was van geen betekenis uit welke bron de V factor betrokken werd.

MEYER 1934 verkreeg met menschen- en duivenserum geen, met paardenserum veelal geen remmende werking, met konijnen-, runder-, schapen-, varkens- en soms met paardenserum gering remmende werking.

b. In roode bloedcellen.

MEYER 1934 toonde een remmende werking aan in het stroma van bloedcellen. Dit stroma werd uit een gehaemolyseerde oplossing van gewasschen bloedlichaampjes verkregen door centrifugeeren. Daarna werd het meermalen gewasschen. De bloedlichaampjes waren gehaemolyseerd in aqua destillata en om de afscheiding te bevorderen werd de gehaemolyseerde oplossing aan bloed isotonisch gemaakt door 1,7% NaCl-oplossing.

Deze remmende werking was gericht tegen de V factor. *Bac. parainfluenzae*, *Bacillus „X”* en *Hi* (die alle V factor noodig hebben) werden geremd, *Bac. haemoglobinophilus*

canis (die alleen X factor noodig heeft) werd niet geremd.

Hij toonde duidelijk aan, dat de remmende werking van het stroma veroorzaakt werd door een ferment, waarvan de werking waarschijnlijk berustte op een oxydatie van de V factor.

De inactivering van de V factor ging langzaam en eerst na dagen bereikte ze haar einde. Onbepaalde hoeveelheden V factor konden geïnactiveerd worden. Dit proces voltrok zich vlugger bij 37° C. Ook V factor van plantaardige oorsprong werd geïnactiveerd.

Het inactiverend ferment werd vernietigd door alcohol en door verhitting op 70° C. gedurende 15 minuten (zoo goed als geheel); door verhitting op 56° C. gedurende 1 uur werd het niet vernietigd, zijn werkzaamheid werd daardoor niet verminderd. Voorts was het ferment vast verbonden met het stroma; van de structuur van het stroma bleek het evenwel onafhankelijk, aangezien dit, opgelost in 1% natrium-desoxycholaat, nog volkomen werkzaam was.

Stroma van runderen, schapen, varkens, menschen, konijnen en caviae vormde een serie van verminderde activiteit in dit opzicht. Paarden- en duivenstroma was onwerkzaam. Als paardenbloed werkzaam was kwam dit door het serum.

3. FUNCTIE DER GROEIBEVORDERENDE FACTOREN.

Volgens OLSEN berustte de functie van haemoglobine en derivaten op een katalytische werking. Hij constateerde een hand in hand gaan van de peroxydase-reacties (benzidine- en guajac-hars-reactie) en het groeibevorderend vermogen van haemoglobine en derivaten.

Deze peroxydase-reacties berusten op een overgang van zuurstof van een peroxyde (H_2O_2) naar benzidine of guajac-hars bij aanwezigheid van een peroxyde, waardoor benzidine respectievelijk guajac-hars tot gekleurde verbinding geoxydeerd wordt.

THJÖTTA en AVERY vonden, dat peroxydase-reacties gevende substanties in bloed, evenals de X factor in bloed, een merkwaardige resistentie tegen hitte hadden. Aardappel (X factorhoudend) gaf ook een positieve benzidine-reactie. Bananen, die X factor bevatten, gaven geen peroxydase-reactie.

FILDES vond een parallellisme tusschen het optreden van peroxydase-reacties en de aanwezigheid van X factor in aardappel. Hij veronderstelde, dat de functie van de X factor in bloed en plantenweefsel op dezelfde katalytische werking berustte.

KNORR en GEHLEN verkregen niet alleen met bananen, maar ook met kokosvleesch negatieve benzidine-reactie. Zij stelden tevens vast, dat het moeilijk was uit het ontbreken van peroxydase-reacties — zoowel in bloed (2) als in plantenweefsel (1) — tot afwezigheid van peroxydase te besluiten.

1. In bananen was volgens GRIEBEL — al naar hun rijpingstoestand — opgeloste of onopgeloste looistof aanwezig. Looistoffen zouden nu reeds in sporen de peroxydeverming verhinderen.
2. KNORR en GEHLEN gebruikten als benzidine-reagens een verzadigde oplossing van benzidine in ijsazijn, die voor de reactie vermengd werd met 3% H_2O_2 -oplossing in verhouding 1 : 5. 1 cc. Reagens werd gevoegd bij 6—8 cc. te onderzoeken oplossing. Haemoglobine, opgelost in aqua destillata, gaf hiermee nog een positieve reactie in verdunning 1 : 500.000. De reactie verloor haar gevoeligheid door verhitten van de haemoglobine of door toevoegen van andere stoffen b.v. NaCl 0,6%. In de gebruikelijke pepton-bouillonagar was de reactie weinig gevoelig en alleen positief met haemoglobine in verdunning 1 : 40.000. Negatieve peroxydase-reactie was hier dus geen bewijs voor afwezigheid van haemoglobine.

Hi was veel gevoeliger voor haemoglobine en groeide

nog in verdunning 1 : 2.000.000 (THJÖTTA en AVERY) bij aanwezigheid van voldoende V factor.

Groei van *Hi* vormde een gevoeliger reactie voor het aantoonen van bloed dan de peroxydase-reacties (KNORR en GEHLEN, KOLLATH, FILDES).

Ook aardappel, die door verhitting geen peroxydase-reacties meer gaf, gaf nog groei van *Hi*. FILDES besloot hieruit, dat groei van *Hi* een gevoeliger reactie was voor het aantoonen van de X factor dan de peroxydase-reacties.

Stoffen, die niet als X factor kunnen fungeren, kunnen ook positieve peroxydase-reacties hebben. Naast bloed en plantenweefsel is uit de medische praktijk bekend, dat ijzervitriool, ijzerroest, stijfsel, caseïne, melk, etter, ijzerchloride en KMnO_4 een positieve benzidine-reactie hebben. Bij ijzerchloride en KMnO_4 trad zelfs blauwkleuring op zonder H_2O_2 (PUPPE). Ook haemocyanine — de koperhoudende bloedkleurstof van lagere dieren — heeft een positieve benzidine-reactie, doch kon niet als X factor fungeren.

S a m e n v a t t i n g: Als deze peroxydase-theorie juist is, is *Hi* niet in staat zuurstof van de atmosfeer te gebruiken, maar heeft ze gebonden zuurstof nodig, die verkregen wordt met behulp van een peroxydase (X factor). Zijn de bevindingen van KOLLATH juist, dan moet het ijzer (X factor) opgenomen worden door *Hi* om de gebonden zuurstof uit zijn omgeving vrij te maken.

Bij een ruimere opvatting van de peroxydase-theorie behoudt *Hi* het vermogen om zuurstof van de atmosfeer te gebruiken, maar is hierbij de hulp nodig van een katalysator (X factor). Die katalysator zou daarbij moeten werken als ijzerchloride en niet als haemoglobine bij de benzidine-reactie. Beter nog zou dan zijn werking vergeleken kunnen worden met die van het ademhalingsferment (een haemine) van Otto Warburg, waarbij de zuurstof zich tegen het ijzer — dat gebonden is aan het pyrrolcomplex — legt tot een peroxyde en dan geactiveerd wordt.

Onder anaërobe omstandigheden treedt de vrije zuurstof op de achtergrond en zou een daarvoor dienende katalysator eventueel gemist kunnen worden. Hierdoor zou dan ook een andere verklaring gegeven zijn aan de onderzoeken van KOPP, die de afwijkende meening openbaar maakte, dat de X factor alleen noodig was onder aërobe omstandigheden om de voor *Hi* schadelijke zuurstof te binden. Hoe dan echter bij die anaërobe omstandigheden de energievoorziening van *Hi* zou zijn, laat zich moeilijk beoordeelen.

Bovenstaande uiteenzetting had betrekking op de X factor. Omtrent de functie van de V factor is nog weinig bekend en een bespreking van die functie zou daarom geen zin hebben. Er kan volstaan worden met erop te wijzen, dat de V factor als een vitamineachtige stof wordt beschouwd of als een voedingsbestanddeel met accessoir karakter.

4. SAMENVATTING.

De X- en V factor zijn voor *Hi* levensnoodzakelijk. Daarnaast is een derde nl. een voedende substantie noodig, die niet van dierlijke oorsprong behoeft te zijn. Ook weefsel van plantaardige oorsprong kan er voor dienen. Waarschijnlijk moet de derde substantie wel van organische natuur zijn.

De X factor is waarschijnlijk ijzerhoudend, werkt in groote verdunning (1 : 2.000.000), misschien als katalysator.

Hij is aanwezig in bloed, haemoglobine en ijzerhoudende derivaten, zoo ook in vele plantenweefsels (aardappel, banaan). Hij kan waarschijnlijk gevormd worden uit bepaalde ijzerverbindingen door geschikte bacteriënsoorten.

Hij is — vooral in bloed, waarschijnlijk minder in aardappel — thermostabiel.

Hij is filtreerbaar en wordt geadsorbeerd door fijn verdeelde stof als carbo animale.

De V factor heeft een vitamineachtige natuur en werkt in minder groote verdunningen dan de X factor (1 : 1000).

Hij is aanwezig in bloed — vooral in bloedcellen — en in bijna alle plantenweefsels en hun extracten. Hij wordt gevormd door bijna alle pathogene en apathogene kiemen, behalve door de V factor noodig hebbende bacteriën.

Hij is betrekkelijk thermolabiel (na 20 minuten 120° C. vernietigd; nog aanwezig na 10 minuten 100° C.).

Hij is filtreerbaar, wordt weinig geadsorbeerd door carbo animale en diffundeert gemakkelijk vanuit aardappel in water.

Hij wordt vernietigd door fermenten uit bloed (oxydatieve?).

De X- en V factor hebben een zelfstandig karakter en zijn onafhankelijk van elkaar.

Eigenschap:	X factor	V factor	Derde substantie
Functie	katalysator ?	vitamine ?	voedend.
Aanwezig in	bloed, haemoglobine en ijzerhoudende derivaten, aardappel, banaan.	bloed, vooral in roode bloedcellen, bijna alle plantenweefsels en hun extracten.	bouillon, pepton, plantenweefsel, bacteriën ?
Gevormd door	geschikte bacteriën uit bepaalde ijzerverbindingen ?	bijna alle bacteriën.	— — —
Temperatuur	thermostabiel 120° C.	betrekkelijk thermolabiel.	— — —
Samenstelling	ijzerhoudend ?	proteïne natuur ??	organische ?
Filtreerbaarheid	positief.	positief.	— — —
Adsorptie door carbo animale	volkomen.	weinig.	— — —

B. EIGEN ONDERZOEK.

Onderzocht werden:

1. de behoefte aan groeifactoren van *Hi* en *Hc*;
2. de eigenschappen en het voorkomen van die groeifactoren.

1. BEHOEFTE AAN X- EN V FACTOR.

Bij dit onderzoek naar de behoefte aan X- en V factor werd de methode van FILDÉS gevolgd. Als basismedium werd gebruikt 10 cc. peptonNaCl, waarin 1% pepton (Witte) en $\frac{1}{2}\%$ NaCl, Ph 7,4.

X factor. Deze bestond uit een 1%-oplossing van haematine (Merck) in aqua destillata. Hiertoe werd de haematine opgelost in een minimum van NaOH, daarna aangevuld met aqua destillata tot de gewenschte 1%-oplossing.

Om een heldere oplossing te houden werd slechts een geringe — evenwel voldoende — hoeveelheid X factor toegevoegd, nl. 0,025 cc. van de 1%-haematineoplossing bij 10 cc. basismedium. Hier was dus de haematine aanwezig in een verdunning 1 : 40.000 en de geringste troebeling van dit medium kon afgelezen worden. De gering alkalische haematineoplossing veranderde de Ph 7,4 zelfs niet met 0,1.

V factor. Hiervoor werd gebruikt gistextract volgens Thjötta en Avery.

100 Gr. brouwersgist werd geëmulgeerd in 400 gr. aqua destillata, gebracht op Ph 7,6 en gedurende 10 minuten boven de vlam gekookt. Daarna werd het in de ijskast bewaard, waardoor de gistcellen gelegenheid kregen om uit te zakken.

Voor het gebruik werd de bovenstaande vloeistof gefiltreerd door Chamberland L₃ om sporen X factor, die aan gistpartikeltjes geadsorbeerd zijn, er uit te verwijderen. Deze filtratie geschiedde tevens om grotere zekerheid te hebben voor steriliteit.

Aan 10 cc. basismedium werden toegevoegd X factor, V factor ($\frac{1}{2}$ cc. gistextract) of beide.

Inoculum. Voor *Hi* moest uit een cultuur in een medium, dat minimale hoeveelheden bloed bevatte, geënt worden. Dit medium bestond uit 1 öse van 4 mm.³ 10% bloedbouillon op 10 cc. bouillon + $\frac{1}{2}$ cc. gistextract. De bloedverdunding van dit medium was dus 1 : 25.000. 1 Öse van dit medium veranderde practisch niets aan de X factor-concentratie van de daarmee geënte media.

In dit medium van 1 : 25.000 bloedbouillon + gistextract groeide *Hc* niet meer.

Het inoculum voor *Hc* bestond daarom uit een minimale hoeveelheid van een öse 10% bloedbouilloncultuur, die geen zichtbare troebeling van de hiermee geënte media gaf. Vloeibare media met voldoende groeifactoren voor *Hc* gaven met dit inoculum steeds positieve groei.

Bij verdere proeven werd voor *Hi* steeds het hierboven daarvoor aangegeven minimale bloedmedium als uitgangsmedium gebruikt, terwijl voor *Hc* steeds — tenzij anders vermeld — werd uitgegaan van de in de vorige alinea vermelde minimale hoeveelheid bloedbouilloncultuur.

Steeds werd een öse van 4 mm.³ gebruikt.

Proefmedium	7 <i>Hi</i> -stammen	7 <i>Hc</i> -stammen
Basismedium	—	—
Basismedium + X factor . . .	—	—
Basismedium + V factor . . .	—	—
Basismedium + X- en V factor .	+	—

+ : geen groei.
— : groei.

De groei werd afgelezen door: 1. microscopisch onder-

zoek, 2. bepaling van troebelheid en 3. subcultuur op chocoladeagar. Op serumagar mocht nooit groei optreden.

Om de invloed van mogelijke adsorptie van X- en V factor (FILDES, KNORR) door geënte *Hi* te elimineeren, werd *Hi* in het basismedium met X- en V factor tot 6 passages voortgekweekt, waarbij steeds hetzelfde resultaat.

Met grootere hoeveelheden X factor en met als basismedium bouillon werd eveneens geen groei van *Hc* verkregen.

Conclusie: X- en V factor zijn vereischt voor *Hi*. *Hc* stelt andere eischen.

2. GROEIFACTOREN IN AARDAPPEL.

Zoowel *Hi* als *Hc* konden uit aardappel hun levensnoodzakelijke groeifactoren putten. De toevoeging van bloed was hiervoor niet noodzakelijk. In bouillon met steriele stukjes rauwe aardappel kon *Hc* in passage voortgekweekt worden.

Getracht werd met behulp van aardappel iets te achterhalen van de bijzondere eischen, die *Hc* stelt.

De techniek voor het winnen van steriele stukjes rauwe aardappel werd op blz. 32 beschreven.

a. Temperatuurspreeven.

Proef I: Gedrag van de groeifactoren in aardappel ten opzichte van de temperatuur 100° C.

De opzet van deze proef bestond uit 2 gelijke groepen, elk van 4 rijen buisjes.

Rij 1: Buisjes met steriele stukjes rauwe aardappel in bouillon, verschillende tijden verhit bij 100° C.

Rij 2: Hiervoor werden steriele stukjes rauwe aardappel in 2 cc. aqua destillata verschillende tijden verhit bij 100° C. en daarna gedaan in buisjes met bouillon.

Rij 3: De overgebleven aqua destillata uit rij 2, gevoegd bij buisjes bouillon, vormde de derde rij.

Rij 4: Ter vergelijking werden buisjes met 10% bloedbouillon eveneens verschillende tijden verhit op 100° C.

De buisjes van een dezer groepen werden geënt met *Hc*, de andere met *Hi*. De groei van *Hi* en *Hc* werd vastgelegd in onderstaande tabel. De beoordeeling van de groei in de buisjes geschiedde door: 1. microscopisch onderzoek, 2. bepaling van troebelheid en 3. subcultuur op chocoladeagar. Tevens werd als contrôle op reinheid uit alle gegroeide buisjes geënt op serumagar.

Verhitting	Groei van <i>Hc</i> in				Groei van <i>Hi</i> in	
	Rij 1	Rij 2	Rij 3	Rij 4	Rij 1, 2 en 4	Rij 3
0 Minuten 100° C.	++	++	-	++	+++	-
2 Minuten 100° C.	+	+	-	+	+++	-
4 Minuten 100° C.	±	-	-	+	+++	-
6 Minuten 100° C.	±	-	-	±	+++	-
8 Minuten 100° C.	-	-	-	±	+++	-
10 Minuten 100° C.	-	-	-	-	+++	-
12 Minuten 100° C.	-	-	-	-	+++	-
14 Minuten 100° C.	-	-	-	-	+++	-
16 Minuten 100° C.	-	-	-	-	+++	-
18 Minuten 100° C.	-	-	-	-	+++	-
20 Minuten 100° C.	-	-	-	-	+++	-

+++ : goede groei van *Hi*, die steeds veel rijker was dan die van *Hc* (veel bacillen, sterke troebeling, veel koloniën).

++ : goede groei van *Hc* (matig bacillen per gezichtsveld, duidelijke troebeling, matig koloniën).

+ : matige groei van *Hc* (weinig bacillen per gezichtsveld, geringe troebeling, weinig koloniën).

± : minimale groei van *Hc* (enkele bacillen per gezichtsveld, juist zichtbare troebeling, enkele koloniën).

- : geen groei (geen bacillen, geen troebeling, geen koloniën).

In de eerste rij buisjes was door verhitting van aardappel in bouillon troebeling ontstaan. De tweede rij buisjes was ongeënt volkomen helder. In de eerste rij buisjes geschiedde de beoordeeling der troebelheid door vergelijking met ongeënte buisjes. De derde rij was als contrôle bedoeld voor rij 2. Ze gaf aan, dat het uitblijven van de groei in rij 2, wat betreft *Hc*, bij langere verhitting niet te wijten was aan het overgaan van de groeifactoren in de omgeving. Toevoeging van haematine + gistextract bij rij 3 gaf ook geen groei van *Hc*. In verhitte bloedbouillon was de troebeling niet te beoordeelen.

