Utrecht University Library
Partner in Science
Universiteit Utrecht

Proeven omtrent den invloed van onverhitte voedingsbodems voor den groei en virulentie van bacteriën en voor de gifvorming door diphtheriebacillen

https://hdl.handle.net/1874/288028

Utrecht 92, 1927

Proeven omtrent de waarde van onverhitte voedingsbodems voor den groei en virulentie van bacteriën en voor de gifvorming door diphtheriebacillen

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

ht

J. LODDER

PROEVEN OMTRENT DE WAARDE VAN ONVERHITTE VOEDINGSBODEMS VOOR DEN GROEI EN VIRULENTIE VAN BACTERIëN EN VOOR DE GIFVORMING DOOR DIPHTHERIEBACILLEN.

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK UTRECHT
3969 3266

Diss. Utrecht 1927

PROEVEN OMTRENT DEN INVLOED VAN ONVERHITTE VOEDINGSBODEMS VOOR DEN GROEI EN VIRULENTIE VAN BACTERIëN EN VOOR DE GIFVORMING DOOR DIPHTHERIEBACILLEN.

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS DR. A. NOORDTZIJ, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER GODGELEERDHEID, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE, TE VERDEDIGEN OP DINSDAG 14 JUNI 1927, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR DOOR **JOHANNES LODDER,** ARTS BIJ DEN DIENST DER VOLKSGEZONDHEID IN NEDERLANDSCH INDIE, GEBOREN TE GRIJPSKERK.

H. J. SMITS — UTRECHT — MCMXXVII

OPGEDRAGEN AAN

GUSTAAF WILLEM JOHAN KOOIJ.

VOORWOORD

Gaarne maak ik van deze gelegenheid gebruik U, Hoogleeraren, Privaatdocenten en Lectoren van de Philosophische en Medische Faculteit der Utrechtsche Universiteit, te danken voor de genoten lessen.

Groote dankbaarheid ben ik verschuldigd aan U, Hooggeleerde Aldershoff, Hooggeachte Promotor voor alles wat ik van U leerde.

Ik dank U, dat Gij het geheele laboratorium met al het materiaal dat ik voor mijn proeven noodig had, voor mij beschikbaar steldet.

Ik dank U in het bijzonder voor Uw hulp en steun waarop ik altijd mocht rekenen en die ik, vooral bij het beoordeelen van mijn proeven op hooge waarde heb leeren schatten.

De prettige stemming, die steeds in het Rijks Serologisch Instituut heerscht en die het werken daar zoo bijzonder aangenaam maakt, werd hoofdzakelijk door U geschapen.

Zeergeleerde Pondman en Collega Timmerman, U beiden dank ik hartelijk voor de prettige wijze waarop Gij mij in het R. S. I. hebt ontvangen en voor de vele raadgevingen, die Gij steeds bereid waart mij te geven.

Grooten dank ben ik ook verschuldigd aan de Zeergeleerde Heeren Bijl, Korthof en van der Hoeden voor de bereidwilligheid waarmede mij het materiaal van de bacteriologische afdeeling van het Centraal Laboratorium werd afgestaan.

Het personeel van het R. S. I. dank ik hartelijk voor de hulp, die mij zoo vele malen welwillend werd verleend.

Ook mijn vriend Biegman, die steeds bereid was de photographieën voor mij te maken, ben ik zeer erkentelijk.

INHOUD

blz.

Inleiding 1

Hoofdstuk I. Techniek der bereiding van onverhitte voedingsbodems 4
Filtreeren en aftappen 4
Bereiding van buisjes met onverhitten bouillon .. 5
Bereiding van onverhitte bouillonagar 6
Bereiding van onverhitten bouillon volgens Martin 7

Hoofdstuk II. Groei van bacteriën in onverhitte voedingsbodems 9
Groei op onverhitte bouillonagar 9
Groei in buisjes met onverhitten bouillon 17
Oppervlaktegroei van den diphtheriebacil 18

Hoofdstuk III. Diphtherietoxineproductie in onverhitten bouillon 24

Hoofdstuk IV. Virulentie van bacteriën gekweekt op onverhitte voedingsbodems 55
Proeven met diphtheriebacillen 56
Proeven met typhusbacillen 59
Proeven met bac. pneumoniae Friedländer 63
Proeven met tuberkelbacillen 64
Slotsom 67
Literatuurlijst 71

INLEIDING

In de bacteriologie heeft van ouds de gewoonte geheerscht de voedingsbodems voor de bacteriën zoo te steriliseeren, dat niet alleen de aanwezige kiemen, maar ook de sporen gedood werden. Daarvoor waren temperaturen van 110 à 120° C. noodig. Hoewel men wel vermoedde, dat de voedingsbodems daardoor veel van hun waarde zouden inboeten, was men terwille van de vereischte steriliteit genoodzaakt deze methode te blijven volgen.

Slechts bij enkele speciale voedingsbodems paste men de gefractioneerde sterilisatie toe, of men trachtte de bestanddeelen steriel te winnen, zooals bloed, exsudaten en transsudaten.

Naar aanleiding van de onderzoekingen omtrent de vraag, in hoeverre vitaminen voor den groei van bacteriën noodzakelijk zijn, hebben wij getracht de hooge temperaturen voor de sterilisatie te vermijden en deze te verkrijgen met behulp van filters. Op deze wijze zouden we voorkomen, dat de vitaminen door de sterke verhitting geschaad werden, terwijl tevens andere bestanddeelen van den voedingsbodem, o.a. de eiwitten, de schadelijke werking daarvan zouden ontgaan.

In de geraadpleegde literatuur vonden we slechts weinig omtrent deze sterilisatie-methode vermeld. Voor zoover we na konden gaan zijn er slechts twee onderzoekers, die bouillon bij lage temperatuur hebben bereid.