Uit de tabel blijkt, dat *Hc* minder goed groeide bij aardappel met hogere verhitting en niet meer groeide met aardappel, die 10 minuten of langer verhit was bij 100° C. *Hi* gaf groei in alle buisjes, behalve in die van rij 3.

Conclusies: *Hc* heeft voor zijn groei een zeer thermolabiele factor nodig. Deze factor kan de V factor niet zijn, daar die voldoende aanwezig was blijkens de positieve groei van *Hi* in buisjes waarin *Hc* niet meer groeide. Genoemde factor wordt snel vernietigd bij 100° C. en is in bouillon schijnbaar iets thermostabieler. Door verhitting gaat deze factor uit aardappel niet in de omgeving over.

Om de samenhang van deze thermolabiele factor met *Hc* uit te drukken werd hij in het vervolg aangeduid als „C(oryza) factor”.

Of *Hc* tevens X- en V factor nodig had was uit deze proef niet op te maken.

Proef II: Gedrag van de groeifactoren in aardappel ten opzichte van de temperaturen 65—100° C.

Uit proef I bleek, dat *Hc* voor zijn groei in aardappelbouillon een factor nodig had, die na korte verhitting op 100° C. vernietigd was. In proef II werd het gedrag van deze C factor nagegaan bij temperaturen lager dan 100° C.

Hiervoor werd de groei van *Hi* en *Hc* bepaald in bouillon

met diverse stukjes aardappel. Deze stukjes aardappel werden verkregen door stukjes rauwe aardappel verschillende tijden te verhitten bij 65—100° C. in bouillon of aqua destillata.

Onderstaande tabel met verklaring geeft een beeld van de opzet van deze proef en van haar uitkomsten.

Met <i>Hc</i> of <i>Hi</i> geënte rijen	<i>Hc</i>				<i>Fi</i>
	I	II			II
Verhit ing	10 min.	10 min.	20 min.	30 min.	30 min.
65° C.	++	++	++	++	++++
70° C.	++	++	++	++	++++
75° C.	++	++	++	++	++++
80° C.	++	++	+	±	++++
85° C.	+	+	±	—	++++
90° C.	+	±	—	—	++++
95° C.	±	—	—	—	++++
100° C.	—	—	—	—	++++
onverhit	+	+	+	+	++++

I: Een rij buisjes bouillon met steriele stukjes rauwe aardappel, 10 minuten verhit bij 65—100° C.

II: Meerdere rijen buisjes bouillon met stukjes aardappel. Deze stukjes aardappel werden verkregen door rauwe stukjes aardappel verschillende tijden (10, 20 en 30 minuten) te verhitten in 2 cc. aqua destillata (in buisjes). Eerst daarna werden ze in de buisjes met bouillon gebracht.

De beoordeeling van de groei geschiedde op dezelfde wijze als bij proef I. Ook voor de verklaring der teekens wordt naar proef I verwezen.

De bepaling der troebeling in de buisjes bouillon met

aardappel uit rij I was alleen mogelijk door vergelijking met ongeënte buisjes. In de ongeënte buisjes dezer rij was reeds een troebeling, die bij de temperaturen 65° — 75° C. in sterker mate voorkwam. Bij verhitting boven 75° C. was die troebeling meer vlokkig.

Uitkomsten:

- I: Vergelijking van I (10 minuten) met II (10 minuten) geeft weer aan, dat de C factor in aardappel iets thermostabieler is bij verhitting in bouillon.
- II: Een half uur inwerking van de temperatuur van 75° C. kon de C factor in aardappel niet vernietigen.
- III: De tijdsduur heeft invloed op de vernietiging van de C factor in aardappel. Terwijl in *Hc* II bij 10 minuten op 80° C. nog een duidelijke troebeling optrad, was deze bijna niet meer zichtbaar na verhitting gedurende 30 minuten op 80° C. Terwijl bij 10 minuten 85° C. nog een goed zichtbare troebeling optrad, was de bouillon bij 30 minuten 80° C. volkomen helder.
- IV: Merkwaardig was het optreden van een veel sterkere troebeling in media met verhitte aardappel (65 — 80° C.) vergeleken met dat, waaraan onverhitte aardappel was toegevoegd. Misschien moet hierbij gedacht worden aan het uitschakelen door verhitting van groei-antagonistische stoffen in aardappel.
- V: X- en V factor waren steeds aanwezig blijkens de groei van *Hi*.

Conclusies: Proef II is een bevestiging van proef I wat betreft de behoefte van *Hc* aan een zeer thermolabele factor. Proef II gaf tevens aan 1. dat de tijd van inwerking der temperatuur invloed heeft op de vernietiging van deze factor in aardappel, 2. dat misschien deze factor beïnvloed kan worden door antagonistische stoffen en 3. dat deze factor in bouillon iets thermostabieler is.

Algemeene beschouwing proef I en II: Het raadselachtige feit, opgemerkt onder „Het Kweeken”, dat *Hc* niet groeide op Levinthalagar ondanks de aanwezigheid van optimale hoeveelheden X- en V factor, is hiermee opgelost. De verklaring is te zoeken in de te hooge verhitte van Levinthalagar.

Bij de bereiding van chocoladeagar voor *Hc* verdient het aanbeveling de oppervlakte van de media niet te flambeeren (gebruikelijk om luchtballen te doen verdwijnen). Hierdoor schakelt men een technische fout uit en heeft men meer kans op zekerder resultaten.

Ook de slechte resultaten met verhitte bloedbouillon, Levinthalbouillon en vele andere media, waarbij voor de bereiding een te hooge temperatuur werd aangewend — waarin toch voldoende X- en V factor aanwezig waren — zijn hiermee te verklaren.

Proef III: Thermostabiliteit van de X factor in aardappel.

FILDES 1922 vond, dat de X factor uit aardappel in zuur medium thermostabieler was dan in alkalisch medium. Als bron voor X- en V factor uit aardappel gebruikte hij aardappelperssap, gefiltreerd door Berkefeld N.

Het door mij gebruikte aardappelperssap — zie latere proeven — gefiltreerd door Berkefeld N, bevatte alleen V factor geen X factor. Dit was de aanleiding voor mij om de proeven van FILDES over thermostabiliteit van de X factor uit aardappel te herhalen met aardappelweefsel.

Steriele stukjes aardappel werden verkregen volgens de op blz. 32 aangegeven techniek.

Deze stukjes rauwe aardappel werden gedaan in buisjes met 10 cc. aqua destillata, waarvan de Ph respectievelijk 6,8 en 7,6 was.

De eene helft van deze buisjes — zoowel van die met Ph 6,8 als 7,6 — werd 20 minuten verhit bij 100° C. in een

waterbad, de andere helft in de autoclaaf 20 minuten 120° C.

Met een scherpe entnaald werden de aardappelstukjes daarna overgebracht in buisjes met het peptonNaCl-basis-medium (zie blz. 54). Bouillon werd niet gebruikt om eventueel hierin aanwezige X factor uit te schakelen. Zowel bij 100° als bij 120° C. bleek de aardappel meer stuk gekookt in de aqua destillata met Ph 7,6. Hij kon echter steeds met vereischte voorzichtigheid goed overgebracht worden in de peptonNaCl. De aardappel uit aqua destillata met Ph 6,8 was steeds stevig van consistentie. Aardappel werd vooraf verhit in buisjes en niet onmiddellijk in peptonNaCl om: 1. de Ph beter in de hand te hebben, 2. de troebeling van peptonNaCl door verhitting van aardappel hierin te voorkomen en 3. de invloed van pepton uit te schakelen. De overgebleven vloeistof uit de buisjes, waarin de aardappel verhit was geworden, moest afzonderlijk worden onderzocht.

De aanwezigheid van X- en V factor werd vastgesteld door een vergelijkend onderzoek met buisjes, waaraan tevens haematine of gistextract of deze beide werden toegevoegd.

De hoeveelheden haematine, gistextract en inoculum alsmede de öse waren dezelfde als bij proef I.

Om adsorptie van X- en V factor door *Hi* geheel uit te kunnen schakelen moest in passage in hetzelfde medium voortgekweekt worden. Hiertoe waren van ieder soort medium 4 buisjes gemaakt.

Onderstaande tabel geeft een overzicht van deze proef.

Aan- duiding	<i>Hi</i> geënt in peptonNaCl +	Micros- copisch	Troebe- ling	Sub- cultuur
a	1 Aardappel Ph 7,6, 20 min. 100° C.	+	t.	+
	2 Idem + haematine	+	t.	+
	3 Idem + gistextract	+	tt.	+
	4 Idem + haematine + gistextract	+	tt.	+
b	1 Aardappel Ph 6,8, 20 min. 100° C.	+	t.	+
	2 Idem + haematine	+	t.	+
	3 Idem + gistextract	+	tt.	+
	4 Idem + haematine + gistextract	+	tt.	+
c	1 Aardappel Ph 7,6, 20 min. 120° C.	—	h.	—
	2 Idem + haematine	—	h.	—
	3 Idem + gistextract	—	h.	—
	4 Idem + haematine + gistextract	+	tt.	+
d	1 Aardappel Ph 6,8, 20 min. 120° C.	—	h.	—
	2 Idem + haematine	—	h.	—
	3 Idem + gistextract	—	h.	—
	4 Idem + haematine + gistextract	+	tt.	+

Subcultuur : op chocoladeagar.

+ : veel bacillen per gezichtsveld; veel koloniën.

— : geen bacillen; geen koloniën.

t. : iets troebel.

tt. : troebel.

h. : helder.

Daar bij geringe troebeling microscopisch reeds veel bacillen aan te toonen waren en op chocoladeagar een maximale groei optrad, was de mate van troebeling het aangegeven middel om de graad van groei te bepalen.

Bij vergelijking van a, 1, en a, 3, bleek een duidelijk verschil in troebelheid te bestaan. Gistextracttoevoeging aan a, 1, bevorderde de groei, haematinetoevoeging niet. Er was in a, 1, dus een gebrek aan V factor. De overgebleven vloeistof van a, 1 — waarin de aardappel van a, 1, verhit was geworden — werd eveneens onderzocht en bevatte geringe hoeveelheden V factor, geen X factor. Het gebrek aan V factor in a, 1, zal hieraan toegeschreven moeten worden,

alsmede aan de mogelijk vernielende werking op de V factor in aardappel door de temperatuur van 100° C.

Ook b, 1, vertoonde een tekort aan V factor.

In het 4e passagebuisje was er practisch geen verschil meer in troebelheid tusschen b, 1, b, 2, en b, 3. In alle drie was een duidelijke troebeling opgetreden. Waarschijnlijk was dit te wijten aan het diffundeeren van de V factor uit de diepte van de aardappel naar de oppervlakte. Reeds werd opgemerkt, dat aardappel met Ph 6,8 niet zoo stuk gekookt was. Mogelijk staat hiermee in verband het terugblijven van de V factor in de diepte van de aardappel, die na 4 dagen weer naar de oppervlakte was gekomen.

Bij 120° C. kon noch door haematine noch door gist-extract groei verkregen worden. Hieruit moest tot afwezigheid van X- en V factor in aardappel, die gedurende 20 minuten op 120° C. verhit was, besloten worden. Ook in de vloeistof, waarin de aardappel verhit was, konden geen X- en V factor meer aangetoond worden.

C o n c l u s i e: X- en V factor in aardappel worden vernietigd door verhitting gedurende 20 minuten op 120° C. in aqua destillata. Een duidelijk verschil tusschen verhitting in zuur of alkalisch medium kon niet vastgesteld worden.

A l g e m e e n e b e s c h o u w i n g: De X factor in aardappel bleek minder stabiel dan de X factor in haematine. De gebezigde haematine-oplossing werd meermalen in de autoclaaf verhit bij 120° C. en bleef steeds werkzaam als X factor.

Er bestond dus verschil in eigenschappen tusschen X factor uit aardappel en haematine. Daaruit zou men geneigd zijn eerder te denken aan een of andere functie van de X factor voor *Hi* dan aan een voedende beteekenis.

Haematine, meermalen verhit, behoudt zijn peroxydase-activiteit. De plantaardige peroxydasen zijn veel gevoeliger voor verhitting. De peroxydase-functie van de X factor blijkt dus niet in strijd te zijn met deze proef.

Om de invloed van bouillon na te gaan op de thermostabiliteit van de X factor werd een klein proefje genomen met aardappel gevoegd bij bouillon. Na 20 minuten verhitting op 120° C. waren hierin, na toevoeging van gistextract, spaarzaam bacillen aan te toonen, hetgeen er op wees, dat de X factor niet geheel afwezig was. THJÖTTA en AVERY verhitten rauwe aardappel in bouillon en kwamen zoo tot de thermostabiliteit van de X factor in aardappel bij 120° C.

b. Diffundeeren van de groeifactoren in aardappel naar bouillon.

Bij eenige bouillonbuisjes werd rauwe aardappel gevoegd. Deze aardappelbouillonbuisjes werden gedurende 2 dagen bewaard, de eene helft bij kamertemperatuur (16° C.), de andere helft bij 37° C. in de broedstroof. Daarna werd hiervan — behalve van enkele contrôles — de bouillon voorzichtig afgepipetteerd en in steriele buisjes gedaan. In deze buisjes, al of niet met de bekende toevoegingen, werd de groei van *Hi* en *Hc* bepaald.

Medium	<i>Hi</i>	<i>Hc</i>
Afgepipetteerde vloeistof, 16° C.	—	—
Idem + haematine	+++	—
Idem + gistextract	—	—
Idem + haematine + gistextract	+++	—
Afgepipetteerde vloeistof, 37° C.	—	—
Idem + haematine	+++	—
Idem + gistextract	—	—
Idem + haematine + gistextract	+++	—
Rauwe-aardappelbouillon, 16° C.	+++	+
Rauwe-aardappelbouillon, 37° C.	+++	+

+++ : goede groei van *Hi*.
 + : goede groei van *Hc*.
 — : geen groei.

Toevoeging van X factor (haematine) aan de, van de bij 16° en 37° C. bewaarde buisjes, afgepipetteerde vloeistof was noodig om groei van *Hi* te verkrijgen. *Hc* groeide alleen in de contrôles bij de aanwezigheid van rauwe aardappel.

Conclusies: Alleen V factor gaat voldoende in bouillon over. X factor en C factor zijn vast aan aardappel verbonden.

Beschouwing: In rauwe aardappelbouillon is de V factor door het geheele medium verspreid aanwezig. De X factor is alleen aanwezig in de diepte, verbonden met de aardappel. Uit de omgeving hiervan moet dus de groei van *Hi* uitgaan, daar deze zoowel X- als V factor noodig heeft. Aanvankelijk treedt troebeling slechts op in de diepte — om de aardappel — eerst later door het geheele medium.

THJÖTTA en AVERY constateerden:

1. In haemoglobine-, bloed- en gistextractbouillon (voldoende X factor) het eerst groei in de bovenste lagen van het medium waar de zuurstofspanning het grootst was. Waarschijnlijk gaf *Hi* dus de voorkeur aan een hogere zuurstofspanning. X- en V factor waren door het heele medium aanwezig.
2. In bouillon met rauwe aardappel onder een laag vaseline — dus onder anaërobe omstandigheden — het eerst groei van *Hi* in de diepte om de aardappel. Hieruit conclusies te trekken omtrent het zuurstofverbruik van *Hi* lijkt mij niet mogelijk. De groei in de diepte om de rauwe aardappel moet in de eerste plaats worden toegeschreven aan de aanwezigheid van de X factor aldaar — afgezien van zijn functie — en aan de afwezigheid van de X factor in de bovenste lagen. Deze vorm van groei is onafhankelijk van het vaselinedek.

c. Aardappelpersap.

Bereiding: Geschilde rauwe aardappels werden

fijngewreven tot een papje door middel van een rasp. Aardappelperssap werd hieruit verkregen door het papje uit* te persen in doeken en achtereenvolgens te filtreren eerst door grof, daarna door fijn filtreerpapier.

Het inoculum voor *Hc* in deze proeven was een 4 mm.³ öse rauwe-aardappelbouilloncultuur. Zooals uit voorgaande proeven gebleken was, bevatte deze vloeistof alleen V factor.

Proef I. Het aardappelperssap werd gefiltreerd door Chamberland L₃ en onderzocht op groeifactoren volgens onderstaande tabel.

Medium	<i>Hi</i>	<i>Hc</i>
Bouillon + ½ cc. aardappelperssap L ₃ (BN)	—	—
Idem + gistextract	—	—
Idem + haematine	++	—
Idem + haematine + gistextract	++	—
Rauwe-aardappelbouillon	++	+

++ : goede groei van *Hi*.
 + : goede groei van *Hc*.
 — : geen groei.

Uit deze tabel is gemakkelijk af te leiden, dat in aardappelperssap, gefiltreerd door Chamberland L₃, alleen voldoende V factor aanwezig was. Toevoeging van X factor (haematine) was noodig bij bouillon + gefiltreerd perssap om groei van *Hi* te verkrijgen. Bij aanwezigheid van haematine + gistextract in bouillon + gefiltreerd perssap werd geen groei van *Hc* verkregen, op grond waarvan verondersteld mag worden, dat naast de X factor ook de C factor afwezig was.

Proef II. In plaats van door Chamberland L₃ werd aardappelperssap gefiltreerd door Berkefeld N. Dit filtraat werd onderzocht, waarbij dezelfde resultaten verkregen

werden als met aardappelperssap, gefiltreerd door Chamberland L₃.

Proef III. Mogelijk was, dat X- en C factor spoedig vernietigd werden door vrijkomende enzymen. Om dit uit te schakelen werd het aardappelpapje — dat spoedig bruin werd, waarschijnlijk door oxydeerende enzymen — dadelijk na de bereiding 10 minuten verhit op 70° C. Hierdoor bleef de bruinkleuring uit. Dit papje werd dan op de gewone manier verwerkt tot aardappelperssap.

De resultaten met dit aardappelperssap, gefiltreerd zowel door Chamberland L₃ als door Berkefeld N, waren dezelfde als die uit proef I en II. Alleen V factor kon worden aangetoond.

3. GROEIFACTOREN IN SERUM.

Volgens NELSON groeide zijn coryzabacil in media waaraan kippenserum was toegevoegd. Dit was voor mij aanleiding om een onderzoek in te stellen naar de aanwezigheid van groeifactoren in het serum van verschillende dieren.

a. Van paard, rund, schaap, geit en kip.

Serumwinning. Bij paard, rund, schaap en geit werd serum verkregen door bloed te laten stollen, dat steriel gewonnen was uit de vena jugularis.

Voor het verkrijgen van kippenserum werd als volgt te werk gegaan. Kippen werden op de rug gelegd en met chloroform onder diepe narcose gebracht. Daarna werd van het borstbeen de huid verwijderd. Vanaf de buik werd aan weerszijden het borstbeen ingeknipt en naar voren omgebogen. Hierbij diende de noodige voorzichtigheid in acht genomen te worden om te vermijden, dat de lever geraakt werd, daar kneuzing der lever steeds met groot bloedverlies gepaard ging. Het hartzakje werd met schaar en pin-

cet opengeknipt. Bloed werd opgevangen in een steriel fleschje door een steriele canule in het hart te steken. Door het kloppen van het hart werd het meeste bloed uit het lichaam gepompt, hetgeen nog bevorderd werd door het hart zoo laag mogelijk te houden. Om een groot stollingsoppervlak te hebben werden de fleschjes op hun kant gelegd. Ze werden één nacht in de broedstroof geplaatst om de serumafscheiding te bevorderen.

Proef. Bij bouillon werd gevoegd versch serum al of niet met haematine en/of gistextract. De groei van *Hi* en *Hc* werd bepaald.

Serum van:	Paard		Rund		Schaap		Geit		Kip	
	<i>Hi</i>	<i>Hc</i>	<i>Hi</i>	<i>Hc</i>	<i>Hi</i>	<i>Hc</i>	<i>Hi</i>	<i>Hc</i>	<i>Hi</i>	<i>Hc</i>
10 cc. Bouillon +										
½ cc. serum	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Idem + haematine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Idem + gistextract	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Idem + haematine + gistextract .	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Rauwe aardappel	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : goede groei.

- : geen groei.

Serum van paard, rund, schaap en geit gaf alleen groei van *Hi* bij aanwezigheid van gistextract (V factor). *Hc* was niet tot vermeerdering in staat met genoemde sera, ook niet als voldoende X- en V factor aanwezig waren. Kippenserum zonder meer gaf een goede groei van *Hi* en *Hc*.

In passage werd voortgekweekt met kippenserumbouillon tot en met de vierde generatie. Zoowel *Hi* als *Hc* konden in passage voortgekweekt worden.

Kippenserum, vier dagen bebroed (37° C.) en daarna gevoegd bij bouillonbuisjes, gaf nog volledig goede groei van *Hi* en *Hc*.

Conclusies: In paarden-, runder-, schapen- en geitenserum is alleen X factor aanwezig, geen V factor. In kippenserum zijn X-, V- en C factor aanwezig. Kippenserum bevat geen inactiverend ferment voor V- of C factor (werkzaam zijn van het serum na 4 dagen bebroeden bij 37° C.).

b. Van konijn, cavia en kat.

Serumwinning geschiedde door bloed, dat verkregen werd door hartpunctie onder diepe narcose, te laten stollen.

Het leek mij gewenscht kattenserum te onderzoeken, daar het KNORR gebleken was, dat in versch kattenserum geen ferment voorkwam hetwelk de V factor vernietigde. De mogelijkheid, dat V factor in kattenserum aanwezig kon zijn, was dus niet uit te sluiten. Daar de C factor steeds samen werd aangetroffen met de V factor, kon tevens de C factor aanwezig zijn. De verkregen resultaten (zie onderstaande tabel) met kattenserum waren echter maar gedeeltelijk in overeenstemming met bovenstaande veronderstellingen.

Serum van :	Konijn		Cavia		Kat	
	<i>Hi</i>	<i>Hc</i>	<i>Hi</i>	<i>Hc</i>	<i>Hi</i>	<i>Hc</i>
10 cc. Bouillon +						
½ cc. serum	—	—	+	±	+	—
Idem + haematine	—	—	+	±	+	—
Idem + gistextract	++	—	++	+	++	—
Idem + haematine + gistextract	++	—	++	+	++	—
Rauwe aardappel	++	+	++	+	++	+

++ : goede groei van *Hi*.

+

± : geringe groei van *Hc* (juist zichtbare troebeling).

— : geen groei.

In kattenserumbouillon kon *Hi* groeien, de hoeveelheid V factor was echter beperkt. Toevoeging van gistextract gaf een veel betere groei van *Hi*. Er trad een veel duidelijker en sterker troebeling op. C factor kwam in kattenserum niet voor. *Hc* groeide niet in kattenserumbouillon, ook niet na toevoeging van gistextract.

Kattenserum 4 dagen bebroed bij 37° C. en daarna onderzocht, bevatte nog V factor in gelijke hoeveelheid. In kattenserum was dus geen inactiverend ferment voor de V factor aanwezig (KNORR).

Konijnenserum gaf alleen groei van *Hi* in tegenwoordigheid van gistextract, geen groei van *Hc* en bevatte dus alleen X factor, geen V- en C factor.

Caviaeserum gaf een goede groei van *Hi*. Door toevoeging van gistextract werd de troebeling nog duidelijker. Caviaeserum bevatte dus voldoende X factor en een belangrijke hoeveelheid V factor. Ook *Hc* groeide in bouillon met caviaeserum. Er trad een juist zichtbare troebeling op. Door toevoeging van gistextract werd die troebeling veel duidelijker. Caviaeserum bevatte dus ook C factor. De veel betere groei na toevoeging van gistextract wees op de behoefte aan V factor van *Hc*.

Na 4 dagen bebroeden van caviaeserum trad zonder toevoeging van gistextract bij caviaeserumbouillon geen merkbare groei op. Werd gistextract toegevoegd, dan vertoonde zich een duidelijke troebeling bij *Hi* en *Hc*. Caviaeserum had V factor verloren en moest dus een inactiverende werking op de V factor kunnen uitoefenen.

Conclusies: Konijnenserum bevat alleen X factor, kattenserum voldoende X factor en een beperkte hoeveelheid V factor, caviaeserum X factor, een belangrijke hoeveelheid V factor en C factor. Kattenserum heeft geen inactiverende werking op de V factor, caviaeserum wel.

Hc heeft voor zijn groei V factor nodig.

c. Van duif.

Bij het winnen van duivenserum werd dezelfde methode gevolgd als voor kippenserum beschreven werd.

Bij het onderzoek van duivenserum op groeifactoren werd de mogelijkheid verondersteld, dat de groeibevorderende eigenschappen van kippenserum voor *Hc* eigen konden zijn aan alle soorten vogelsera.

In onderstaande tabel is een overzicht gegeven van de proef met duivenserum.

Serum van :	Duif	
	<i>Hi</i>	<i>Hc</i>
10 cc. Bouillon +		
$\frac{1}{2}$ cc. serum	+	+
Idem + haematine	+	+
Idem + gistextract	+	+
Idem + haematine + gistextract	+	+
Rauwe aardappel.	+	+

+ : goede groei.

Duivenserum bevatte, zooals duidelijk is uit bovenstaand schema, voldoende X-, V- en C factor. Na 4 dagen bebroeden bij 37° C. was het duivenserum nog volkomen werkzaam. Inactiverende fermenten voor V- en C factor waren dus uit te sluiten.

Overzicht: Aanwezigheid van groeifactoren in serum.

Serum van :	Paard	Rund	Schaap	Geit	Konijn	Kat	Cavia	Kip	Duif
X factor	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V factor	-	-	-	-	-	±	±	+	+
C factor	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Inact. ferment						-	+	-	-

d. Filtreerbaarheid van groeifactoren in serum.

Paarden-, katten-, kippen- en duivenserum werden gefiltreerd door Chamberland L₃ en onderzocht. Paarden-serum bevatte nog X factor, kattenserum nog X- en V factor, kippen- en duivenserum nog X-, V- en C factor. Gefiltreerde kippenserumbouillon, die met meerdere Hc-stammen onderzocht werd, gaf steeds groei.

Aangenomen mag dus worden, dat de betreffende factoren in alle sera filtreerbaar zijn door Chamberland L₃.

e. Proeven met kippenserum na behandeling met carbo animale.

Om de levensnoodzakelijkheid van de X factor voor Hc te bepalen, leek mij een onderzoek met X factor-vrij kippenserum van belang. Getracht werd daarom de X factor uit kippenserum te verwijderen. Hiervoor werd het behandeld met carbo animale, waarvan bekend was (THJÖTTA en AVERY), dat het X factor kon adsorbeeren.

Proef I. Kippenserum werd geschud met fijn verdeelde carbo animale in de verhouding 1 : 10 en vervolgens een uur bewaard bij kamertemperatuur. Hierna werd de kool afgecentrifugeerd en het serum gefiltreerd door Chamberland L₃.

Het behandelde serum bevatte nog voldoende X-, V- en C factor.

Proef II. Adsorptie van de X factor aan kool zou bevorderd worden door een temperatuur van 37° C. en zou afhankelijk zijn van de tijd.

Kippenserum werd geschud met fijn verdeelde carbo animale in de verhouding 1 : 10 en vervolgens een nacht weggezet bij 37° C. De volgende morgen werd het mengsel nogmaals geschud en daarna gecentrifugeerd. Het zich

hierbij afscheidende serum werd gefiltreerd door Chamberland L₃.

Ook dit behandelde serum bevatte nog voldoende X-, V- en C factor.

Proef III. Kippenserum werd met carbo animale gemengd in de verhouding 1 : 10, flink geschud, 12 uren weggezet bij 37° C. en gecentrifugeerd. Vervolgens werd het opnieuw gemengd met een tweede hoeveelheid carbo animale in dezelfde verhouding, flink geschud, 12 uren weggezet bij 37° C., gecentrifugeerd en nu gefiltreerd door Chamberland L₃.

Het onderzoek van dit aldus verkregen serum is hieronder schematisch weergegeven.

10 cc. Bouillon +	<i>Hi</i>	<i>Hc</i>
½ cc. carbo-kippenserum	—	+
Idem + gistextract	—	+
Idem + haematine	+	+
Idem + haematine + gistextract	+	+
Rauwe aardappel	+	+

+ : goede groei.

— : geen groei.

Om in dit kippenserum groei van *Hi* te verkrijgen was toevoeging van haematine (X factor) noodig. De X factor was er dus uit verdwenen.

Hc groeide nog rijkelijk in dit X factor-vrije serum met bouillon en kon in passage hierin voortgekweekt worden.

Conclusie: Voor *Hc* is de X factor niet levensnoodzakelijk.

f. Proeven met verhitte kippenserumbouillon.

Kippenserumbouillon (1 : 20) werd 10 minuten verhit bij verschillende temperaturen en daarna onderzocht op groeifactoren. Voor dit onderzoek werd de groei van *Hi* en *Hc* in die verhitte kippenserumbouillon nagegaan.

Bouillon + kippenserum	10 Minuten				
	60° C.	70° C.	80° C.	90° C.	100° C.
<i>Hi</i>	+	+	+	+	+
<i>Hc</i>	+	+	±	-	-

+ : goede groei.
 ± : geringe groei.
 - : geen groei.

Kippenserumbouillon, 10 minuten verhit bij 80° C., was reeds troebel door verhitting. De mate van groei voor *Hi* en *Hc* werd in de betreffende kippenserumbouillon daarom alleen bepaald door microscopisch onderzoek en subcultuur op chocoladeagar.

Hi groeide in alle verhitte media. X- en V factor waren dus steeds aanwezig en werden niet vernietigd bij een temperatuur van 10 minuten 100° C. *Hc* groeide nog slechts minimaal in kippenserumbouillon, die 10 minuten bij 80° C. verhit was, waardoor bevestigd werd, dat *Hc* aangewezen is op een thermolabiele factor, die reeds aangeduid werd als C factor.

Conclusie: Ook voor de groei met kippenserum heeft *Hc* een thermolabiele factor (C factor) nodig.

g. Verdunning van kippenserum in bouillon.

Om een indruk te krijgen van de concentratie der groeifactoren in kippenserum werd de groei van *Hi* en *Hc* be-

paald in bouillon, waaraan het betreffende serum in verschillende verdunningen al of niet met haematine en/of gistextract was toegevoegd.

Bouillon + kippenserum		<i>Hi</i>	<i>Hc</i>
Verdunning	Toevoeging		
1 : 20	(geen)	+	+
	haematine	+	+
	gistextract	+	+
	haematine + gistextract	+	+
1 : 200	(geen)	-	-
	haematine	-	-
	gistextract	+	±
	haematine + gistextract	+	±
1 : 2000	(geen)	-	-
	haematine	-	-
	gistextract	-	-
	haematine + gistextract	+	-

+ : goede groei.

± : matige groei (gekenmerkt door juist zichtbare troebeling).

- : geen groei.

Uit bovenstaande tabel blijkt, dat de *V* factor niet meer aanwezig was in voldoende concentratie voor *Hi* en *Hc* bij verdunning van kippenserum in bouillon 1 : 200. Hetzelfde geldt voor de *C* factor ten opzichte van *Hc*. Bij verdunning 1 : 2000 was geen der factoren nog in voldoende hoeveelheid aanwezig.

De behoefte aan *V* factor van *Hc* is tevens af te lezen.

4. GROEIFACTOREN IN BLOED EN HAEMOGLOBINE.

I. Het groeibevorderend vermogen van verschillende bloedsoorten werd onderzocht. Hiertoe werd aan Liebigbouillon 10% gedefibrineerd bloed van verschillende dieren toegevoegd.

Alle onderzochte bloedsoorten waren in staat groei te geven in bloedbouillon zoowel van *Hi* als *Hc*. Hierbij werden enkele bijzonderheden opgemerkt.

Bij paarden-, schapen- en runderbloedbouillon evenals bij konijnenbloedbouillon, bleef met *Hc* de bouillon volkomen helder. De groei beperkte zich, zooals reeds eerder werd opgemerkt, tot de naar de bodem gezakte laag roode bloedcellen. Hetzelfde gold voor *Hi*, maar hier ontstond eerder een troebeling na eenige tijd bebroeden. Op den duur werd *Hc*-bloedbouillon ook donker door haemolyse.

Kippen- en caviaebloedbouillon gaven een duidelijke troebeling van de bouillon met *Hi* en *Hc*. Dit was geheel in overeenstemming met het onderzoek van de sera van verschillende dieren, waarbij bleek, dat kippen- en caviaeserum alle voor *Hi* en *Hc* noodzakelijke factoren bevatten.

Terwijl dus niet in alle sera de noodzakelijke groeifactoren aanwezig waren, werden deze wel aangetroffen in alle onderzochte bloedsoorten. Hieruit mag besloten worden, dat de meeste soorten bloedcellen de noodzakelijke groeifactoren voor *Hi* en *Hc* bevatten.

II. Bouillon + 20% gehaemolyseerd bloed (1 bloed op 1 aqua destillata) gaf groei van *Hi*, niet van *Hc*. Misschien is de verklaring van het niet groeien van *Hc* in een dergelijk medium te zoeken in de concentratie der groeifactoren en wel in een te geringe hoeveelheid V factor of in een te geringe hoeveelheid C factor. In bloedbouillon zijn alle bloedcellen naar de bodem gezakt, waardoor de groeifactoren daar in grootere concentratie aanwezig zijn. Voor *Hi* is de concentratie der groeifactoren in een dergelijk gehaemolyseerd bloedbouillonmedium voldoende.

III. Bouillon + haemoglobine (pulv. Merck) in verdunning 1 : 1000 gaf geen groei van *Hi* en *Hc*. Toevoeging van $\frac{1}{2}$ cc. gistextract bij 10 cc. haemoglobinebouillon gaf groei van *Hi*, niet van *Hc*.

Naast haemoglobine is voor *Hi* dus noodzakelijk gist-extract. Haemoglobine kan dus fungeren als X factor, niet als V factor. Voor de groei van *Hc* bleek haemoglobine hier van geen beteekenis. De beteekenis van het bloed voor *Hc* moet in andere oorzaken gezocht worden (V- en C factor).

5. SATELLITISME.

Op vaste media, met onvoldoende V factor, groeit *Hi* rondom andere bacteriënkoloniën in reuzenkoloniën, waarvan de V factor, die door genoemde andere koloniën geproduceerd wordt, de oorzaak is. Het verschijnsel van de reuzengroei rondom andere bacteriën wordt aangeduid als satellitisme. De omringende koloniën worden satellieten genoemd.

- a. Groeibevorderend vermogen van verschillende bacteriën voor *Haemophilus influenzae* en *Haemophilus coryzae*.

Een vergelijkend onderzoek werd ingesteld tusschen *Hi* en *Hc* wat betref hun vorming van reuzenkoloniën rondom andere bacteriënkoloniën.

Als medium werd gebruikt 25% paardenbloedagar, in platen. Deze platen werden uitwendig verdeeld in 5 sectoren. Nadat op de platen *Hi* respectievelijk *Hc* was uitgestreken, werden verschillende bacteriënsoorten in achter-eenvolgende sectoren uitgezet. Gelet werd op de grootte der *Hi*- respectievelijk *Hc*-koloniën rondom de andere koloniën, vergeleken met de grootte van die koloniën op het midden van de bloedagarplaten.

Bacteriënsoort	Hi	Hc
<i>Corynebacterium gallinarum</i> 2)	++ ¹⁾	++ ¹⁾
<i>Staphylococcus albus</i>	++	++
<i>Staphylococcus citreus</i>	++	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++
<i>Pasteurella avicida</i>	+	—
<i>Proteus vulgaris</i>	++	++
<i>Escherichia coli</i>	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	++	++
<i>Salmonella enteritidis</i> var. <i>essen</i>	++	++
<i>Salmonella gallinarum</i>	++	++

++ : sterk satellitisme.

+ : gering satellitisme.

— : geen satellitisme.

1) Bij *Corynebacterium gallinarum* bleek een donkere doorschijnende zône gevormd te zijn door haemolyse. In deze zône was de groei van *Hi* respectievelijk *Hc* minimaal. Hierbuiten was een zône van groeibevordering.

2) Voor namen zie o.a.: BERGEY, Determinative Bacteriology.

Uit de tabel blijkt:

1. dat verschillende bacteriën groeibevorderend werkten op *Hi* en *Hc*;
2. dat er een overeenkomst was in graad van groeibevordering tusschen *Hi* en *Hc*. Een uitzondering vormde hierbij *Pasteurella avicida*, die alleen groeibevorderend was voor *Hi*, *Hc* zelfs iets scheen te remmen.