De eerste weinig hoopvolle publicatie van **Madsen** (1) [1]) dateert van 1897, waarin deze onderzoeker, de diphtherietoxine productie in bouillon besprekende zegt: „In einem Versuch ist die Sterilisation durch Filtrierung der Bouillon durch Chamberland's Filter ausgeführt, um ganz den Einflusz der Erwärmung ausschalten zu können. Die Versuche zeichten dasz man keinen Unterschied aufweisen könnte in der Entwickelung

1) Cijfers verwijzen naar de literatuurlijst.

und Giftproduktion der Culturen, selbst wenn Sie unter so verschiedenen Umständen gezüchtet wurden, wie einerseits in den obenerwähnten filtrierten Bouillon und anderseits in Bouillon die bei 134° C. erhitzt worden war. Man kann also der Art und Weise der Sterilisierung der Bouillon eine entscheidende Bedeutung für die Toxinbildung nicht zuschreiben".

Een jaar later verscheen de publicatie van **Martin** (2), waarin hij een nieuwen bouillon voor de diphtherietoxineproductie beschreef. Het vleeschextract, het voornaamste bestanddeel van dezen bouillon, werd door hem tot 70° verhit en daarna met behulp van Chamberland kaarsen gesteriliseerd. In dezen bouillon verkreeg hij veel sterkere toxinen, dan in den door verhitting gesteriliseerden, terwijl hij daarin tevens een sterk toxine kon bereiden uit diphtheriestammen, die anders voor de toxinebereiding niet geschikt waren.

Deze methode scheen te omslachtig om in de praktijk der toxinebereiding dienst te doen, want, hoewel de bouillon volgens Martin grooten opgang gemaakt heeft en nog in vele laboratoria gebruikt wordt, heeft men de sterilisatie door filtratie gewijzigd in die door verhitting. De techniek der filtratie door kaarsen was zóó lastig, dat men de voordeelen er aan verbonden prijs gaf. De Chamberland kaarsen hebben n.l. het groote nadeel, dat ze telkens weer moeten worden uitgegloeid, terwijl bovendien de filtratie in een langzaam tempo verloopt, zoodat ze niet geschikt zijn om groote hoeveelheden vloeistof in korten tijd van bacteriën te bevrijden.

Door de „Entkeimungsfilter", die de Seitz-Werke te Kreuznach in den handel brengen, zijn we tegenwoordig in staat vloeistoffen in dusdanige hoeveelheden door filtratie steriel te verkrijgen, als tot dusver met Chamberland kaarsen slechts met groote moeite en kosten mogelijk was.

Van deze filters hebben wij dan ook voor de bereiding van onze voedingsbodems gebruik gemaakt. (Zie volgend hoofdstuk).

Aanvankelijk hebben we getracht de verhitting geheel uit te schakelen en de bereiding van den bouillon bij kamertemperatuur te bewerkstelligen. Deze pogingen mislukten ech-

ter, omdat in geheel onverwarmde bouillon na plaatsing in de stoof bij 37° een vlokkig neerslag ontstond, waardoor de bouillon sterk troebel en ondoorzichtig werd en een groei van andere dan de er in geënte kiemen, moeilijk te controleeren viel. Ook de bouillon verwarmd tot 40° C. gaf ditzelfde verschijnsel.

Langzaam stijgende met de temperatuur bij de bereiding, konden we deze troebeling slechts voorkomen, wanneer we vóór de filtratie den bouillon een uur lang op 55° verwarmden.

Om geheel zeker te zijn, dat deze troebeling ook na langdurig verblijf in de stoof niet meer in den bouillon zou optreden, hebben we dezen altijd voor de filtratie een verhitting bij 60° C. gedurende een uur laten ondergaan.

Een verhitting tot 60 ° C. mag zoowel voor de eiwitten als voor de vitaminen onschadelijk worden geacht.

Volgens deze methode hebben we de volgende voedingsbodems bereid: runderbouillon, bouillonagar, gistbouillon en bouillon volgens Martin, zooals die gebruikt wordt voor de bereiding van diphtherietoxine.

Tijdens onze proeven hebben wij steeds gesproken van verhitte en onverhitte voedingsbodems. Hoewel deze benamingen niet geheel juist zijn, zullen we ze toch gebruiken om lange omschrijvingen te kunnen ontgaan. Met een O duiden wij dan de onverhitte, met een V de verhitte voedingsbodems aan.

HOOFDSTUK I.

Techniek der bereiding van onverhitte voedingsbodems.

Filtreeren en aftappen.

Voor de filtratie van den onverhitten bouillon gebruikten we model No. 14 van de „Entkeimungsfilter", „E.K. filter" van de Seitz-Werke te Kreuznach.

Een dergelijk filter (zie foto No. 1) bestaat uit 2 metalen platen, waartusschen de „Entkeimungsschicht", voor een groot gedeelte bestaande uit geperste asbestwol, met behulp van vier schroeven geklemd wordt. Aan de onderste plaat zit de metalen uitloop bevestigd, omgeven door een doorboorde gummi stop. De bovenste plaat is voorzien van een groote metalen trechter A, waarin de te filtreeren vloeistof wordt gegoten, en een klein kraantje B, waaruit men de tusschen de twee platen aanwezige lucht kan laten ontwijken, voordat de filtratie begint.

Om een E.K. filter te steriliseeren wordt ze ontdaan van trechter en luchtkraan, die niet gesteriliseerd behoeven te worden, daar ze slechts met de nog niet gefiltreerde vloeistof in aanraking komen. Daarna wordt het apparaat voorzien van een nieuwe „Entkeimungsschicht" en worden uitloop en gummi stop met papier omhuld, teneinde besmetting na de sterilisatie te voorkomen.