Zooals reeds gezegd werd, berust het groeibevorderend vermogen van bacteriën van *Hi* op hun vorming van V factor. Die door bacteriën gevormde V factor zou ook de meest voor de hand liggende oorzaak zijn voor de groeibevordering van *Hc*. De werking van *Pasteurella avicida* zou dan teruggevoerd moeten worden tot een bepaald antagonisme, waarbij deze bacil naast V factor tevens remmende stoffen voor *Hc* vormde.

Mogelijk was echter, dat het vermogen van bacteriën om de groei van *Hc* te bevorderen, terug te voeren was tot een vorming van thermolabele C factor, afgezien van vorige proeven, die wezen op de behoefte van *Hc* aan V factor. Om de juiste beteekenis van de groei in reuzenkoloniën door *Hc* te begrijpen, was daarom een nader onderzoek noodig.

b. Oorzaak van de groeibevordering van *Haemophilus coryzae* door verschillende bacteriën.

Indien de veronderstelling, dat bacteriën naast voldoende V factor C factor vormden, juist was, moesten ze op haematineagar zoowel met *Hi* als met *Hc* reuzenkoloniën geven.

Gaven ze op haematineagar geen reuzenkoloniën voor *Hc*, dan was nog mogelijk, dat die bacteriën naast C factor voor *Hc* onvoldoende V factor vormden. In dit geval zou *Hc* moeten groeien op haematineagar + gistextract.

Werden door *Hc* op haematineagar + gistextract ook geen koloniën gevormd, dan moest worden aangenomen, dat bacteriën niet in staat waren om C factor te vormen. Dat bacteriën onvoldoende C factor vormden, die om reuzengroei van *Hc* te geven moest worden aangevuld met C factor uit het medium, leek onwaarschijnlijk.

Zou *Hc* alleen op media met C factor in reuzenkoloniën rondom andere bacteriën groeien — niet op haematineagar en haematineagar + gistextract — in welk geval moest worden aangenomen, dat bacteriën geen C factor vormden, dan zou het meest waarschijnlijke zijn, dat deze reuzengroei van *Hc*, evenals die van *Hi*, berustte op de vorming van V factor door andere bacteriën.

Haematineagarplaten werden gemaakt van een massa, bestaande uit 100 cc. agar, waaraan $\frac{1}{2}$ cc. van een 1%-oplossing van haematine werd toegevoegd.

Haematineagar + gistextract, eveneens in platen gebruikt, was samengesteld uit genoemde haematineagar, door hieraan in hoeveelheid van 100 cc., 5 cc. gistextract toe te voegen.

Uit oriënteerende proeven was gebleken, dat het overbrengen van C factor met het inoculum vermeden moest worden. Daarom werd met vloeistof uit rauwe-aardappelbouillonculturen geënt.

Van iedere soort agarplaten werden 2 groepen van 3 gebruikt, waarvan de eene groep bestreken werd met *Hi*, de andere met *Hc*. Van iedere groep van 3 werd één plaat op 3 plaatsen geënt met *Staphylococcus aureus*, een andere met *Staphylococcus albus* en de derde met *Staphylococcus citreus*.

Medium	<i>Hi</i>	<i>Hc</i>
Haematineagar	+	-
Haematineagar + gistextract	+	-
25% Bloedagar	+	+

+ : reuzengroei (met alle gebruikte staphylococcen).

- : geen groei.

Aan de hand van bovenstaande overwegingen blijkt uit deze tabel, dat het meest waarschijnlijke is, dat het satellitisch groeien van *Hc* eveneens berust op de vorming van V factor door andere bacteriën.

6. SAMENVATTING.

Het onderzoek op groeifactoren voor *Hi* is een bevestiging van de levensnoodzakelijkheid voor *Hi* van X- en V factor naast een derde voedende substantie.

Hc blijkt voor zijn groei geen X factor nodig te hebben, wel V factor. Naast V factor is als groeifactor nodig een zeer thermolabiele substantie (C factor), die in verschillende bronnen aanwezig is, o.a. in alle bloedcellen, verschillende sera en aardappel.

FILTREERBAARHEID.

NELSON filtreerde neusexudaat — verdund met bouillon — van coryzakippen door $3\frac{1}{2}$ cc. Berkefeld V. Met het filtraat was geen ziekte op te wekken. $\frac{1}{2}$ cc. Filtraat, gevoegd bij een agar-bloedmedium, was, na 24—48 uren bebroeden bij 37° C., infectieus. De coryzabacil was in rein-cultuur aanwezig. Op een eenvoudige manier kon de bacil van Nelson aldus geïsoleerd worden.

Onderzocht werd, of het filtreren ook beteekenis had voor het isoleren van *Hc*. Was uit Berkefeld V-filtraat van neusexudaat *Hc* regelmatig te kweken? Tevens kon door het filtreren een indruk verkregen worden van de grootte van *Hc* onder verschillende omstandigheden. Lumbaalvochten — welwillend ter beschikking gesteld door Dr. Korthoff, uit Leiden — van 2 kinderen, lijdende aan influenzameningitis, werden eveneens gefiltreerd.

Filtreerbaarheidsproeven voor *Hi* werden verricht door HAPPE en SEIXAS PALMA. HAPPE beval voor het onderzoek van filtraten een optimum medium aan, liefst vloeibaar, omdat daarin groote hoeveelheden filtraat onderzocht konden worden.

HAPPE 1922 filtreerde reïnculturen van *Hi* door Berkefeld. Uit 8 van 51 filtraten — dus 15% — was *Hi* in bloedbouillon te kweken. Van 12 onderzochte kaarsen, lieten er 6 kiemen passeeren. Alle 3 onderzochte stammen gingen een bepaald aantal keeren door. De doorlaatbaarheid was dus onregelmatig. Filtraten van 6 monsters influenzasputa, door voor *Hi*-cultuur niet geheel ondoorlaatbare kaarsen, bleven steriel. Welke Berkefeld (N, V of W) gebruikt werd, werd niet aangegeven. Wel werd vermeld, dat de poriëngrootte van Berkefeld tusschen 0,2—0,8 micra kon schom-

melen. Waarschijnlijk werd daarom Berkefeld V (0,8—1,2 micra) niet gebruikt.

SEIXAS PALMA 1919 filtreerde bloed van influenzapatiënten. Bloed werd verdund met physiologische NaCl 1 : 20, 1 uur in de broedstoof van 37° C. gezet en daarna gefiltreerd door een nieuwe Berkefeld. Uit het filtraat was *Hi* te kweken.

Filtratietechniek. Leidraad hierbij waren de handboeken van RIVERS 1928 en HAUDUROV 1934. De filters werden gemonteerd op glasmantels, door middel van gummikurken. Een zijstuk van de mantel werd afgesloten met een wattenprop. Het geheel, gewikkeld in een doek, werd gesteriliseerd in de autoclaaf gedurende 10 minuten bij 110—115° C. Het zijstuk van de mantel werd — met inschakeling van een terugslagflesch — door een gummislang verbonden aan een waterstraalluchtpomp. Nieuwe filters werden gecontroleerd op defecten. Schoonmaken en herstel der filters geschiedde door uitkoken in een waterbad gedurende 1 uur, drogen, uitgloeien in een moffeloven, controle op defecten, monteren en steriliseeren.

Materiaal. Gefiltreerd werd materiaal van jonge en oude coryzagevallen, die afkomstig waren uit stammen, waarbij *Hc* meermalen geïsoleerd was. Hiertoe werden, voor iedere filtratie, van twee geïnfecteerde dieren slijmvlies en slijm uit neus en periorbitale ruimten in een steriele mortier onder bijvoeging van enkele dekglasjes en een weinig bouillon, goed fijngewreven. NELSON verdunde dan daarna de massa met ten hoogste 10 cc. bouillon. Werd hetzelfde door mij gedaan, dan bleek filtratie onmogelijk daar de filters verstopten. Daarom werd door mij sterker verdund om hierdoor het filtratieproces mogelijk te maken. Veelal werd in totaal 20 tot 25 cc. bouillon toegevoegd. Aangegeven wordt ook door verschillende onderzoekers, dat sterke verdunning van materiaal een filtratieproces bevordert. Om evenwel zooveel mogelijk de trant van NELSON

te blijven volgen, werd slechts zoo weinig mogelijk bouillon voor verdunning gebruikt.

De onderzochte bloedbouillonculturen en lumbaalvochten werden 1 : 1 verdund met bouillon.

Filtraties door Berkefeld V.

Aantal gevallen	Materiaal	Bloedbouillon	Agarbloed	Chocoladeagar (plaat)
20	Jonge gevallen van coryza, 1 dag—2 weken oud	—	—	—
6	Oude gevallen van coryza, ouder dan 4 weken	—	—	—
4	Bloedbouillonculturen van <i>Hc</i> , 24—48 uren oud	—	—	—
4	Bloedbouillonculturen van <i>Hc</i> , 1—2 weken oud	—	—	—
2	Lumbaalvocht (influenzamenigitis kind)	+	+	+

+ : groei.

— : geen groei.

Resultaten :

1. Uit filtraten van jonge zoowel als van oude coryzagevallen waren geen *Hc*-bacillen te kweken. *Hc* was dus niet door filtratie te isoleeren.
2. Uit filtraten van jonge en oude bloedbouillonculturen van *Hc* waren eveneens geen *Hc*-bacillen te kweken.
3. Uit de twee lumbaalvochtfiltraten van kinderen met influenzamenigitis ontstond een rijke groei van *Hi*.

Deze resultaten waren in strijd met die van NELSON. Evenwel bleek mij :

1. uit de jongste publicaties van hem, dat doorlaatbaarheid van zijn coryzabacil door Berkefeld V ook slechts tot de uitzonderingen behoorde ;
2. uit een briefwisseling met NELSON, dat ook hij bij het

isoleeren zijn filtratiemethode verlaten had en hierbij zijn toevlucht zocht tot de afgesloten plaatmethode („being more practical”). Hij noemde het een gelukkige omstandigheid, dat hij zijn eerste isolaties door filtratie met Berkefeld V verkreeg. Het betrof filters met een zeldzame doorlaatbaarheid. Tevens wijst hij er nog op, dat die filters gemakkelijk verstoppden.

Door deze laatste punten, ook al mogen *Hc* en de coryzabacil van Nelson identiek blijken, worden onze onderzoeken weinig of niet tegenstrijdig.

SEROLOGIE.

Hier moeten vermeld worden de resultaten der onderzoekingen van DE BLIECK dienaangaande. DE BLIECK kon bij enkele *Hi*- en *Hc*-stammen slechts een geringe agglutinatorische verwantschap aantonen. Een grootere verwantschap bleek door complementbinding. Met geconcentreerd *Hc*-antigeen waren hierbij zelfs geen verschillen tusschen *Hi*, *Bac. koch-weeks* en *Hc* aan te toonen. Met alle waren de bindingen volledig in de toegepaste verdunningen van *Hi*-serum en *Bac. koch-weeks*-serum; onvolledig was dan de binding, met *Bac. haemoglobinophilus canis*.

Door mij werd alleen de agglutinatorische verwantschap van *Hi* en *Hc* nagegaan. Antisera werden hiertoe gewonnen bij konijnen. DE BLIECK verkreeg met sera van kippen, die meermalen intraveneus ingespoten waren met groote hoeveelheden *Hc*-cultuur, slechts tot een verdunning van 1 : 100 een gedeeltelijke agglutinatie. Daarom en ook omdat in de literatuur voor *Hi*-serumbereiding overwegend konijnen gebruikt werden, werden door mij antisera gemaakt bij konijnen. Met de gebruikte stammen was de normaalagglutinatie van die sera beneden 1 : 100. Er werden 4 sera gewonnen, 2 voor *Hc*- en 2 voor *Hi*-stammen.

Om de 5 dagen werd ingespoten in een oorvene, tot 5 maal toe met steeds stijgende hoeveelheid bacillen. Ingespoten werden suspensies van gewasschen bacillen in physiologische NaCl, in hoeveelheden van $\frac{1}{2}$ cc., opklimmende tot $1\frac{1}{2}$ cc. De konijnen verdroegen deze hoeveelheden zonder ziek te worden. Vijf dagen na de laatste injectie werd het serum verzameld door uitbloeding en laten stollen van het bloed. Het zoo verkregen serum werd nog gecentrifugeerd om de bloedcellen geheel te verwijderen, verdund met $\frac{1}{2}\%$

carbolphysiologische 1 : 1 ter conserveering en daarna in de ijskast bewaard.

Het was moeilijk een voldoende *Hc*-bacillen-concentratie te verkrijgen voor intraveneuze inspuiting en antigeenbereiding. Uit de betrekkelijk kleine *Hc*-koloniën op vaste media kon bezwaarlijk een groote massa bacillen verkregen worden. In de geschikte vloeibare media was de bacillendichtheid maar matig. Vooral voor antigeenbereiding leek een grootere dichtheid gewenscht. Om mede bijfactoren, die zouden kunnen ontstaan indien tevens mediabestanddeelen gebruikt werden, uit te sluiten, werd daarom uitgegaan van gewasschen bacillen. Hiertoe werden 48 uren oude rauwe-aardappelbouillonculturen van *Hi* of *Hc* — na steriele verwijdering der aardappelstukjes — $\frac{1}{2}$ —1 uur gecentrifugeerd in Gerber's elektrische centrifuge op 1.000 toeren. Om het naar binnen gaan der wattenproppen hierbij te voorkomen werden de uit de buisjes stekende stukken circulair omgeslagen op de buisjes en met elastiekjes stevig omwonden. Na verwijdering der vloeistof werden de neergeslagen bacillen gewasschen met physiologische NaCl en daarna voor de tweede maal gecentrifugeerd. Verkregen werden steriele hoeveelheden gewasschen bacillen.

In plaats van rauwe-aardappelbouillon- werden ook wel kippenserumbouillon(1 : 20)culturen gebruikt.

Voor intraveneuze injectie werden deze bacillen gesuspendeerd in physiologische NaCl. Bij de antigeenbereiding werd $\frac{1}{2}$ % carbolphysiologische gebruikt. De voor antigeenbereiding gebruikte stammen waren van te voren 3 maal, om de 2 dagen, overgeënt om eventueele spontaanagglutinatie te verminderen of te voorkomen.

De dichtheid van antigeen en geïnjiceerde suspensies was zoodanig, dat een blauwe streep op wit papier door de gevulde cultuurbuizen juist gezien kon worden.

Serumverduunningen werden gemaakt met $\frac{1}{2}$ % carbolphysiologische. $\frac{1}{2}$ cc. Antigeen werd gevoegd bij $\frac{1}{2}$ cc. ver-

dund serum. De serumverduunning — zie onderstaande tabellen — had betrekking op het totaalvolume.

De volgende agglutinaties werden verricht:

Serum	Stam	Serumverduunning							Con- trôle
		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	
<i>Hi 1</i>	<i>Hi</i> 1	+	+	+	+	+	+	±	—
	2	+	+	+	+	+	—	—	—
	3	+	+	+	+	+	—	—	—
	4	+	+	+	+	—	—	—	—
	5	+	+	+	+	+	—	—	—
	6	+	+	+	+	+	±	—	—
	<i>Hc</i> 1	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	+	+	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	+	—	—	—	—	—	—	—
	5	+	—	—	—	—	—	—	—
	6	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Hi 5</i>	<i>Hi</i> 1	+	+	+	+	+	±	—	—
	2	+	+	+	+	+	—	—	—
	3	+	+	+	—	—	—	—	—
	4	+	+	+	—	—	—	—	—
	5	+	+	+	+	+	+	+	—
	6	+	+	+	+	+	+	±	—
	<i>Hc</i> 1	+	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—	—
	5	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Hc 1</i>	<i>Hi</i> 1	±	—	—	—	—	—	—	—
	2	+	±	—	—	—	—	—	—
	3	+	±	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—	—
	5	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	+	+	—	—	—	—	—	—
	<i>Hc</i> 1	+	+	+	+	+	—	—	—
	2	+	+	+	+	+	—	—	—
	3	+	+	+	+	—	—	—	—
	4	+	+	+	+	—	—	—	—
	5	+	+	+	+	+	—	—	—
	6	+	+	+	+	+	—	—	—
<i>Hc 2</i>	<i>Hi</i> 1	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	+	+	—	—	—	—	—	—
	3	+	—	—	—	—	—	—	—
	4	+	—	—	—	—	—	—	—
	5	+	+	—	—	—	—	—	—
	6	+	—	—	—	—	—	—	—

Serum	Stam	Serumverduunning							Con- trôle
		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	
<i>Hc 2</i>	<i>Hc 1</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	-	-
	3	+	+	+	+	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-
	5	+	+	+	+	-	-	-	-
	6	+	+	+	+	-	-	-	-

+

 : geen uitvlokking.

±

 : zeer geringe uitvlokking.

-

 : geheele of gedeeltelijke uitvlokking.

Contrôle : antigeen + physiologische NaCl.

De uitvlokking deed zich voor als een sluier.

De beoordeeling had plaats na een verblijf van de buisjes in de broedstovf van 37° C. gedurende 1 nacht.

Uit de tabellen blijkt, dat door *Hi*-stammen met *Hc*-serum en door *Hc*-stammen met *Hi*-serum slechts een lage agglutinatie-titer werd bereikt. *Hc*-serum bevatte dus weinig agglutinenen voor *Hi* en omgekeerd. De onderzochte *Hi*- en *Hc*-stammen gaven echter een hooge titer met heteroloog serum van eigen soort. Dit gold tevens voor *Hi*, niettegenstaande het feit, dat de *Hi*-groep als heterogeen bekend staat.

Conclusie: Tusschen *Hi* en *Hc* bestaat slechts een geringe agglutinatorische verwantschap.

AETIOLOGISCHE BETEKENIS.

A. VAN *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*.

Over het al of niet veroorzaken van influenza door de bacil van Pfeiffer is in de literatuur veel strijd gevoerd. Door het vrij regelmatig voorkomen van *Hi* bij influenza scheen zijn beteekenis vanzelfsprekend. Een afdoend bewijs werd echter niet gegeven. Met de bacil, althans bij proefdieren, de ziekte op te wekken, was niet overtuigend gelukt. PFEIFFER en zijn aanhangers hielden vast aan de primaire rol van *Hi*. Hoewel zij hiervoor het bewijs ook niet konden leveren, bouwden zij op het feit, dat er niets was dat er tegen pleitte. Hierbij sloten aan de proeven van BLAKE en CECIL, 1922 bij apen. Door intraperitoneale passage van *Hi*, eerst door muizen, daarna door caviae, konden zij de virulentie van *Hi* zóó doen stijgen, dat door applicatie ervan op de slijmvliezen van neus en mond bij apen een infectie ontstond, die veel geleek op de influenza van de mensch. Een groote schakel in het natuurlijke ziektebeeld ontbrak evenwel. Spontane besmetting door contact kwam niet voor. De apen moesten kunstmatig besmet worden.

Een groot bezwaar voor een overtuigend bewijs in de richting van filtreerbaar virus of bacil was steeds het ontbreken van een geschikt proefdier voor proeven met influenzavirus. De onderzoekingen van ANDREWES, LAIDLAW en SMITH kregen vooral door het vinden van een zoodanig proefdier groote beteekenis.

In 1933 toonden de Engelsche onderzoekers SMITH, ANDREWES en LAIDLAW aan, dat de fret een gevoelig proefdier voor influenzavirus was. Filtraten — door filters met

0,6 micra poriëngrootte of zelfs door membranen met 0,25 micra poriëngrootte — van keelspoelingen van influenza-patiënten gaven een typisch ziektebeeld bij de fret na intranasale toediening. Filtraten van keelspoelingen van menschen, die niet lijdende waren aan influenza gaven geen ziekte bij de fret. Hiermede was de aanwezigheid van een filtreerbaar virus bij influenzapatiënten aangetoond. Viruspassage was mogelijk. Door contact kon de ziekte bij de fret worden overgebracht. Na herstel waren fretten immuun voor hetzelfde filtraat. Serum van een herstelde fret neutraliseerde sterke virusemulsies, normaal fretserum deed dat niet. Het symptomencomplex vertoonde weinig verandering, wanneer het filtraat tezamen met *Hi* werd toegediend. Er bestond verwantschap tusschen filtreerbaar virus van humane influenza en filtreerbaar virus van varkensinfluenza (SHOPE).

Ook varkensinfluenzavirus gaf dezelfde symptomen bij de fret. Ook hierbij was passage in serie mogelijk, zoowel door kunstmatige besmetting als door contact en kon gelijktijdige toediening van filtreerbaar virus en *Haemophilus influenzae suis* weinig verandering in het ziektebeeld brengen.

Er was een groote mate van kruisimmunitet bij de fret tusschen filtreerbaar virus van mensch en varken. Door deze antigene verwantschap werden beide virus op één lijn gesteld. Dit was nog meer het geval door de proeven van ELKELES 1934, waarbij bleek, dat het filtreerbare virus van de Engelsche onderzoekers, vooral in combinatie met *Hi*, longveranderingen bij biggen kon geven. Daar door de proeven van SHOPE vaststond, dat het varkensinfluenzavirus een primaire rol vervult bij varkensinfluenza, werd indirect een bewijs geleverd voor de aetiologische beteekenis van humaan influenzavirus.

Eind 1934 maakten ANDREWES, LAIDLAW en SMITH een vervolg van hun onderzoekingen bekend. Muizen bleken

gevoelig te zijn voor humaan en varkensinfluenzavirus. Zij maakten gebruik van de vinding van SHOPE — die door hen bevestigd werd — dat fretten intranasaal geïnfecteerd met varkensinfluenzavirus onder aetheranaesthesie ernstiger ziek worden. Muizen werden intranasaal ingedruppeld onder lichte aetheranaesthesie met humaan of varkensinfluenzavirus. Bij een gedeelte der muizen ontstonden typische longveranderingen. Zoowel humaan als varkensinfluenzavirus was bij muizen in passage voort te kweken.

De onderzoekingen van ANDREWES, LAIDLAW en SMITH werden in Amerika door FRANCIS 1935 bevestigd. SMITH 1935 en FRANCIS 1935 konden tevens uit influenzamateriaal in kuikenembryonaalweefsel een filtreerbaar virus kweken, hetwelk typische longveranderingen bij muizen gaf. In hun culturen konden geen elementairlichaampjes of chlamidozoën gevonden worden. Terwijl bij de Engelsche onderzoekers de longen van zieke dieren veelal steriel bleken bij aëroob kweken, kon FRANCIS hierin bij een zeker percentage bacteriën aantoonen.

De Duitsche onderzoeker KAIRIES 1936 kon: 1. met griepmateriaal van menschen, 2. met materiaal, afkomstig van zieke fretten, dat hem toegezonden was door de Engelsche onderzoekers, 3. met materiaal van „Ferkelgrippe” van Köbe en 4. met materiaal van varkensinfluenza van Shope, het typische ziektebeeld bij de fret opwekken; met materiaal van Shope en Köbe ook zonder haemophiele bacillen. Steeds konden echter bij de zieke fretten influenza-achtige bacillen, die later tot het geslacht *Pasteurella* werden gerekend, of streptococcen geïsoleerd worden. Ook met materiaal van zieke muizen, eveneens van de Engelsche onderzoekers, waren muizen te infecteren. Uit deze muizen waren steeds streptococcen te isoleeren, die in reincultuur ook zware longveranderingen bij de muis konden veroorzaken. Merkwaardig was, dat antiserum, afkomstig van de Engelsche onderzoekers, het-

welk bereid was bij het paard, ook beschutte tegen de streptococceninfecties bij muizen. Nu bleken bij gezonde fretten ook dragers van de genoemde influenza-achtige bacillen voor te komen. Door meermalen onder narcose glycerine intranasaal in te spuiten, kon bij een dergelijke drager een atypische ziekte worden verkregen. Ook blootstellen aan vochtige koude kon bij de gezonde bacillendragers een ziekte met hoesten veroorzaken. Spontane ziektegevallen met een typisch ziektebeeld werden eveneens bij bacillendragers waargenomen. KAIRIES meent daarom, dat influenzamateriaal de fret alleen ziek maakt, omdat het de soorteigen kiemen van de fret actief maakt. Door aethernarcose, waardoor minder resistentie, zou dit nog bevorderd worden. Hij blijft de oorzaak van influenza zoeken in *Hi*.

De onderzoekingen van KAIRIES verzwakken inderdaad de Engelsche bevindingen, maar konden die niet weerleggen. Hoewel door de Engelsche onderzoekers slechts een beperkt aantal proeven werd verricht, lijkt mij — gelet op de verwantschap met varkensinfluenzavirus van Shope — hun filtreerbaar virus toch de meest waarschijnlijke primaire oorzaak van influenza. Of *Hi* een secundaire rol vervult, zooals ANDREWES, LAIDLAW en SMITH aangaven, dan wel medeoorzaak is, zooals *Haemophilus influenzae suis* bij varkensinfluenza, zal dan nog moeten blijken.

De pathogene beteekenis van *Hi* bij influenzameningitis is nog onbevredigend opgelost. Onderzoekingen van MARGARET PITTMAN 1931 e.a. gaven hier nieuwe gezichtspunten (zie „Andere haemophile bacillen”). Daar KAIRIES en SCHMIDT 1936 deze en daarbij aansluitende onderzoekingen niet in aanmerking namen, gaven ze een eenigszins verward beeld van de pathogeniteit van *Hi*. De toxische eigenschappen van de soort *Hi* als geheel werden te hoog aangeslagen. Daarmede in verband zijn ook de grootere verwachtingen, welke KAIRIES heeft ten opzichte van *Hi* bij influenza, beter te begrijpen.

B. VAN HAEMOPHILUS CORYZAE.

Reeds vroeg in het bacteriologische tijdperk werd *Hi* ontdekt. Door het ontbreken van een geschikt proefdier, was een filtreerbaar virus bij influenza moeilijk aan te toonen en hield men zich aan wat men had: de bacil. Het vinden van een geschikt proefdier voor influenzavirus was een groote stap vooruit.

Aetiologische proeven voor coryza konden bij kippen genomen worden en hierbij was geen surrogaat-proefdier noodig. Nooit gelukte het een filtreerbaar virus aan te toonen. Veel bacillen werden als oorzaak aangenomen, maar een typisch ziektebeeld werd hiermee nooit verkregen. Veel houvast had men niet. Meest werden nog vertegenwoordigers van het geslacht *Pasteurella* als oorzaak genoemd. Eerst na een lange ontwikkeling van de bacteriologie ontdekte DE BLIECK 1931 *Hc* als oorzaak van coryza.

1. FILTREERBAAR VIRUS ?

Het duurde eenige jaren voordat de ontdekking van DE BLIECK goed doorgedrongen was.

In 1934 verscheen in Amerika een uitvoerig onderzoek, — zich uitstrekkende over eenige jaren — van MARGARET LEWIS en ELIZABETH MUELLER, waarvan de opzet was een filtreerbaar virus te vinden bij de „common cold in chickens”. Alle mogelijke filters werden onderzocht, veel proeven werden genomen, maar een filtreerbaar virus kon niet worden aangetoond. Celinsluitsels kwamen niet voor.

NELSON 1933, DELAPLANE, ERWIN en STUART 1934 en DE BLIECK 1934 konden door filtratie geen filtreerbaar virus aantonen bij coryza, maar allen schreven de oorzaak van deze ziekte toe aan een haemophiele bacil.

DE BLIECK vond, dat virulent neusexudaat, bewaard in een glycerinemengsel of bij 0—4° C. of in vacuum zeer spoedig (na 4 dagen) niet meer infectieus was. Het karakter van een filtreerbaar virus ontbrak dus. De contagiositeit

was die van een filtreerbaar virus, maar ook een zeer snel aantastende bacil was mogelijk.

Door mij werden infectieproeven genomen met filtraten van coryzamateriaal door Berkefeld V (zie onderstaand overzicht). Was een filtreerbaar virus, gaande door 0,8—1,2 micra groote poriën, al of niet in combinatie met een bacil, de oorzaak van coryza? Deze filtraten, zoowel van jonge als van oude gevallen van coryza, waren niet infectieus. Materiaal, gereed voor filtratie — gebezigd als contrôlemateriaal — was steeds infectieus en gaf een lang ziekteverloop. 1 cc. Filtraat of 1 cc. contrôlemateriaal werd gebruikt voor besmetting, intranasaal en door de gehemelte-spleet.

Door Berkefeld V werd dus een werkzaam bestanddeel tegengehouden. Mogelijk was, dat naast een filtreerbaar virus een tweede bestanddeel, in de vorm van een bacil, noodig was en dat deze bacil tegengehouden werd door het filter. Deze bacil kon: òfwel geen bijzondere eischen stellen en op agar groeien, òfwel bijzondere eischen stellen, zooals b.v. *Hc*.

Met contrôlemateriaal werd een agarplaat geënt. Na 24 uren bebroeden werd de zoo verkregen mengcultuur van koloniën gesuspendeerd met een weinig physiologische NaCl. Tezamen met filtraat — van ieder $\frac{1}{2}$ cc. — werd geïnfecteerd. Ook nu werd geen coryza opgewekt. Het achtergebleven bestanddeel uit het contrôlemateriaal was dus geen op agar groeiende bacil of mengsel van bacillen.

Het ziektebeeld van *Hc* alleen en van *Hc* + filtraat was hetzelfde. Er was dus ook geen reden om hierbij aan een filtreerbaar virus te denken.

Een filtreerbaar virus, passeerende door Berkefeld V, al of niet in combinatie met bacillen, kon niet vastgesteld worden.

Overzicht :

Filtraat	Filtraat + Hc	Filtraat + agar- plaat	Contrôle- materiaal	Hc
—	+	—	++	+

- ++ : infectieus, lang ziekteverloop.
 + : infectieus, kort ziekteverloop.
 — : niet infectieus.

Onderzocht werden de filtraten van 6 jonge en van 6 oude gevallen van coryza, nl. van die, welke verkregen werden bij de filtraties, vermeld onder „Filtreerbaarheid”.

2. HAEMOPHILUS CORYZAE ?

Zoals reeds gezegd werd, schreven DE BLIECK 1931, NELSON 1933, DELAPANE, ERWIN en STUART 1934, CALISTA ELIOT en MARGARET LEWIS 1934 en SCHALM en BEACH 1934 de oorzaak van coryza toe aan een haemophiele bacil. De beschreven bacillen werden in dit onderzoek echter als niet identiek beschouwd (zie „Literatuur”).

DE BLIECK verkreeg met Hc „cultuurcoryza”. De verschijnselen van cultuurcoryza en natuurcoryza waren — behalve de ziekteduur, die voor cultuurcoryza steeds kort was en in sommige gevallen het incubatietijdperk — dezelfde. Terwijl het langste ziekteverloop van cultuurcoryza 18 dagen was, kon natuurcoryza tot 9 maanden en langer duren. Cultuurcoryza kon kunstmatig en door contact overgebracht worden. Door het blootstellen aan koude van geïnfecteerde dieren, infectie van dieren met Hc + andere bacillen (geïsoleerd uit virulent neusexudaat), superinfectie van cultuurcoryzadieren met Hc en infectie van dieren met Hc + filtraat kon bij cultuurcoryza geen langdurend chronisch verloop verkregen worden.

Door mij werden in de loop van dit onderzoek voor verschillende doeleinden infectieproeven met Hc genomen.

Versch geïsoleerde bloedbouillon- of agar-bloedculturen van *Hc* gaven een ziekte duur van 5—18 dagen, gemiddeld 6—8 dagen; incubatie 1—2 dagen, meestal 1 dag, soms 5 dagen. Conjunctivaal geïnfecteerd was de incubatie 2 dagen. Bij dieren, die oedemateuze zwellingen kregen, was de ziekte duur vaak het langst. Met bloedbouillon + verhitte aardappel werd het langste ziekteverloop verkregen, nl. 1 maal 25 en 1 maal 32 dagen.

Pogingen om een langdurend ziekteverloop te verkrijgen mislukten. Beproefd werden: neuspassageënting van *Hc*, neuspassageënting van *Hc* in combinatie met *Staphylococcus aureus* en superinfectie van cultuurcoryzadieren met *Staphylococcus aureus*. Wel konden oedemateuze zwellingen bij cultuurcoryzadieren in passage opgewekt worden.

Toegegeven moet worden, dat de oorzaak van het verschil in ziekte duur tusschen cultuurcoryza en natuurcoryza nog niet geheel werd opgelost. Verschillende overwegingen zouden aannemelijk kunnen maken, dat bij natuurcoryza *Hc* ook de eenige oorzaak is. Deze overwegingen zijn de volgende:

1. dat geen filtreerbaar virus kon worden aangetoond;
2. dat ook bij natuurcoryza in vele gevallen een kort verloop voorkwam;
3. de mogelijkheid, dat we voor *Hc* nog geen volkomen geschikt medium hebben en bij isolatie dadelijk een verzwakking van *Hc* optreedt met als gevolg een goedaardig verloop. Typisch was in dit verband, dat met een bijzonder medium het langste ziekteverloop werd verkregen.

Echter gaven de jongste onderzoekingen van NELSON een andere verklaring voor het verschillend verloop van natuur- en cultuurcoryza.

NELSON onderscheidde coryza in twee typen, een met korte (1—3 dagen) en een met lange (9—31 dagen) incubatie. Alleen bij het type met korte incubatie kon hij zijn

coryzabacil isoleeren. Door latere onderzoekingen bleek hem, dat bij het type met lange incubatie regelmatig cocco-bacillaire lichaampjes gevonden konden worden, die overeenkomst vertoonden met elementairlichaampjes van pokken en andere virusziekten en die tevens leken op rickettsiae. Deze lichaampjes konden niet gevonden worden bij gezonde en cultuurcoryzadieren. De aetiologische beteekenis van genoemde lichaampjes werd nog niet afdoende aangetoond, wel werden ze gekweekt in weefselculturen met kuikenembryo, nadat gebleken was, dat het kweken op bacillaire voedingsmedia faalde. Tevens was het hem gelukt met een filtraat van exudaat, afkomstig van een coryzageval met lange incubatie, door een Berkefeld V-filter, die coryzabacillen liet passeeren, na 27 dagen coryza op te wekken. Uit hetzelfde filtraat waren in een agar-bloedmedium geen bacillen te kweken. Hierdoor komen, hoewel de symptomen, behalve de incubatie, grootendeels dezelfde waren, beide typen meer als afzonderlijke ziekten naast elkaar te staan. In één geval veranderde een coryzastam met lange incubatie in een met korte. Hiermede ging gepaard, dat *Haemophilus gallinarum* nu wel gevonden werd.

De door mij onderzochte gevallen van coryza hadden aanvankelijk alle een korte incubatie. Ook in de gevallen met de langste incubatie van 5 dagen kon *Hc* geïsoleerd worden. Later ontmoette ik ook stammen met langere incubatie, waarbij alle pogingen om *Hc* te isoleeren mislukten. Deze stammen hadden constant hun lange incubatieperiode, wat ook beproefd werd om die te veranderen in een korte.

Nu hadden in de meeste ziektegevallen van NELSON zowel de dieren met korte als die met lange incubatieperiode een lang ziekteverloop. Ook mijn coryzastammen met lang incubatietijdperk hadden alle een lang ziekteverloop. Een groot gedeelte van de door mij onderzocht coryzastammen met kort incubatietijdperk had daarentegen een kort

ziekteverloop. Eén stam was daarbij, die constant een ziekteverloop vertoonde van 6—10 dagen.

Om nu het verschil in ziekteduur tusschen natuurcoryza en cultuurcoryza te verklaren, lijkt het mij juist bij vele gevallen van langdurende natuurcoryza met korte incubatietijd, zoowel in Amerika als in ons land, een combinatie van twee soorten van ziekte te veronderstellen. Het bovenaangehaalde eene geval van verandering van incubatietijdperk kon dan een voorbeeld zijn voor het ontstaan van zoo'n combinatie.

Voor een combinatie van twee ziekten bij langdurende natuurcoryza met korte incubatietijd pleiten ook mijn waarnemingen:

1. bij enkele gevallen, waarbij na eenige dagen incubatie gedurende 10—12 dagen rhinitis optrad, die daarna voor een tijd van 6—8 dagen verdween en vervolgens weer opnieuw optrad;
2. bij een filtraat door Berkefeld V, dat — ondanks een verzorgde afzondering van het ermede behandelde dier — coryza gaf na 28 dagen. Het betrof een filtraat uit materiaal van coryzastammen waarbij *Hc* meermalen geïsoleerd was.

CORYZA INFECTIOSA GALLINARUM.

A. PROEFDIEREN.

Steeds werden jonge kippen, van 6 weken tot 3 maanden oud, gebruikt. De dieren werden aan het instituut opgefokt of op leeftijd van 3—6 weken betrokken van bedrijven, die vrij van coryza waren. Alle dieren waren geënt tegen pokken en diphterie met antidiphterin van de Blicck.