Het geheel wordt gesteriliseerd met losjes aangedraaide schroeven. Voor het gebruik behoeft men dus slechts de vier schroeven zoo vast mogelijk aan te draaien, trechter en luchtkraan op te schroeven en door middel van de gummi stop het instrument op een steriele zuigkolf te plaatsen.

Heldere waterachtige vloeistof loopt meestal met een straaltje door, zoodat men in den tijd van een uur met één filter eenige liters vloeistof kan filtreeren.

Na de filtratie wordt het filter verwijderd en de zuigkolf gesloten met een steriele dubbel doorboorde stop. De eene opening hiervan is voorzien van een buisje gevuld met ste-

riele watten, de andere bevat een glazen staafje, dat slechts dient om de opening, die bestemd is om later de buis van den aftapballon door te laten, af te sluiten.

Het aftappen van den gefiltreerden bouillon dient met uiterste zorg te geschieden, teneinde de steriliteit te bewaren. Wij gebruikten hiervoor een aftapballon, zooals op foto No. 2 is afgebeeld. Deze ballon wordt gesteriliseerd met papierafsluiting van de uitwendige openingen en met watten omhulling van de glazen buis. Het einde hiervan wordt nog beschermd door een groote reageerbuis, die om de watten wordt geklemd.

Voor het gebruik wordt de glazen buis van reageerbuis en wattenomhulling snel ontdaan en door die opening van de zuigkolfstop gestoken, die afgesloten is met het glazen staafje. Met behulp van een zuigpompje, dat aan A bevestigd wordt, kunnen we dan de vloeistof uit de kolf in den ballon zuigen en daarna in de gewenschte hoeveelheden in flesschen of buizen aftappen.

Dit aftappen van den gefiltreerden bouillon is technisch het moeilijkste deel der bereiding; het vormt het voor de praktijk zwakke punt der methode.

Bereiding van buisjes met onverhitten bouillon.

Een hoeveelheid mager rundvleesch wordt zooveel mogelijk van het nog aanwezig vet ontdaan, daarna door een vleeschmolen gemalen en met 1 L water per 500 gr. vleesch gedurende een nacht in de ijskast geplaatst.

Den volgenden morgen wordt het door een doek gefiltreerd en aan het filtraat 1% pepton en 0.5% keukenzout toegevoegd. Daarna wordt het eerst gedurende 3 kwartier verwarmd op 60° C., waardoor het pepton en het zout oplossen.

Nu wordt de waterstofionenconcentratie bepaald en met normaal sodaoplossing op de gewenschte sterkte gebracht.

Daarna volgt nog eens verhitting op 60° gedurende een kwartier, om het neerslag, dat door de sodatoevoeging bij verwarming verwacht kan worden, te kunnen verwijderen.

De bouillon is nu gereed voor de filtratie; teneinde echter te voorkomen, dat het neerslag tijdens de verwarming ontstaan

het E.K. filter spoedig zou verstoppen, wordt de bouillon eerst door een Buchner-filter met asbestwol gefiltreerd.

Daarna wordt de bouillon in twee gelijke deelen verdeeld. De eene helft wordt door een E.K. filter gefiltreerd en in steriele buisjes afgetapt, de andere helft wordt door hooge temperaturen gesteriliseerd, teneinde een vergelijking tusschen onverhitten en verhitten bouillon mogelijk te maken. Deze tweede helft wordt gedurende 20 minuten op 115° C. verhit, daarna door papier gefiltreerd en afgetapt in buisjes, welke dan gesteriliseerd worden door verhitting op 110° gedurende een kwartier.

Bereiding van bouillonagar.

De bereiding van bouillonagar had hoofdzakelijk ten doel, de waarde van onverhitten en verhitten bouillon in vaste bodems voor den groei van bacteriën met elkaar te vergelijken.

Daar agar-agar pas bij 90° C. vloeibaar wordt en zich niet leent voor filtratie door E. K. filters, hebben wij de bouillonagar slechts in zooverre onverhit bereid, dat onverhitte bouillon aan verhitte agar-agar werd toegevoegd. Eerst maakten we water-agar met behulp van temperaturen tot 120° en voegden daaraan den onverhitten bouillon toe. De gebruikelijke bouillonagar bevat 2% agar-agar + 1% pepton + 0.5% keukenzout. Om deze samenstelling zooveel mogelijk te verkrijgen, maakten we onverhitten bouillon + 1% pepton + 0.5% zout, daarnaast water + 4% agar-agar + 1% pepton + 0.5% zout en deden daarvan gelijke deelen bij elkaar. Het aldus verkregen mengsel bestond dus uit gelijke deelen bouillon en water + 2% agar-agar + 1% pepton + 0.5% zout. Het eenige verschil met de gebruikelijke bouillonagar is dus de halve bouilonconcentratie. Daar we echter de verhitte bouillonagar van dezelfde onderlinge samenstelling maakten als de onverhitte, bestaat er tusschen deze beide geen ander verschil dan de wijze waarop steriliteit verkregen werd.

De techniek is als volgt:

Aan een zekere hoeveelheid water wordt 4% agar-agar, 1% pepton en 0.5% zout toegevoegd. Dit mengsel wordt tot 120° verhit om alles te doen oplossen, daarna, terwijl de agar-agar

nog vloeibaar is, met normaal soda-oplossing of met phosforzuur op de gewenschte waterstofionenconcentratie gebracht en in een Koch's toestel bij 100° door watten gefiltreerd. Na de filtratie wordt deze wateragar in buisjes afgetapt in hoeveelheden van ongeveer 3,5 cc.

Aan een gedeelte van deze buisjes met wateragar wordt nu evenveel verhitte bouillon toegevoegd, waarna ze gesteriliseerd en scheefgelegd worden. Het andere gedeelte wordt direkt van wattenproppen voorzien om bij 115° gesteriliseerd te worden. Uit de sterilisator gekomen, terwijl de wateragar nog vloeibaar is, worden de buisjes in een waterbad van 60 à 70° C. geplaatst. Aan elk buisje wordt dan ongeveer 3,5 c.c. onverhitte bouillon uit een aftapballon toegevoegd, waarna ze tusschen de handen gerold en scheefgelegd worden.