CALISTA ELIOT en MARGARET LEWIS gebruikten kuikens van 1—7 dagen voor hun infectieproeven. Deze kuikens waren nooit in contact geweest met volwassen dragers, waardoor de mogelijkheid, dat ook zij dragers waren, uitgesloten werd.

De door mij gebruikte proefdieren waren geïsoleerd opgefokt. Door het gebruik van jonge dieren werd de meest natuurlijke toestand geschapen voor infectieproeven met coryza. In de natuur komt immers coryza vooral en het eerst voor bij jonge dieren, zelden bij kuikens. Door de geïsoleerde opfok was het drager-zijn uitgesloten.

Voor het aanhouden van coryza werd geënt van dier op dier. Met een druppelaar werd slijm opgezogen van een aangetaste kip. Dit neusexudaat werd goed gemengd met een weinig physiologische NaCl door herhaald opzuigen in de druppelaar. Geïnfecteerd werd met dezelfde druppelaar door de neus en door de gehemeltepleet.

Voor iedere proef werd een afzonderlijke kooi gebruikt in dezelfde ruimte. Kooien met contrôleproefdieren bleven steeds vrij van coryza. Overbrenging door indirect contact kwam niet voor. Cultuur- en natuurcoryza met korte en met lange incubatie werden gescheiden gehouden in aparte ruimten.

B. ZIEKTE.

Wat hier gezegd wordt, betreft in de eerste plaats de coryza met korte incubatie. Van de coryza met lange incubatie waren te weinig stammen in observatie en deze werden niet voldoende onderzocht — hetgeen ook niet in de lijn van dit onderzoek lag — om hiervan een goede beschrijving te kunnen geven. Over het algemeen kan gezegd worden, dat bij de coryza met lange incubatie, behalve de incubatie, geen van de coryza met korte incubatie afwijkende eigenschappen werden aangetroffen.

Wat de coryza met korte incubatie betreft, de kortdurende gevallen hiervan hadden dezelfde symptomen als cultuurcoryza. Experimenteel geïnfecteerde dieren vertoonden na een korte incubatie als eerste verschijnsel het warm worden van het voorste gedeelte van de kam. Dit was een zeker teeken, dat na 24 uren neusuitvloeïing aanwezig zou zijn en was vooral goed te constateeren bij hanen. De neusuitvloeïing was unilateraal of bilateraal. Een beginnende unilaterale uitvloeïing werd later meestal bilateraal of unilateraal aan de andere zijde. In het begin was de uitvloeïing even dun, daarna dik muceus. Bij langdurende gevallen kon de uitvloeïing van grijs-muceus overgaan in geel-muceus. Dit was ook 't geval bij de langdurende cultuurcoryza. Het gele slijm was gemengd met veel bacteriën en leucocyten. In sommige vergevorderde stadia waren tevens kleine kaasgranula aanwezig, tezamen met slijm. Juist dat geel worden van het grijze neusexudaat onderscheidde een groot gedeelte van de langdurende gevallen van de kortdurende. Het neusexudaat was opgehoopt in de neusgangen en in de orbitaalsinus, kon gemakkelijk uit de neusopeningen gedrukt worden of was hier aanwezig. Vaak waren de neusopeningen bedekt met een laagje stof.

Soms was het ziektebeeld ingewikkelder door een uitbreiding van de ontsteking naar het periorbitale weefsel. De oogen waren dan erg gezwollen en betrand. Gesloten

zijn der oogleden met verkleving kon hieruit ontstaan.

Deze complicatie kon voortduren als de neusuitvloeïing verdwenen was en dan langzaam teruggaan. Meestal was ze reeds eerder genezen. Ook kwam het voor, dat na eenige tijd alleen voortbestaan der gezwollen oogen, de neusuitvloeïing terugkeerde.

Bij sommige zware hoenderrassen kon de kop geheel gezwollen zijn. Vooral was hierbij duidelijk een zwelling van het ondertongweefsel.

De slijmvliezen van neus en sinus waren met veel slijm bedekt en in de beginstadia rood. Seriecoupes, gemaakt van neus en orbitaalsinus, vertoonden ontstoken slijmvliezen met veel ontstekingscellen. Behalve de veranderingen aan de slijmvliezen waren geen afwijkingen te constateeren. Secties waren steeds negatief. DE BLIECK kon met orgaanmateriaal, bloed en tracheaalslijm geen coryza opwekken. Door mij waren uit bloed en organen geen *Hc*-bacillen te kweken. De beschreven coryza was dus een lokaal proces, beperkt tot neus met sinus en hun omgeving.

Volgens NELSON daarentegen kon bij coryza tevens het bovenste deel van de trachea ontstoken zijn. SCHALM en BEACH constateerden in sommige gevallen van coryza, waarbij zij coryzabacillen aantroffen, eveneens een uitbreiding naar de trachea, bronchiën en longen.

De mortaliteit van de geobserveerde coryzagevallen was gering. In chronische gevallen konden de dieren sterven door uitputting. Door een voortdurende belemmering van de ademhaling met als gevolg een slechte verbranding en stofwisseling, was deze uitputting zeer goed te verklaren. Een veel grootere mortaliteit — van 50—80% — beschreven SCHALM en BEACH. Ook DELAPLANE, ERWIN en STUART hadden een grootere sterfte vooral bij jonge dieren.

Door het voorkomen van twee soorten van coryza vereischt het immuniteitsvraagstuk een nieuw onderzoek.

Enkele punten kunnen evenwel naar voren worden gebracht betreffende de coryza met korte incubatie.

1. De chronische gevallen hiervan gaven immuniteit. Hoelang deze immuniteit tegen een nieuwe infectie duurde, werd niet nagegaan.
2. Na het doorstaan van een kortdurende natuurcoryza waren de dieren maar gedeeltelijk immuun. Een gedeelte der dieren — opnieuw besmet met materiaal, dat anders een chronisch verloop gaf — kreeg een korter verloop der ziekte, waarmede gepaard ging een langere incubatie. Een dergelijk verloop geeft weer aanleiding om bij langdurende natuurcoryza met korte incubatie een tweeledige natuur te veronderstellen. Een ander gedeelte behield dan een chronisch verloop met korte incubatie. Bij een kortdurende natuurcoryza waren kippen echter immuun voor milde natuurcoryza en cultuurcoryza. Deze geringe immuniteit was na eenige tijd echter weer verdwenen. In een geval reeds na een week.
3. Cultuurcoryza gaf immuniteit voor cultuurcoryza, ook slechts voor korte duur. Zes dagen na het verdwijnen der ziekte bleek bij cultuurcoryza een dier, dat onderzocht werd, ook onvatbaar voor de natuurcoryzastam met ziekteverloop van 6—10 dagen.

Een afdoende therapie voor coryza werd nog niet gevonden. Geen van de aangegeven middelen heeft zich kunnen handhaven. De therapie zal rekening hebben te houden met twee soorten van coryza. Door het lokaal karakter der ziekte en het gebleken antagonisme van *Hc* en *Pasteurella avicida* (zie „Groefactoren”, blz. 79) zou een onderzoek naar de curatieve waarde van antagonistische bacillen van *Hc* op zijn plaats zijn.

II. ANDERE HAEMOPHIELE BACILLEN.

FILDES 1924 verdeelde de haemophiele bacillen naar hun groeifactoren in 1. bacillen die X- en V factor, 2. bacillen die alleen X factor en 3. bacillen die alleen V factor noodig hadden. Deze indeeling van FILDES werd ook hier gevolgd. Afzonderlijk werden behandeld enkele nieuwe vertegenwoordigers van deze groep, waarvan de groeifactoren nog onbepaald waren.

1. VERTEGENWOORDIGERS DIE X- EN V FACTOR NOODIG HADDEN.

Bacil van Cohen (*Bac. meningitidis cerebrospinalis septicaemiae*). Bij kinderen komen gevallen van meningitis met bacteriaemie voor, waarbij in het lumbaalvocht en bloed haemophiele bacillen aanwezig zijn. Ook kan een combinatie van meningitis, arthritis en bacteriaemie of enkel en alleen een arthritis met haemophiele bacillen voorkomen.

PFUHL en WALTER 1896 en later SLAWIJK 1899 beschreven reeds het voorkomen van etterige influenzameningitides. COHEN 1909 vestigde er opnieuw de aandacht op. Hij toonde aan, dat influenzameningitis en epidemische influenza vrij van elkaar stonden en dat de bij influenzamenigitis geïsoleerde *Hi*-stammen in staat waren na intraveneuze injectie konijnen aan bacteriaemie te doen sterven. Hoewel morfologisch en cultureel de meningitisstammen niet afweken van *Hi*, meende COHEN, vooral op grond van het pathogeen karakter der meningitisstammen een aparte soort beschreven te hebben. De vraag bleef echter bestaan of die pathogeniteit een voldoende reden voor afscheiding was. Tevens bleek reeds een jaar later (1910) aan COHEN en FITZGERALD, dat er ook meningitisstammen waren, die geen

bacteriaemie bij konijnen konden verwekken. Waren bij de publicatie van de onderzoekingen van COHEN nog geen bacteriaemie bij konijnen veroorzakende sputumstammen beschreven PARKER en PARKER 1922, URECH en SCHNIJDER 1925 beschreven ook dergelijke stammen. MARTHA WOLLSTEIN 1919 en KAPSENBERG 1929 kwamen op grond van serologische onderzoekingen en pathogeniteit voor konijnen tot de overtuiging, dat een deel der meningitisstammen onder *Hi* een afzonderlijke plaats innam. Deze door COHEN aangegeven afwijkende pathogeniteit voor konijnen leek zich willekeurig te bewegen door meningitisstammen, evenwel ook door sputumstammen. MARGARET PITTMAN 1931 bracht de eerste beperking in deze willekeur. Door haar werden meningitis- en sputumstammen onderzocht. Er bleken twee soorten van *Hi* te bestaan, S-stammen en R-stammen, die in elkaar konden overgaan. De S-koloniën (Smooth) waren glad en vertoonden het verschijnsel der „bluish iridescense”, d.w.z. iridiseerden bij schuin doorvallend kunstlicht. De R-koloniën (Rough) waren ruw van oppervlakte, kleiner dan de S-koloniën en niet veelkleurig bij schuin opvallend licht. Alleen de S-stammen waren en bleven doodelijk pathogeen voor konijnen en gaven bacteriaemie. WRIGHT en WARD 1932 konden in vitro met gedefibrineerd konijnenbloed de groei van een klein aantal S-bacteriën niet tegengaan, wel van 9.000.000 R-bacteriën. Dit wees in de richting, dat alleen S-stammen in staat waren bacteriaemie bij konijnen te verwekken. MULDER 1934 beschouwde de S-stammen als identiek met de bacil van Cohen. Ook alleen met S-stammen kon MULDER bacteriaemie bij konijnen verkrijgen. De S-stammen werden vooral aangetroffen bij meningitisgevallen, ook kwamen ze echter voor bij pneumonieën, in pleura-empyemen en etterig sputum bij bronchitis. Daar S-, maar ook R-stammen onder de meningitisstammen voorkwamen, was te begrijpen, dat verschillende resultaten voor de pathogeniteit bij konijnen

van meningitisstammen verkregen werden.

Resumeerend bleken er dus in pathogeniteit voor konijnen van *Hi* afwijkende stammen te bestaan, die het eerst beschreven werden door COHEN, evenals *Hi* X- en V factor noodig hadden en tevens afweken in groei, namelijk met een sterkelichtschifting der koloniën bij schuin doorvallend kunst- of zonlicht. Deze afwijkende stammen kwamen vooral voor bij meningitisgevallen. Waarschijnlijk zullen deze stammen tot een afzonderlijke groep gerekend moeten worden binnen het genus *Haemophilus influenzae*.

Bacillus koch-weeks (*Bacterium aegyptiacum*, LEHMANN en NEUMANN). In Egypte was in 1883 een commissie onder leiding van KOCH belast met het cholera-onderzoek. Door deze commissie werd o.a. ook aandacht besteed aan de in Egypte voorkomende oogontstekingen. Bij een vorm van conjunctivitis, met mucopurulent exudaat, infectieus, werden door KOCH slanke staafjes aangetoond. Culturen van deze staafjes werden niet aangelegd. In 1887 werden door WEEKS in New-York overeenkomstige staafjes beschreven bij infectieuze conjunctivitis. Hij verkreeg groei van deze staafjes op ½% agar, echter alleen in combinatie met een diphteroïde bacil. Met mengculturen van deze geïsoleerde bacil en de diphteroïde bacil kon hij conjunctivitis bij de mensch opwekken. Deze door KOCH ontdekte en door WEEKS geïsoleerde bacil werd later bekend onder de naam *Bac. koch-weeks*.

In de conjunctiva gevonden, werd *Bac. koch-weeks* als een aparte soort beschouwd. Al spoedig zag men echter overeenkomst met *Hi*. SCHNEIDER 1922, KNORR 1924 en anderen konden geen enkel verschil aantoonen tusschen *Bac. koch-weeks* en *Hi* en beschouwden ze als gelijk.

Bac. koch-weeks zou groeien op ½% agar (WEEKS 1887, MORAX 1896, v. NESTLINGER 1918) en goed groeien op serum- en ascitesagar (MORAX 1896, AXENFELD 1913

e.a.). KNORR 1924, voldoende doordrongen van de groote gevoeligheid van *Hi* voor bloed en bloedderivaten toonde aan, dat *Bac. koch-weeks* eveneens haemofiel was. Hij verklaarde de groei op agar, serum- en ascitesagar van vroegere onderzoekers door aan te nemen, dat ze bloed of bloedbestanddeelen mede overgebracht hadden op of verwerkt hadden door hun media. In overeenstemming met deze aanname was: 1. dat MORAX alleen groei verkreeg bij ernstige gevallen of met veel exudaat, dus in gevallen waarbij groote kans was op bloedbijmenging; 2. dat voortkweken slechts gelukte in één of een paar generaties; 3. dat AXENFELD verband constateerde tusschen virulentie en kweekbaarheid en 4. dat KNORR slechts bij gebruik van een bepaalde ascitesvloeistof in ascitesagar groei verkreeg. Reeds DAVIS 1921 toonde aan, dat *Bac. koch-weeks* reuzenkoloniën vormde rondom andere bacteriën, dat *Hi* geen reuzenkoloniën vormde rondom *Bac. koch-weeks* en omgekeerd, dat dus *Bac. koch-weeks* V factor nodig had en geen V factor kon vormen. Dit werd bevestigd door KNORR 1924 en FILDES 1924. FILDES 1924 toonde aan, dat *Bac. koch-weeks* alleen groeide in het peptonNaCl-basismedium met haematine en gistextract, dus X- en V factor nodig had.

Bac. koch-weeks zou de vorm van een staafje hebben, *Hi* die van een coccobacillus (MORAX 1896, AXENFELD 1913 e.a.). WEICHELBAUM en MÜLLER 1899 alsmede JUNDELL 1902 wezen op het voorkomen van coccovormen, ook bij *Bac. koch-weeks* en op de overeenkomst van die vormen met *Hi*. VON NESTLINGER 1918, SCHNEIDER 1922 en KNORR 1924 onderscheidten bij *Bac. koch-weeks*, evenals bij *Hi*, typen, nl. een meest voorkomend slank type en een minder vaak voorkomend op *Hi* gelijkend coccotype. SCHNEIDER en KNORR zagen een enkele maal ook nog langdradige typen. De typen konden in elkaar overgaan. Deze vormverschillen werden gevonden bij typische Koch-

Weeks-conjunctivitis, vrijstaande van epidemische influenza. Hiernaast werd nog aangegeven influenzaconjunctivitis, in verband staande met epidemische influenza, die veroorzaakt zou worden door *Hi* (JUNDELL, e.a.). HAMMERSCHMIDT 1921 zag, dat *Hi* in culturen ook vaak een slanke vorm aannam. Resumeerend kon *Bac. koch-weeks* morfologisch dus niet met zekerheid van *Hi* worden gescheiden.

De aanvankelijk aangegeven verschillen tusschen *Bac. koch-weeks* en *Hi* konden niet gehandhaafd blijven. Een gelijkschakeling (KNORR) kon echter slechts oppervlakkig zijn, daar met *Bac. koch-weeks* experimenteel conjunctivitis werd opgewekt bij de mensch (MORAX 1896, WEICHELBAUM en MÜLLER 1899, HOFFMANN 1900, LUERSSSEN 1905), terwijl dit van *Hi* niet met zekerheid bekend was en voorts omdat Koch-Weeks-conjunctivitis en epidemische influenza onafhankelijk van elkaar stonden. Hier bleef daarom *Bac. koch-weeks* in afwachting afzonderlijk geplaatst.

Haemophilus influenzae suis. Deze bacil werd door SHOPE 1931 geïsoleerd uit de longen en andere organen van aan influenza lijdende varkens en door hem onderzocht. Alléén veroorzaakte de bacil geen varkensinfluenza, echter wel in combinatie met een filtreerbaar virus. Een enkele keer was *Haemophilus influenzae suis* als zoodanig pathogeen voor het varken bij intranasale toediening, waarbij een niet contagieus ziektebeeld ontstond. Filtreerbaar virus alleen gaf een mild verloopende zeer contagieuze „filtraatziekte”.

Haemophilus influenzae suis kwam veel overeen met *Hi*. Ze was onbeweeglijk, pleomorph en gramnegatief. Ze bleek X- en V factor noodig te hebben, waarbij als X factor haematine gebruikt werd en als V factor een Berkefeld-filtraat van een streptococcencultuur. Ze vormde reuzenkoloniën rondom andere bacteriën. Agglutinatorisch kwam een

zekere mate van verwantschap naar voren tusschen *Haemophilus influenzae suis* en *Hi*, maar niet geregeld. Chocoladeagar was het beste vaste medium voor *Haemophilus influenzae suis*, verwarmde bloedbouillon het beste vloeibare medium. Voor primaire culturen was agar-bloed (zie blz. 31) het meest geschikt.

2. VERTEGENWOORDIGERS DIE ALLEEN X FACTOR NOODIG HADDEN.

Bacillus haemoglobinophilus canis. Deze bacil werd onderzocht en beschreven in 1903 door FRIEDBERGER, nadat ze reeds door PFEIFFER 1902 was aangetoond. Ze kwam in groote hoeveelheid voor in praeputiaal-etter van honden met praeputiaalcatarrhe. Praeputiaalcatarrhe werd veel gevonden bij volwassen honden, niet bij onvolwassen dieren. FRIEDBERGER kon met de bacil bij jonge honden geen praeputiaalcatarrhe opwekken. Dit gelukte ook niet aan latere onderzoekers, zoodat de beteekenis van *Bac. haemoglobinophilus canis* onbekend bleef. FRIEDBERGER beschouwde de bacil als toevallig in de fluor levende saprophiet. De bacil bleek nauw verwant aan *Hi*, maar niet volkomen eraan gelijk. Ze vormde geen reuzenkoloniën rondom staphylococcen, groeide beter dan *Hi* bij aanwezigheid van weinig haemoglobine (gehaemolyseerd bloed).

DAVIS 1921, KRISTENSEN 1922 en FILDÉS 1924 vonden, dat *Hi* reuzenkoloniën vormde rondom *Bac. haemoglobinophilus canis*, dat dus *Bac. haemoglobinophilus canis* V factor vormde. De bacil van Friedberger vormde geen reuzenkoloniën rondom andere bacteriënkoloniën, had dus geen V factor noodig.

RIVERS 1922 toonde voor het eerst met peptonNaCl + haematine duidelijk aan, dat *Bac. haemoglobinophilus canis* alleen X factor noodig had, geen V factor. Hierdoor groeide de bacil goed met weinig haemoglobine, hetgeen *Hi* niet

vermocht (FRIEDBERGER 1903, KRISTENSEN 1922).

Bac. haemoglobinophilus canis, afhankelijk van de X factor, onafhankelijk van de V factor, vormde zelf V factor.

3. VERTEGENWOORDIGERS DIE ALLEEN V FACTOR NOODIG HADDEN.

De bacillen van deze groep waren vaak, maar niet altijd, plomper van vorm dan *Hi*, hadden meer neiging tot draadvorming, kwamen overigens veel met *Hi* overeen.

Bacillus „X” van Pritchett en Stillman.

PRITCHETT EN STILLMAN 1919 vonden in de kelen van gezonde mensen en van influenzapatiënten een haemolytische bacil, die ze niet plaatsen konden en *Bacillus „X”* noemden. RIVERS EN LEUSCHNER 1921 rangschikten deze bacil onder de haemophile bacillen. Ze kregen reuzengroei van *Bacillus „X”* rondom andere bacteriënkoloniën, geen groeibevordering van *Hi* door deze bacil en omgekeerd. Hiermede was aangetoond, dat *Bacillus „X”* V factor nodig had en geen V factor kon vormen. FILDES 1924 toonde aan, dat *Bacillus „X”* alléén V factor nodig had.

Bacillus „X” was evenzeer een bewoner van gezonde als van zieke kelen en daarom waarschijnlijk onschadelijk.

Bacillus parainfluenzae. *Bac. parainfluenzae* werd gevonden door RIVERS 1922 in twee gevallen van influenza. Bij het eene geval werd de bacil uit de keel geïsoleerd, bij het andere geval uit de trachea. *Bac. parainfluenzae* verschilde van *Hi*, doordat ze alleen V factor nodig had en van *Bacillus „X”* doordat ze niet haemolytisch was.

In 1923 werden door RIVERS EN BAYNE-JONES overeenkomstige bacillen geïsoleerd uit de kelen van katten. In het geheel werden 6 stammen verkregen van 50 onderzochte katten.

MCGAUGHEY 1932 vond *Bac. parainfluenzae* in de larynx

en trachea van gezonde en zieke — coryzadieren e.a. — kippen. Hij onderscheidde H-stammen en L-stammen. De H- (*heavy growth*) stammen groeiden goed, de L- (*light growth*) stammen groeiden slecht. NELSON 1935 vond bij coryzakippen eveneens stammen, die alleen V factor noodig hadden en niet pathogeen waren.

Ook bij mijn onderzoek werden uit neusexudaat van coryzakippen meerdere stammen geïsoleerd, die alleen V factor noodig hadden en niet haemolytisch waren. Ze onderscheidden zich van *Hc* doordat ze beter groeiden, grootere koloniën vormden en groeiden in peptonNaCl + gistextract. Ze gaven echter nooit coryzaverschijnselen.

4. VERTEGENWOORDIGERS WAARVAN DE GROEIFACTOREN ONBEKEND WAREN.

Bacterium influenzae suis. WALDMANN en KÖBE 1933 onderzochten een, vooral bij jonge varkens, in Duitsland enzoötisch voorkomende ziekte, waarbij longveranderingen op de voorgrond traden. Ze noemden deze ziekte „Ferkelgrippe”. Evenals bij de varkensinfluenza van Shope, vonden zij, dat bij de „Ferkelgrippe” een filtreerbaar virus en een haemophile bacil een rol speelden. De haemophile bacil noemden zij *Bact. influenzae suis*. Filtreerbaar virus alléén gaf een mild verloopende „filtraatziekte”, waarbij geen longveranderingen optraden. *Bact. influenzae suis* alléén gaf geen ziekte. Filtreerbaar virus + *Bact. influenzae suis* gaf in enkele gevallen „Ferkelgrippe” met typische longveranderingen. *Bact. influenzae suis* was echter niet zoo specifiek verbonden aan „Ferkelgrippe” als *Haemophilus influenzae suis* aan varkensinfluenza van Shope. Herhaaldelijk werden in de veranderde longen ook andere bacteriën gevonden, terwijl *Bact. influenzae suis* soms niet voorkwam. Ook andere bacteriën — *Bac. bipolaris*, streptococci — konden secundair een pneumonie veroorzaken bij de filtraatziekte. KIRCHEN-

BAUER 1933 vond *Bact. influenzae suis* ook in de trachea van gezonde varkens.

Bact. influenzae suis was onbeweeglijk, pleomorph en gramnegatief. Ze groeide satellitisch (KÖBE, KIRCHENBAUER). De groeivoorwaarden van *Bact. influenzae suis* werden niet onderzocht.

Door mij werden twee uit Riems toegezonden stammen van *Bact. influenzae suis* op groeifactoren onderzocht. Beide stammen groeiden niet in peptonNaCl + haematine + gistextract, hadden dus andere groeivoorwaarden als *Hi* en waarschijnlijk ook als *Haemophilus influenzae suis*.

TERPSTRA 1935 onderzocht bij varkens in ons land eenzelfde ziektebeeld als door WALDMANN en KÖBE onderzocht werd. Hij isoleerde ook een haemophile bacil uit de aangetaste longen van de betreffende varkens. De groeifactoren van deze bacil werden niet onderzocht. Volgens TERPSTRA was nog niet overtuigend bewezen of het influenzavirus van Köbe van pestvirus te scheiden was.

Haemophilus gallinarum. Na mijn onderzoek van *Hc* was te verwachten, dat een beter oordeel gevormd kon worden omtrent de identiteit van *Hc* en de Amerikaanse coryzabacillen.

Voor *Hc* kon het bloed vervangen worden door rauwe aardappel. NELSON 1933 verkreeg geen groei van zijn coryzabacil in bouillon met X- en V factor van plantaardige oorsprong. DELAPLANE, ERWIN en STUART verkregen aanvankelijk (1934) geen groei van hun *Haemophilus gallinarum* in aardappelbouillon volgens Thjötta en Avery, later (1936) was de groei van hun bacil onbevredigend met rauwe aardappel.

Hc had V- en C factor nodig, geen X factor. SCHALM en BEACH 1936 concludeerden uit hun waarnemingen, dat *Haemophilus gallinarum* zoowel X- als V factor nodig had om te groeien. Evenwel werd daarmee nog niet zeker bewezen, dat *Haemophilus gallinarum* ook inderdaad X- en

V factor noodig heeft. Een dergelijke conclusie lijkt mij ongegrond en wel:

1. omdat SCHALM en BEACH als bron voor V factor paardenserum gebruikten, waarin door TJHÖTTA en AVERY e.a. alsmede door mij nooit V factor maar alleen X factor werd aangetroffen;
2. omdat alle media, dienende tot bewijs, slechts een geringe groei gaven, die niet macroscopisch zichtbaar was. Zijzelf zeiden van die media, dat geen ervan gunstig voor de bacil was.

In tegenstelling met mijn bevindingen ten opzichte van *Hc*, verkregen SCHALM en BEACH eveneens groei van *Haemophilus gallinarum* op Levinthalagar.

Er openbaarde zich dus verschil in groeivoorwaarden tusschen de coryzabacil van de Blicck en de betreffende Amerikaansche coryzabacillen. Verder onderzoek van de Amerikaansche coryzabacillen zal moeten uitwijzen of dit verschil gehandhaafd zal kunnen blijven. Bij gelijkheid kwam om reden van prioriteit ook voor de bacil van de Blicck de naam *Haemophilus gallinarum* in aanmerking. Nu werd hiervoor gekozen de naam *Haemophilus coryzae*. Ook al zouden de coryzabacil van de Blicck en de Amerikaansche coryzabacillen identiek zijn, dan nog zou de naam *Haemophilus coryzae* te verkiezen zijn boven die van *Haemophilus gallinarum*, daar deze een geschikte vorm is voor de harmonische bouw van het geslacht *Haemophilus*. Zooals in *Haemophilus influenzae* het verband uitgedrukt werd met influenza, werd in *Haemophilus coryzae* het verband weergegeven met coryza.

III. SYSTEMATIEK.

De „Society of American Bacteriologists” wenschte orde te brengen in de chaos van bacteriologische nomenclatuur en riep hiervoor een comité in het leven. Dit comité meende voor die ordening een goede basis gevonden te hebben in de „Internationale Regels voor botanische Nomenclatuur”, zooals die waren vastgesteld op het Internationaal Congres te Weenen 1905 en te Brussel 1910. Een nieuw geslacht werd gevormd (1917) in de familie der *Bacteriaceae*, hetwelk „*Haemophilus*” genoemd werd. Hiervoor werd de volgende definitie vastgesteld: kleine, niet beweeglijke, gramnegatieve, staafvormige cellen, zonder sporen, obli-gaat parasieten, die het best — of alleen — groeien in tegenwoordigheid van haemoglobine en over het algemeen bloedserum of ascitesvloeistof noodig hebben. Type van soort: *Haemophilus influenzae*.

Doordat bij de vorming van *Haemophilus* niet voldoende rekening werd gehouden met de karakteristieke groeivoorwaarden van *Haemophilus influenzae* — die toentertijd ook nog onvoldoende bekend waren, daar ze zich eerst scherp afteekenden in de publicaties van THJÖTTA en AVERY 1921 — werden de grenzen van dit nieuwe geslacht te ruim genomen. Hierdoor werd plaats geboden aan bacillen met afwijkende eigenschappen, zooals *Bac. pertussis*, *Bac. duplex* en *Bac. ducrey*.

Verschillende onderzoekers, die desondanks „*Haemophilus*” gebruikten, zagen zich genoodzaakt de eischen voor dit geslacht te veranderen, waarbij een afhankelijkheid van groeifactoren verlangd werd.

Deze veranderde beteekenis werd ook in dit werk aan

„*Haemophilus*” gehecht. Er werden alleen bacillen onder gerangschikt, die voor hun groei en voortkweken bepaalde factoren uit bloed noodig hadden, welke factoren eventueel alle of voor een gedeelte vervangen konden worden door factoren uit plantenweefsel of door factoren van bacillen afkomstig. Hierbij behielden echter bacillen die onder een andere benaming beter bekend waren en bacillen waarvoor de geslachtsnaam *Haemophilus* nog zou moeten worden ingevoerd, hun oude benamingen.

De naam *Haemophilus* voor een dergelijk gewijzigd geslacht leek mij op zijn plaats, beter nog dan in zijn oorspronkelijke beteekenis, dit niettegenstaande bepaalde factoren uit bloed vervangen konden worden door factoren van andere herkomst, en wel omdat bloed toch altijd het criterium bleef.

De gevolgde nomenclatuur was eenigszins willekeurig, moest wel willekeurig zijn, daar geen wettige regels gevonden werden. Te weinig werd in het verleden gelet op een juiste classificatie. Dringend deed zich bij mijn onderzoek het gemis voelen van een definitieve regeling.

De coryzabacil van de Blicck heeft V factor noodig en een zeer thermolabiele factor uit bloed of plantenweefsel, welke aangeduid werd als „C factor”. Ze voldoet ook aan de verdere eischen van *Haemophilus*, behoort dus hieronder gerangschikt te worden. Vandaar de naam „*Haemophilus coryzae*”.

Op grond van de behoefte aan groeifactoren kon *Haemophilus* als volgt worden ingedeeld.

Groei-factoren	Soort	Voor-komen	Ziekte	Bijzonderheden
X- en V factor	<i>Haemophilus influenzae</i> (PFEIFFER) Subgroep: Bacil v. Cohen	mensch	1. Influenza secundair? 2. Kindermeningitis door bac. v. Cohen?	Type van soort. Niet haemolytisch; enkele haemolytisch.
	<i>Bacillus koch-weeks</i>	mensch	Koch-Weeks-conjunctivitis	Identiek <i>Hi</i> ?
	<i>Haemophilus influenzae suis</i> (SHOPE)	varken	Varkensinfluenza van Shope in combinatie met een filterbaar virus	
X factor	<i>Bacillus haemoglobinophilus canis</i> (FRIEDBERGER)	hond	praeputiaalcatarrhe secundair?	
V factor	<i>Bacillus „X”</i> van Pritchett en Stillman	mensch		In de keel bij gezonde en zieke menschen. Haemolytisch.
	<i>Bacillus parainfluenzae</i> (RIVERS)	mensch kat kip		In de respectievelijke respiratietracti.
V- en C factor	<i>Haemophilus coryzae</i> (DE BLIECK)	kip	<i>Coryza infectiosa gallinarum</i>	
Onbe-paald	<i>Bacterium influenzae suis</i> (WALDMANN)	varken	„Ferkelgrippe” secundair	
	<i>Haemophilus gallinarum</i> (DELAPLANE en MISS ELIOT)	kip	<i>Coryza infectiosa gallinarum</i> (Amerika)	Identiek <i>Hc</i> ?

IV, SAMENVATTING.

Een onderzoek werd weergegeven van de coryzabacil van de Blicck, die genoemd werd *Haemophilus coryzae* (*Hc*), waarbij die bacil vergeleken werd met *Haemophilus influenzae* (*Hi*).

Hc deed zich voor als een pleomorfe, gramnegatieve, onbeweeglijke bacil, die iets plomper van vorm was dan *Hi*. Er werd eenig verband geconstateerd tusschen zijn vorm en het medium van groei.

De koloniën van *Hc* waren dauwdruppelachtig, glad, glanzend, doorschijnend, gaafrandig en steeds kleiner dan de koloniën van *Hi*. De grootste koloniën van deze bacil, die centraal iets wazig waren, werden gevormd op chocoladeagar (zie beneden) in een afgesloten ruimte en waren ruim 1 mm. groot (*Hi*-koloniën 3 mm.). In verhouding tot *Hc*-koloniën waren *Hi*-koloniën fluweelachtig zacht.

Voor *Hc* kon geen biochemische activiteit worden aangetoond, geen haemolyse van bloed, vorming van indol en koolhydraatvergisting.

Terwijl voor *Hi* onder wisselende omstandigheden op een levensduur van 4 weken mocht worden gerekend, was die levensduur van *Hc* ten hoogste 2 weken.

Naar alle waarschijnlijkheid moet *Hc* tot de obligaat-aërobe bacillen gerekend worden.

Hc toonde zich weinig pathogeen voor proefdieren.

Een mengsel, bestaande uit 200 cc. agar en 100 cc. bloed, dat 10 minuten verhit was op 65° C., gaf het beste vaste medium voor deze bacil. 10% Bloedbouillon, waaraan een stukje rauwe aardappel was toegevoegd, vormde het vloeibare medium, waarin zich de meeste bacillen ontwikkelden.

Voor het aanhouden van *Hc* werd om andere overwegingen 10% bloedbouillon gebruikt.

De optimum Ph van deze bacil was gelegen bij Ph 7,4.

Hc had voor zijn groei en voortkweken V factor noodig, geen X factor. Tevens was deze bacil aangewezen op een thermolabiele factor, die C factor genoemd werd. Deze C factor was aanwezig in alle onderzochte bloedcellen, sommige sera en aardappel. Ze werd vernietigd door verhitting gedurende 10 minuten op 100° C. In bouillon was deze factor iets thermostabieler.

Het onderzoek op groeifactoren van *Hi* was een bevestiging van de behoefte van *Hi* aan X- en V factor naast een derde voedende substantie.

De X factor, die bekend stond als thermostabiel en dit in bloed ook bewees te zijn, bleek in aardappel minder thermostabiel. Dit was niet in strijd met de peroxydase-functie van de X factor en wel omdat haematine, meermalen verhit, nog als peroxydase kan fungeren, terwijl de plantaardige peroxydase veel gevoeliger voor verhitting zijn.

Hc uit exudaat en uit cultuur was niet filtreerbaar door Berkefeld V. Het gelukte niet de filtratie door Berkefeld V te benutten voor het isoleeren van *Hc*. *Hi*, uit twee lumbaalvochten van kinderen, die lijdende waren aan influenza-meningitis, werd doorgelaten.

Er was slechts een zeer geringe agglutinatorische verwantschap aan te toonen tusschen *Hi* en *Hc*.

Hc gaf slechts een kortdurende „cultuurcoryza”, met incubatietijdperk van 1—2 dagen. Zijn virulentie nam af bij voortkweken in bloedbouillon. Bij het isoleeren werd met succes gebruik gemaakt van chocoladeagarplaten, die afgesloten werden in Weckflesschen. Alleen bij coryza infectiosa gallinarum met kort incubatietijdperk kon *Hc* geïsoleerd worden. Bij coryza infectiosa gallinarum met lange incubatieperiode, waarbij NELSON nimmer *Haemophilus gallinarum* maar wel regelmatig coccobacillaire lichaampjes

aantrof, werd ook *Hc* nooit gevonden. De *coryza infectiosa gallinarum* met lang incubatietijdperk had steeds een chronisch verloop. De *coryza infectiosa gallinarum* met korte incubatietijd had daarentegen ook dikwijls een kort verloop. Om het verschil in ziekteduur tusschen cultuurcoryza en natuurcoryza te verklaren werd bij langdurende natuurcoryza met korte incubatietijd in vele gevallen een combinatie van twee soorten van coryza verondersteld. Een filtreerbaar virus bij *coryza infectiosa gallinarum* werd niet aangetoond.

Uit neusexudaat van kippen werden meerdere stammen van *Bacillus parainfluenzae* geïsoleerd, die groeiden in peptonNaCl + gistextract, maar geen coryza gaven.

Bacterium influenzae suis bleek andere eigenschappen te bezitten als *Hi* en waarschijnlijk ook als *Haemophilus influenzae suis*.