Deze buisjes met onverhitte bouillonagar worden dan 2 dagen in de stoof bij 37° geplaatst om de steriliteit te kunnen beoordeelen.

Bereiding van onverhitten bouillon volgens Martin.

Deze bouillon, die gebruikt wordt voor de diphtherietoxineproductie, bestaat uit 2 gedeelten n.l. het vleeschextract en het varkensmaagextract, die afzonderlijk bereid en daarna in gelijke hoeveelheden bij elkaar gevoegd worden.

Van deze twee bestanddeelen hebben we slechts het vleeschextract onverhit klaar gemaakt, terwijl het varkensmaagextract met behulp van hooge temperaturen werd bereid. Het bereiden van onverhit maagextract zou n.l. groote technische moeilijkheden opleveren, terwijl het slechts dienst doet als bron der peptonen, die voor de toxinevorming onontbeerlijk zijn. De samenstelling zal later nog uitvoerig worden besproken (zie pag. 31).

Mager kalfsvleesch wordt van het eventueel nog aanwezig vet ontdaan, door een vleeschmolen gemalen en gedurende een nacht met 1 L. lauw water per 500 gr. vleesch in de stoof bij 37° geplaatst. Den volgenden morgen wordt het door een doek gefiltreerd en aan het filtraat een gelijke hoeveelheid varkensmaagextract toegevoegd. Dit mengsel wordt gedurende drie kwartier verhit op 60° C., waarna de waterstofionen-

concentratie op de gewenschte sterkte wordt gebracht. Daarop volgt nog een verhitting op 60° gedurende een kwartier, waarna de bouillon eerst door een steriel Buchnerfilter met asbestwol en daarna door een E. K. filter gefiltreerd wordt. Het aftappen geschiedt ook hier met behulp van een aftapballon en wel in hoeveelheden van 250 cc. in medicijnflesschen van 500 cc.

De steriliteit wordt nagegaan door de flesschen gedurende 2 dagen in de stoof bij 37° te plaatsen.

Bij de bereiding van dezen bouillon zijn de gelegenheden voor verontreiniging door bacteriën talrijk. Het E. K. filter kan wel eens niet geheel aan zijn naam beantwoorden, terwijl ook tijdens het aftappen de kans op infectie groot is.

Om een besmetting met luchtkiemen te voorkomen werd het aftappen altijd 's avonds en in een rustig vertrek uitgevoerd.

Van groot belang is het verder om de filtratie en het aftappen zoo snel mogelijk na elkaar uit te voeren, om een eventueele infectie tijdens de bewerking ontstaan, de gelegenheid te ontnemen zich uit te breiden. Een enkele kiem uit de lucht in den bouillon geraakt, kan b.v. tijdens een langdurige bewerking het geheel verontreinigen, terwijl het bij snelle afwerking slechts enkele buisjes besmet en de rest steriel doet blijven.

Van belang is ook de hoeveelheid, welke men in elke buis of flesch aftapt. Wanneer wij b.v. een liter bouillon aftapten in een 200-tal buisjes, zagen we slechts een gering aantal daarvan geinfecteerd. Van de 10 à 12 maal dat wij een serie onverhitte bouillonbuisjes en scheefagar maakten, bedroeg het aantal geinfecteerden nooit meer dan 4%. De kans op infectie wordt echter belangrijk grooter bij de bereiding van bouillon volgens Martin. Hierbij toch wordt telkens een hoeveelheid van 250 cc. in een flesch afgetapt. Een liter bouillon wordt dus slechts over vier flesschen verdeeld, waardoor een heel geringe infectie toch alle flesschen kan verontreinigen. Daar het aftappen van 250 cc. ook veel langer duurt dan van enkele cc., is de kans ook veel grooter, dat gedurende deze bewerking luchtkiemen in den bouillon geraken.

Wanneer ondanks onze voorzorgen toch in enkele flesschen

een verontreiniging aanwezig bleek te zijn, werd de bouillon weer op de oorspronkelijke waterstofionenconcentratie gebracht, daarna opnieuw door een E. K. filter gefiltreerd en weer in steriele flesschen afgetapt. Soms ook steriliseerden we de geinfecteerde flesschen bij de eerste teekenen van besmetting bij 115°, om zoodoende den bouillon, althans verhit, nog voor de toxineproductie te kunnen gebruiken. De bouillon, die eenmaal geinfecteerd was geweest stond in haar waarde voor de diphtherietoxinevorming niet achter bij het steriel gebleven gedeelte, wat niet te verwonderen is, daar een infectie meestal met rotting gepaard gaat en juist een geringe rotting van het vleesch den bouillon ten goede komt, zooals in 1895 door **Spronck** (3) reeds werd aangetoond. (vgl. pag. 26).

Samenvattende kunnen we dus zeggen, dat het ons altijd gelukt is om een serie onverhitte bouillon- en scheefagarbuisjes te maken.

De bereiding van bouillon volgens Martin gelukt tenslotte ook steeds, al kan men niet met zekerheid zeggen wanneer de bouillon voor het gebruik gereed is, daar de kans altijd bestaat, dat een gedeelte geinfecteerd blijkt te zijn en dus opnieuw moet worden gefiltreerd.

Dat het echter mogelijk is deze methode met succes te volgen, blijkt uit het groot aantal liters bouillon, dat wij gemaakt hebben en waarmede de onderzoekingen, in dit proefschrift vermeld, zijn geschied.

HOOFDSTUK II.

Groei van bacteriën in onverhitte voedingsbodems.

Groei op onverhitte bouillonagar.