Of *Hc* en *Haemophilus gallinarum* identiek zijn, zal nog moeten blijken.

Een gemis aan een definitieve regeling van de nomenclatuur der hier behandelde bacillen openbaarde zich.

LITERATUURLIJST.

1. AGULHON H. en LEGROUX R., 1918, C. R. Acad. Seanc., bd. 167, blz. 597.
2. AGULHON H. en MESNARD P., 1920, C. R. Acad. Seanc., bd. 170, blz. 901.
3. ALLEN R. W., 1910, Lancet, I, blz. 1263.
4. ANDREWES, LAIDLAW en SMITH, 1934, Lancet, Oct., blz. 859.
5. ANDREWES, LAIDLAW en SMITH, 1935, B. J. Exp. Path., bd. 16, blz. 291 en 566.
6. AXENFELD TH., 1913, Handboek Kolle-Wassermann, opl. 2, bd. 6, blz. 545.
7. BEACH J. R., 1934, Proc. 12th Int. Vet. Congress New-York, blz. 144.
8. BEACH J. R. en SCHALM O. W., 1936, Poultry Science, bd. 15, blz. 199.
9. BELL H. H., 1920, J. Inf. Dis., bd. 27, blz. 464.
10. BEMELMANS E., 1935, Ned. Tijdschr. Hyg., bd. 2, blz. 85.
11. BERGEY, 1934, Determinative Bacteriology.
12. BLAKE F. G. en CECIL R. L., 1920, J. Exp. Med., bd. 32, blz. 691.
13. BORCHARDT, 1894, Berl. klin. Wschr.
14. CANTANI A., 1901, Z. Hyg. Infectkr., bd. 36, blz. 29.
15. CANTANI A., 1902, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 32, blz. 692.
16. CAPSENBERG G., 1929, Ned. Tijdschr. Hyg.
17. COHEN CH., 1909, Ann. Inst. Pasteur, bd. 23, blz. 273.
18. COHEN CH. en FITZGERALD J. G., 1910, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 56, blz. 464.
19. DAVIS I. O., 1917, J. Inf. Dis., bd. 21, blz. 393.
20. DAVIS I. O., 1918, J. Inf. Dis., bd. 23, blz. 248.
21. DAVIS I. O., 1921, J. Inf. Dis., bd. 29, blz. 171 en 178.
22. DE BLIECK L., 1931, Tijdschr. Diergk., bd. 58, blz. 310.
23. DE BLIECK L., 1934, Proc. 12th Int. Vet. Congress, blz. 161.
24. DELAPLANE J. P., ERWIN L. E. en STUART O. H., 1934, Bull. 244, agricultural exp. station of the Rhode Island state college.
25. DELAPLANE J. P., ERWIN L. E. en STUART O. H., 1936, J. Agric. Res., bd. 52, blz. 377.
26. DORSSSEN C. A. van, 1935, Tijdschr. Diergk., bd. 62, blz. 570.
27. EIRUND A., 1929, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 111, blz. 95.
28. ELIOT C. P. en LEWIS R. M., 1934, J. Amer. Vet. Med. Ass., bd. 89, blz. 878.
29. ELKELES G., 1936, Zbl. Hyg., bd. 35, blz. 515.

30. FILDES P., 1920, B. J. Exp. Path., bd. 1, blz. 129.
31. FILDES P., 1921, B. J. Exp. Path., bd. 2, blz. 16.
32. FILDES P., 1922, B. J. Exp. Path., bd. 3, blz. 210.
33. FILDES P., 1923, B. J. Exp. Path., bd. 4, blz. 265.
34. FILDES P., 1924, B. J. Exp. Path., bd. 5, blz. 69.
35. FLEMMING A., 1919, Lancet, I, blz. 138.
36. FRANCIS T., 1935, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. Proc., bd. 32, blz. 1172.
37. FRIEDBERGER E., 1903, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 33, blz. 401.
38. GATES T. L. en OLITSKY P. K., 1921, J. Exp. Med., bd. 33, blz. 51.
39. GEHLEN W., 1923, Inaug. Diss., Erlangen.
40. GOHN A. en PREYSS W. v., 1902, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 32, blz. 90.
41. GOHN A. en PREYSS W. v., 1904, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 35, blz. 531.
42. GRASSBERGER R., 1897, Z. Hyg. Infectkr., bd. 25, blz. 453.
43. GRASSBERGER R., 1898, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 23, blz. 353.
44. HAMMERSCHMIDT J., 1921, Münch. med. Wschr., bd. 68, blz. 1246.
45. HAPPE, 1922, Z. Hyg. Infectkr., bd. 98, blz. 130.
46. HAUDUROY P., 1934, „Les Ultravirus”.
47. HOFFMANN R., 1900, Z. Hyg. Infectkr., bd. 33, blz. 109.
48. HOESSLIN H. v., 1935, Deuts. med. Wschr., Jg. 61(1), blz. 231.
49. HOHN J. en HERRMANN W., 1935, Zeitschr. Hyg., bd. 118, blz. 656.
50. HUNDESHAGEN, 1918, Deuts. med. Wschr., bd. 44, blz. 1181.
51. Internationale Regels botanische Nomenclatuur, GUSTAV FISCHER, Jena, 1912.
52. ISHIWARA F., 1923, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 90, blz. 55.
53. KAIRIES A., 1936, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 137, blz. 9.
54. KALKBRENNER, 1921, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 87, blz. 277.
55. KIRCHENBAUER, 1933, Z. Hyg. Infectkr., bd. 45, Heft 4.
56. KNORR M., 1924, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 92, blz. 371 en 385.
57. KNORR M., 1925, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 94, blz. 161.
58. KNORR M., 1924, Ergebn. Hyg. Bact., bd. 6, blz. 350.
59. KNORR M., 1925, Ergebn. Hyg. Bact., bd. 7, blz. 641.
60. KNORR M. en GEHLEN W., 1924, Arch. Hyg., bd. 94, blz. 136.
61. KNORR M. en GEHLEN W., 1925, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 94, blz. 321.
62. KNORR M. en GEHLEN W., 1925, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 95, blz. 295.
63. KÖBE, 1933, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 129, blz. 161.
64. KOLLATH W., 1924, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 93, blz. 506.
65. KOLLATH W., 1925, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 95, blz. 158 en 279.

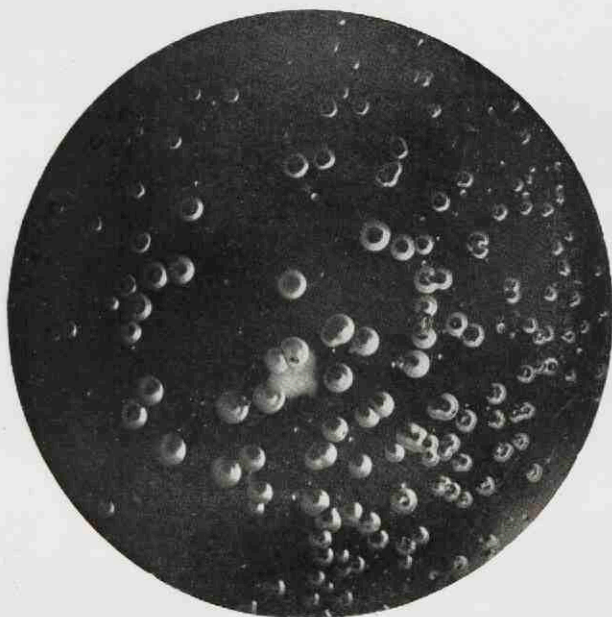
66. KOLLATH W., 1926, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 100, blz. 97.
67. KONDO S., 1922, The Tohoku J. Exp. Med., bd. 3, blz. 70.
68. KOPP H., 1927/28, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 105, blz. 55.
69. KRISTENSEN M., 1922, „Haemoglobinophilic bacteria”.
70. LAIDLAW P. P., 1935, Lancet, I, blz. 1118.
71. LAIDLAW, SMITH, ANDREWES en DUNKIN, 1935, B. J. Exp. Path., bd. 16, blz. 275.
72. LEVINTHAL W., 1918, Z. Hyg. Infectkr., bd. 86, blz. 1.
73. LEWIS R. M. en MUELLER E., 1934, J. Amer. Vet. Med. Ass., bd. 89, blz. 759.
74. LOEWENTHAL W., 1918, Berl. klin. Wschr., blz. 1170.
75. LUERSSEN A., 1904, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 35, blz. 434.
76. LUERSSEN A., 1905, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 39, blz. 678.
77. MATTHEWS J., 1918, Lancet, II, blz. 104.
78. McGAUGHEY C. A., 1932, J. Compt. Path. Ther., bd. 45, blz. 58.
79. Med. Research Council: A System of Bacteriology, vol. II, 1929.
80. MEYER K., 1934, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 131, blz. 289.
81. MORAX V., 1896, Arch. Ophthal., bd. 19, blz. 140.
82. MULDER J., MEER B. J. v. d., LACROIX W. en OESEBURG H., 1934, Med. Tijdschr. Geneesk., Jg. 78, blz. 2853.
83. MULDER J. en UBBINK J., 1934, Ned. Tijdschr. Geneesk., Jg. 78, blz. 4447.
84. NEISSER M., 1903, Deuts. med. Wschr., bd. 29, blz. 462.
85. NELSON J. B., 1932, Soc. Exp. Biol. and Med. Proc., bd. 30, blz. 306.
86. NELSON J. B., 1933, J. Exp. Med., bd. 58, blz. 289 en 297.
87. NELSON J. B., 1935, J. Exp. Med., bd. 61, blz. 351.
88. NELSON J. B., 1935, J. Amer. Vet. Med. Ass., bd. 86, blz. 409.
89. NELSON J. B., 1935, Science, bd. 82, blz. 43.
90. NELSON J. B., 1936, J. Exp. Med., bd. 63, blz. 509 en 515.
91. NESTLINGER N. v., 1918, Monatbl. Augenheilk., bd. 61, blz. 497.
92. MEUNIER H., 1898, C. R. Soc. Biol., bd. 5, blz. 642.
93. OLSEN O., 1920, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 84, blz. 497.
94. PARKER F. en PARKER J. T., 1922, Soc. Exp. Biol. and Med. Proc., bd. 20, blz. 23.
95. PFEIFFER R., 1892, Deuts. med. Wschr., bd. 18, blz. 28.
96. PFEIFFER R., 1893, Z. Hyg. Infectkr., bd. 13, blz. 357.
97. PITTMAN M., 1931, J. Exp. Med., bd. 53, blz. 471.
98. PRITCHETT I. W. en STILLMAN E. G., 1919, J. Exp. Med., bd. 29, blz. 259.
99. Rapport Committee Soc. Amer. Bacteriologists, 1920, J. Bact., bd. 5, blz. 191.
100. REED G. en ORR J. H., 1923, J. Bact., bd. 8, blz. 103.
101. RHEIN M., 1919, C. R. Soc. Biol., bd. 82, blz. 138.
102. RIVERS T. M., 1922, Johns Hopk. Hosp. Bull., bd. 33, blz. 149 en 429.

103. RIVERS T. M., 1928, „Filterable Viruses”.
104. RIVERS T. M. en BAYNES-JONES S., 1923, *J. Exp. Med.*, bd. 37, blz. 131.
105. RIVERS T. M. en KOHN L. A., 1921, *J. Exp. Med.*, bd. 34, blz. 477.
106. RIVERS T. M. en LEUSCHNER E. L., 1921, *Johns Hopk. Hosp. Bull.*, bd. 32, blz. 130.
107. RIVERS T. M. en POOLE A. K., 1921, *Johns Hopk. Hosp. Bull.*, bd. 32, blz. 202.
108. SACEGHEM M. R. v., 1922, *Bull. Agric. Congo Belge*, bd. 13, blz. 88.
109. SCHALM O. W. en BEACH J. R., 1934, *Science*, bd. 79, blz. 416.
110. SCHALM O. W. en BEACH J. R., 1936, *J. Bact.*, bd. 31, blz. 161.
111. SCHELLER R., 1921, *Berl. klin. Wschr.*, blz. 575.
112. SCHMIDT P. en KAIRIES A., 1936, *Problem der Influenza*, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart.
113. SCHNEIDER R., 1922, *Monatbl. Augenheilk.*, bd. 68, blz. 824.
114. SCHNEIDER R., 1923, *Arch. Hyg.*, bd. 93, blz. 26.
115. SEIXAS PALMA, 1919, *Zbl. Bact., Abt. I, Orig.*, bd. 83, blz. 507.
116. SHOPE R. E., 1931, *J. Exp. Med.*, bd. 54, blz. 349.
117. SHOPE R. E., 1934, *J. Exp. Med.*, bd. 60, blz. 49.
118. ŚLAWIJK, 1899, *Z. Hyg. Infectkr.*, bd. 32, blz. 443.
119. SMITH, ANDREWES en LAIDLAW, 1933, *Lancet*, dl. 13, II, blz. 66.
120. SMITH W., 1935, *B. J. Exp. Path.*, bd. 16, blz. 508.
121. STILLMAN E. G. en BOURNE J. M., 1920, *J. Exp. Med.*, bd. 32, blz. 665.
122. TERADA U., 1922, *Kitasato Arch. Exp. Med.*, bd. 5, blz. 34 en 62.
123. TERPSTRA J. I., 1935, *Tijdschr. Diergk.*, bd. 62, blz. 177.
124. TOPLEY, WILSON: *The Principles of Bacteriology and Immunity*.
125. THJÖTTA TH., 1921, *J. Exp. Med.*, bd. 33, blz. 763.
126. THJÖTTA TH. en AVERY O. T., 1921, *J. Exp. Med.*, bd. 34, blz. 97 en 455.
127. TINTI M., 1923, *Zbl. Bact., Abt. I, Orig.*, bd. 70, blz. 401.
128. TOCUNAGA H., 1920, *Deuts. med. Wschr.*, blz. 1357.
129. TWORT T. W. en TWORT D. N., 1921, *J. Hyg.*, bd. 20, blz. 85.
130. URECH E. en SCHNEIDER W., 1925, *Ann. Inst. Pasteur*, bd. 39, blz. 679.
131. VALENTINE F. C. O. en RIVERS T. M., 1927, *J. Exp. Med.*, bd. 45, blz. 993.
132. VOGES O., 1894, *Berl. klin. Wschr.*, bd. 31, blz. 868.
133. WALDMANN O., 1933, *Berl. Tierärztl. Wschr.*, bd. 47, blz. 693.
134. WALDMANN O., 1935, *Deuts. med. Wschr.*, Jg. 61(1), blz. 8.
135. WASSERMANN und KOLLE: *Handbuch der pathogenen Microorganismen* 1930.
136. WEICHELBAUM A. en MÜLLER L., 1899, *Arch. Opthal.*, bd. 47, blz. 108.

137. WEEKS I. E., 1887, Med. Rec. N. Y., bd. 31, blz. 571.
138. WILLIAMS A. W. en POVITSKI O. R., 1921, J. Med. Res., bd. 42, blz. 405.
139. WINCHELL A. J. en STILLMAN E. G., 1919, J. Exp. Med., bd. 30, blz. 497.
140. WOLF J. E., 1920, Zbl. Bact., Abt. I, Orig., bd. 84, blz. 241.
141. WOLSTEIN M., 1915, J. Exp. Med., bd. 22, blz. 445.
142. WOLSTEIN M., 1919, J. Exp. Med., bd. 30, blz. 555.
143. YABE S., 1921, B. J. Exp. Path., bd. 2, blz. 197.



Satellitische groei van *Haemophilus coryzae* op 25% bloedagar (na 24 uren) rondom *Staphylococcus albus*. Vergr. 1 : 9.

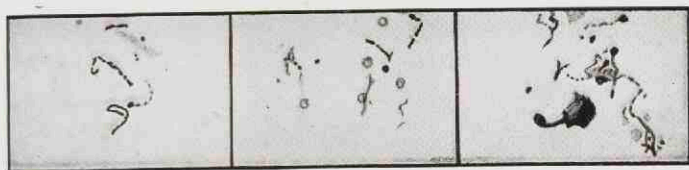


Satellitische groei van *Haemophilus influenzae* op 5% bloedagar (na 24 uren) rondom *Staphylococcus albus*, welke laatste door het nog vloeibare medium gemengd was (vlg. de methode Allen).
Vergr. 1 : 9.



Lange draden en ketens van *Haemophilus coryzae*, gevormd in verhitte-aardappelbloedbouillon.

Löfflers-Methyleenblauw-preparaat gemaakt uit een 48 uren oude cultuur. Vergr. 1 : 700.



Intensief, met Löfflers Methyleenblauw gekleurde bolletjes, al of niet verbonden aan ketens van bacillen, uit bloedbouillon-culturen van *Haemophilus coryzae* (teekening naar foto's).

Vergr. 1 : 700.

STELLINGEN.

1. Wat GOLDSCHMIDT aangeeft omtrent de overerving van de „Weiblichkeitsfactor” bij *Lamantria dispar* is onmogelijk.

RICHARD GOLDSCHMIDT: „Einführung in die Vererbungswissenschaft”, blz. 492, 496, e.a.

2. In het Consumptieijs-besluit dient te worden bepaald, dat consumptieijs geen bestanddeelen van eendeneieren mag bevatten.
3. De gewijzigde reactie van Martin vormt een goede en eenvoudige methode voor het aantoonen van galkleurstoffen in het vleesch van icterische dieren.
4. De uitdrukking „onbruikbaar maken voor voedsel voor mensch en dier” in de Vleeschkeuringswet is onjuist. Het verdient aanbeveling deze te vervangen door „destrueeren of vernietigen”.

Artikel 14, 15, 17, 18, e.a. van de Vleeschkeuringswet.

5. Het is noodzakelijk, dat varkenspest in ons land van overheidswege bestreden wordt.
6. Het is aannemelijker, dat het virus der ziekte van Aujeszky in ons land kwam door invoer van met dit virus besmette varkens, dan door import van besmet varkenspestserum.

BURGGRAAF A. en LOURENS L. F. D. E.: Tijdschr. Diergk., 1932, bd. 59, blz. 981.

LOURENS L. F. D. E.: Tijdschr. Diergk., 1935, bd. 62, blz. 885 en 949.

7. Bij een torsio uteri praecervicales verdient het aanbeveling een rund van achteren laag te leggen.
8. Het voorkomen van ophthalmia sympathica bij dieren is niet afdoende bewezen.

Received of the Treasurer of the
County of ... the sum of ...

for ...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