Nadat het ons gelukt was de onverhitte bouillonscheefagar te maken, hebben we er verschillende bacteriën op geënt om den groei daarvan na te gaan. Deze groei werd dan vergeleken met dien op bouillonscheefagar, welke met behulp van verhitting tot 115° was bereid.

Het was niet wel mogelijk voor elke bacteriesoort een voedingsbodem samen te stellen met een waterstofionenconcentratie, die het meest geschikt was voor de betreffende kiem. We hebben daarom de Ph steeds gebracht op 7,2 en zooveel mogelijk getracht die van onverhitte en verhitte scheefagar nauwkeurig gelijk te doen zijn.

Toen we later de scheefagar meer in het bijzonder gebruikten voor het kweeken van diphtheriestammen, hebben we de Ph iets hooger en wel op 7.3 à 7.4 ingesteld.

De eerste enting op onverhitte en verhitte scheefagar geschiedde steeds met dezelfde oese vanuit een afspoeling van een cultuur op een voor de betreffende bacterie gebruikelijken voedingsbodem.

Zoodoende entten we op elke scheefagar een ongeveer gelijk aantal bacteriën en tevens vermeden we het gevaar om iets van den oorspronkelijken voedingsbodem mee over te brengen.

Zooals toch uit de proeven van **Kollath** (4), **Knorr** (5) e.a. blijkt, zijn b.v. reeds heel geringe hoeveelheden bloed in staat een finken groei van haemophiele bacteriën mogelijk te maken. Bij het kweeken van bacteriën met zeer bijzondere voedingsbehoeften werd naast de enting vanuit een afspoeling nog een tweede voorzorg genomen, n.l. om ze minstens 5 generaties op den nieuwen scheefagar te kweeken, waardoor de invloed van den oorspronkelijken voedingsbodem geheel werd uitgeschakeld. Om niet door de zgn. „Auszenseiter" misleid te worden, kweekten we altijd meer dan één stam van een bepaalde bacteriesoort.

We hebben de verschillende bacteriën gekweekt zoowel op onverhitte en verhitte bouillonscheefagar, als op den oorspronkelijken voedingsbodem en de verschillende sterkte van groei als volgt aangegeven:

\+ = groei nauwelijks te zien.
\+ + = groei duidelijk te zien, maar gering.
\+ + + = sterke groei.
\+ + + + = zeer sterke groei.

TABEL I

STAM	Broed-tijd in dagen	Groei op ascitesagar	Groei op Löffler serum	Groei op onverhitte bouillon-agar	Groei op verhitte bouillon-agar
Streptococcus	1			+++	+++
	2			++++	++++
Staphylococcus aureus	1			++++	++++
Bac. coli	1			++++	++++
Bac. typhi	1			+++	+++
	2			++++	++++
Bac. paratyphi A	1			+++	+++
	2			++++	++++
Bac. paratyphi B	1			+++	+++
	2			++++	++++
Vibrio cholerae	1			+++	+++
	2			++++	++++
Bac. enteritidis Gärtner	1			+++	+++
	2			++++	++++
Bac. dysenteriae Flexner	1			+++	+++
	2			++++	++++
Bac dysenteriae Shiga-Kruse	1			++++	++++
Bac. dysenteriae Y	1			++++	++++
Bac. pneumoniae Friedländer	1			++++	++++
Bac. diphtheriae	1		+++	++++	+
	2		++++	++++	+
Diplococcus pneumoniae	1	+	±	+	—
	2	+	+	+	—
	3	+	+	+	—
	4	++	+	+	—
Meningococcus	1	++	+	+++	++
	2	++	++	+++	++
	3	+++	++	+++	++
Gonococcus	1	+	+	++	—
	2	+	+	++	±
	3	++	+	++	+
			Bloedagar.		
Bac. pertussis Bordet-Gengou	1		+	+	—
	2		+++	++	—
	3		+++	++	+
Bac. influenzae	1		+	—	—
	2		+	+	—
	3		++	+	—
	4		++	++	—
Streptococcus haemolyticus	1		++	++	+
scarlatinosus Dick.	2		++	++	+
	3		+++	++	++

Uit tabel I blijkt, dat de bacteriën, die op de gebruikelijke laboratorium-bouillonagar dus ook op onze verhitte scheefagar goed groeien, geen beteren groei vertoonen op O dan op V, hoewel de groei op O nooit geringer was dan dien op V. De factoren voor een snelle ontwikkeling van deze kiemen noodzakelijk, zijn dus blijkbaar zoowel in O als in V aanwezig.

Wanneer we evenwel de bacteriën met meer bijzondere voedingsbehoeften op O en V kweeken, dan blijkt, dat ze op de eerste beter groeien.

Bij den groei van pneumo- meningo- en gonococcen op hun bijzondere voedingsbodems (ascitesagar en Löffler-serum) schijnt dus naast de bijzondere samenstelling hiervan, ook de slechts geringe verhitting, die ze ondergaan hebben, een rol te spelen.

Ook de haemophiele bacteriën groeien beter op O dan op V. Dit komt vooral uit bij den influenzabacil, waarvan groei op V ten eenenmale ontbreekt. De factor V (Vitamine?) door **Thjötta** (6) en **Avery** (7) als noodzakelijk voor de ontwikkeling van den influenzabacil beschreven, moet dus in O aanwezig zijn, zooals trouwens te verwachten was, daar deze factor in bloed voorkomt en pas bij verhitting op 100° vernietigd wordt.

De kinkhoestbacil groeide op O in witte kolonies, die zich sterk aan de agar vasthechtten. Door schudden met physiologische zoutoplossing waren ze niet van de bouillonagar los te maken, zelfs met behulp van een oese waren ze moeilijk los te krijgen zonder den voedingsbodem te beschadigen. Hetzelfde verschijnsel treedt ook sterk op bij den diphtheriebacil gekweekt op O.

Zeer opvallend was de buitengewoon sterke groei van den diphtheriebacil op onverhitte tegenover dien op verhitte bouillonagar.

Een tweetal foto's (no. 3 en 4) van een 24 uur oude en van een 48 uur oude bouillonagarcultuur geven dit verschil in groei duidelijk weer.

Ook bij herhaalde overenting op O blijft dit verschil bestaan. Zoodra men echter vanaf O weer op V ent, is de sterke groei verdwenen en gedraagt de diphtheriebacil zich alsof ze nooit

betere tijden op O had gekend. De eigenschap van sterken groei wordt dus uitsluitend door den voedingsbodem veroorzaakt en wordt niet door den bacil behouden.

Al de 12 diphtheriestammen die wij op O en V hebben gekweekt vertoonden dit opmerkelijk verschil in groei.

Van deze 12 stammen waren 4 reeds gedurende jaren in het laboratorium aanwezig, terwijl wij de 8 overige uit het materiaal, dat naar het Centraal Laboratorium ter onderzoek op diphtheriebacillen werd gezonden, hebben gekweekt en nadat ze in reincultuur waren verkregen, op O en V geënt.

Ook daarna werden de diphtheriestammen herhaaldelijk op reinheid en eigenschappen onderzocht door microscopische praeparaten (Neisser- en methyleenblauw kleuring), door uitzaaiing op Löffler- en ascitesagarplaten en door inspuiting bij caviae.

De vorm der kolonies op onverhitte bouillonagar-platen verschilde niet van die op Löffler-serum. De kolonies waren rond, geelwit, vochtig glanzend en vertoonden soms een kratertje in het midden met een ringvormig walletje er omheen. De kolonies vloeiden niet samen, steeds bleef een dunne scheidingslijn zichtbaar.

Uit de microscopische praeparaten, gekleurd volgens **Neisser** bleek, dat in de diphtheriebacillen die op O en V, zoowel als op Löffler-serum gedurende 18 uren bij 37° gegroeid hadden, de lichaampjes van Babes-Ernst in grooten getale reeds aanwezig waren. Ze waren echter in de culturen op Löfflerserum grooter en talrijker aanwezig, dan in de culturen op O, terwijl ze hier weer grooter en talrijker waren dan in de culturen op V.

Waardoor wordt nu deze sterke groei van den diphtheriebacil op onverhitte bouillonagar veroorzaakt?

Deze vraag hebben wij niet kunnen beantwoorden; wel hebben we eenige proeven genomen omtrent de eigenschappen van den groei bevorderenden factor of de factoren, die in den onverhitten bouillon aanwezig zijn.

Het verschil in bereiding tusschen onverhitten en verhitten bouillon is dit, dat O bij lagere temperatuur wordt bewerkt

dan V, terwijl bovendien O gefiltreerd wordt door een filter van onbekende samenstelling, welke filtratie niet door den verhitten bouillon wordt ondergaan.

Den invloed, welken deze filtratie op den bouillon heeft, hebben wij nagegaan door verhitte bouillon evenals de onverhitte door een E.K . filter te filtreeren en daarna steriel af te tappen. Door vermenging met gelijke hoeveelheden water-agar konden we hiervan scheefagar verkrijgen.

Deze agar met verhitten en daarna gefiltreerden bouillon werd nu vergeleken met gewone niet gefiltreerde verhitte bouillonagar. Een verschil in groei van den diphtheriebacil was echter niet waarneembaar. Ook was de waterstofionen-concentratie voor en na de filtratie gelijk, zoodat we moeten aannemen, dat de filtratie geen invloed heeft op de waarde van den bouillon voor den groei van den diphtheriebacil en dat dus het verschil tusschen onverhitten en verhitten bouillon uitsluitend door den verschillenden graad van verhitting wordt veroorzaakt.

Om na te gaan bij welke temperatuur de groeibevorderende factoren in den onverhitten bouillon worden vernield, hebben we verschillende buisjes met onverhitte bouillonagar aan verschillende temperaturen blootgesteld, en daarna alle geënt met

TABEL II

Bouillonagar gedurende een uur verhit bij:	Groei van diphtherie-bacillen na 1 dag	Groei van diphtherie-bacillen na 2 dagen
60° C.	++++	++++
70° C.	++++	++++
80° C.	++++	++++
90° C.	+++	+++
100° C.	++	++
105° C.	++	++
110° C.	++	++
115° C.	++	++
120° C.	+	++

dezelfde hoeveelheid n.l. één oese van een bacillenemulsie van denzelfden diphtheriestam. Zie Tabel II.

We hebben deze proef eenige malen herhaald met verschillende diphtheriestammen en steeds dezelfde uitkomsten verkregen. De groei werd bij het stijgen der temperatuur niet plotseling maar geleidelijk minder goed.

Terwijl steeds met dezelfde oese werd geënt in een zigzagvormige lijn, was de groeilijn echter op elke scheefagar niet even breed. Op de scheefagar bereid bij 60° was deze groeilijn smal maar hoog, zoodat de bacillenlaag duidelijk boven het niveau van de bouillonagar uitstak.

Bij de scheefagar verhit op 80° en hooger, begon de groeilijn breeder en minder hoog te worden, zoodat men den indruk kreeg, dat tengevolge van minder voedsel in den verhitten bodem, de bacteriën zich hier meer in de breedte ontwikkelden.

Op de scheefagar bereid bij 60° was de begroeide zône verder compact, terwijl op de scheefagar, die aan 100° was blootgesteld geweest, de groeizône wel breeder was, maar zoo ijl, dat de afzonderlijke kolonies duidelijk te zien waren.

Verder zagen we het telkens terugkeerend verschijnsel dat op de scheefagar van 60° de groeilijn overal ongeveer even dik was, terwijl in de buisjes bij hoogere temperaturen verhit, de groei voornamelijk onderin het buisje optrad, dus daar waar de bouillonagarlaag het dikst was.

Hoewel de methode van enting hierbij zeker van invloed kan zijn, zouden we toch uit dit verschijnsel de gevolgtrekking willen maken, dat de onverhitte voedingsbodem ook reeds in dunne laag voldoende voedsel aan de diphtheriebacillen biedt.

Ook hebben we nagegaan in welke concentratie de onverhitte bouillon aanwezig moet zijn, opdat de diphtheriebacil zich sterk kan vermenigvuldigen. Daartoe hebben we aan verhitte bouillonscheefagar na de laatste verhitting op 110° en voordat bij afkoeling weder stolling optrad, verschillende hoeveelheden onverhitten bouillon toegevoegd.

Om de steriliteit zooveel mogelijk te behouden, was het voor ons het gemakkelijkst de hoeveelheden onverhitten bouillon in droppels af te meten vanuit een aftapballon. Om geringere

hoeveelheden dan één droppel bij de verhitte scheefagar te kunnen voegen, vermengden we één droppel onverhitten bouillon met physiologische zoutoplossing en deden een bepaalde hoeveelheid daarvan bij de verhitte scheefagar. De buizen werden dan krachtig tusschen de handen gerold en daarna scheef gelegd. Na het onderzoek op steriliteit werden deze scheefagarbuisjes alle geënt met dezelfde hoeveelheid n.l. één oese van een bacillenemulsie van een diphtheriestam. Zoodoende kregen we de volgende buisjes met bouillonagar met het volgende resultaat:

TABEL III

Voedingsbodem	Groei van diphtheriebacillen na 1 dag	Groei van diphtheriebacillen na 2 dagen
Bouillonagar V	+	++
„ + 1/50 dr. O	—	—
„ + 1/25 dr. O	±	±
„ + 1/10 dr. O	+	+
„ + 1 dr. O	+	+
„ + 2 dr. O	+	+
„ + 3 dr. O	+	+
„ + 4 dr. O	+	+
„ + 5 dr. O	+	++
„ + 10 dr. O	++	++
„ + 20 dr. O	++	+++
Bouillonagar O	++++	++++

Deze proef werd nog eens herhaald met scheefagar van dezelfde samenstelling, maar met een anderen diphtheriestam waarbij hetzelfde resultaat verkregen werd.

Men ziet dus, dat de onverhitte bouillon in geringe concentratie den groei van den diphtheriebacil remt, terwijl bij grootere hoeveelheden de groei geleidelijk beter wordt. Een verklaring van deze aanvankelijke remming kunnen wij niet geven. Aan een hoeveelheid verhitte bouillonagar van pl.m. 7 c.c. moeten dus 10 à 20 droppels onverhitte bouillon worden toegevoegd, om den groei van den diphtheriebacil te kunnen ver-

beteren. De groei bevorderende factor in den onverhitten bouillon kan zijn werking dus pas in vrij sterke concentratie ontvouwen en werkt dan steeds quantitatief, d.w.z. hoe meer onverhitten bouillon men toevoegt, des te beter kan de diphtheriebacil op het verkregen mengsel groeien.

Om den aard van dezen factor of deze factoren nader te leeren kennen, zal men dus waarschijnlijk moeten zoeken op het gebied der voedingstoffen (eiwitten) en niet op het gebied der vitaminen, daar deze reeds in sterke verdunningen hun werking duidelijk ontvouwen.

Groei in buisjes met onverhitten bouillon.

Daar de samenstelling en de bereiding van den bouillon in de onverhitte scheefagar en in de onverhitte bouillonbuisjes dezelfde is, hebben we de laatste slechts gebruikt om er den groei van den tuberkelbacil in na te gaan en om enkele proeven te nemen omtrent den oppervlaktegroei van den diphtheriebacil. Bovendien gebruikten we deze buisjes met bouillon voor de bereiding van bouilloncultures, teneinde daarmede de ziekmakende eigenschappen van enkele bacteriën na te gaan.

Voor de proeven met tuberkelbacillen maakten we gebruik van kleine Erlemeyer-kolfjes, die ongeveer 50 c.c. bouillon bevatten. In sommige kolfjes voegden we aan den bouillon steriele glycerine toe tot een hoeveelheid van 5%, terwijl in som-

TABEL IV

T.b.c. bacillen geënt in:	Groei na 3 weken
Bouillon O	+
Bouillon V	+
Bouillon O + 5 % glycerine	+ + +
Bouillon V + 5 % glycerine	+ + +
Bouillon O + 5 % glyc. + aardappel	+ + + +
Bouillon V + 5 % glyc. + aardappel	bacillen gezonken

mige daarvan, naast de glycerine, nog stukjes gesteriliseerde aardappel aan den bouillon werden toegevoegd.

Al deze kolfjes werden geënt met een t.b.c. stam, die uitblonk door zeer sterken oppervlaktegroei.

Op den onverhitten bouillon groeit de tuberkelbacil dus slecht (zie Tabel IV); na toevoeging van 5% glycerine wordt de ontwikkeling wel veel sterker, maar overtreft toch niet die op verhitten bodem. Wanneer ook nog aardappel wordt toegevoegd, wordt de groei op bouillon O nog sterker, maar een betrouwbare contrôle ontbrak hier helaas, tengevolge van het zinken der culturen in bouillon V. Een duidelijk verschil in groei van den t.b.c. bacil o ponverhitten en verhitten bouillon was dus niet waar te nemen.

Oppervlakte-groei van den diphtheriebacil.

Toen wij voor de eerste maal buisjes met onverhitten bouillon gemaakt hadden en deze entten met diphtheriebacillen, zagen we na 24 uur de bacillen in een dikke witte laag aan de oppervlakte groeien, terwijl in den verhitten bouillon de daarin geënte bacillen zich op den bodem ontwikkelden en de bovenstaande vloeistof helder lieten.

Al de 6 diphtheriestammen, die we in dezen onverhitten bouillon kweekten, vertoonden dezen sterken oppervlaktegroei. Op foto No. 5 ziet men drie paar onverhitte en verhitte bouillonbuisjes, geënt met 3 verschillende diphtheriestammen.

Wanneer we verschillende buisjes gedurende een uur aan verschillende temperaturen blootstelden bleek, dat de opper-

TABEL V

Runderbouillon verhit gedurende een uur bij:	Oppervlaktegroei van diphtheriebacillen na 1 dag
60° C.	+ + + +
70° C.	+ + + +
80° C.	+ + + +
90° C.	+ + +
100° C.	+
120° C.	—

vlaktegroei van den diphtheriebacil verdween, wanneer de bouillon een uur lang op 100° was verhit. (zie Tabel V).

Na deze resultaten zou men geneigd zijn, aan den graad van verhitting een grooten invloed op den oppervlaktegroei van den diphtheriebacil toe te schrijven. We zagen echter spoedig, dat buiten de verhitting nog andere onnaspeurbare factoren een grooten rol spelen bij dezen oppervlaktegroei.

Toen we n.l. een tweede serie bouillonbuisjes gemaakt hadden, konden we daarin geen oppervlaktegroei van den diphtheriebacil verkrijgen en deze was ook in al de later gemaakte series óf geheel afwezig, óf slechts in zeer geringen graad aantoonbaar; het is ons helaas niet gelukt den oorzaak daarvan op te sporen.

De bereidingswijze van de verschillende series onverhitten bouillon was precies dezelfde; alleen bestond de mogelijkheid, dat er geringe verschillen in de waterstofionenconcentratie aanwezig waren. Om na te gaan of deze geringe verschillen misschien oorzaak zouden zijn van het verschil in oppervlaktegroei, hebben we een groot aantal buisjes met onverhitten bouillon genomen en in een gedeelte daarvan met stijgende hoeveelheden steriele normaal soda-oplossing een stijgende alkaliciteit veroorzaakt, terwijl we in een ander gedeelte met verschillende hoeveelheden verdund phosphorzuur verschillende zuurgraden deden ontstaan. Zoodoende kregen we een dertigtal buisjes met bouillon O, waarvan de beide uitersten een Ph bezaten van < 6.8 en > 8.4. Al deze buisjes werden geënt met een oese diphtheriebacillen vanuit een bacillenemulsie.

Op deze wijze gelukte het ons echter niet een sterken oppervlaktegroei te verkrijgen. Na een broedtijd van 2 dagen vertoonden de buisjes met bouillon een heel dun laagje bacillen aan de oppervlakte, met onderling geen andere verschillen dan het ontbreken van dezen zeer geringen oppervlaktegroei in de uiterste buisjes, dus met een Ph vlak bij 6,8 en 8,4.

Het verschil in oppervlaktegroei van den diphtheriebacil in verschillende bouillons wordt dus niet veroorzaakt door verschillen in de waterstofionenconcentraties.

Ook in de geraadpleegde literatuur vonden we niet veel

over den oppervlaktegroei van den diphtheriebacil vermeld.

Zupnik (8) beschreef in 1897 diphtheriestammen met afwijkenden kolonievorm. Hij zag sommige stammen, die groote vlakke kolonies vormden met onregelmatigen rand en mat oppervlak en tevens dat juist deze stammen in bouillon aan de oppervlakte groeiden. De diphtheriestammen met ronde en glanzende kolonies daarentegen, zouden zich op den bodem van de bouillonbuisjes ontwikkelen. Zoodoende zou men op grond van de oppervlaktegroei de verschillende stammen van elkaar kunnen scheiden.

Deze proeven van **Zupnik** worden door de onze niet bevestigd, daar toch al de 6 gebruikte stammen eerst prachtig aan de oppervlakte van den bouillon groeiden, terwijl later dezelfde stammen in anderen onverhitten bouillon dit verschijnsel niet meer vertoonden. De reinheid van de diphtheriestammen kan moeilijk in twijfel worden getrokken, daar zij zoowel direct microscopisch werden nagegaan als met behulp van uitzaaiing op ascitesagarplaten, waarbij dan verschillende kolonies werden onderzocht. De dierproeven bleken ook steeds dezelfde uitkomsten te geven, terwijl bovendien de stammen geënt in bouillon volgens Martin een sterken oppervlaktegroei vertoonden en een sterk toxine produceerden.

Neisser en Gins (9) den diphtheriebacil beschrijvende, zeggen over den oppervlaktegroei slechts: „Das Sauerstoffbedürfnis der Diphtheriebacillen kommt ab und zu durch die Entwickelung eines feines Häutchens auf der Oberfläche zum Ausdruck. Bein Schütteln sinkt dieses dann zu Boden",

Dat de zuurstofbehoefte van den bacil den oppervlaktegroei zou bepalen, wordt door onze proeven ook niet bevestigd. Alle 6 stammen, die immers eerst aan de oppervlakte groeiden, deden dit later niet meer. De oorzaak moet dus in den bouillon liggen, maar dat de daarin aanwezige hoeveelheid zuurstof den doorslag zou geven lijkt niet waarschijnlijk.

De onverhitte bouillon toch wordt slechts tot 60° verhit, terwijl de verhitte een temperatuur van 115° moet ondergaan. In de laatste zal dus minder lucht opgelost zijn dan in de eerste, en men zou dus juist in den verhitten bouillon een oppervlaktegroei verwachten en niet in den onverhitten. Toch

was het resultaat in onze eerste serie bouillon juist andersom.

Verder ontstond in de eerste serie onverhitten bouillon een zeer sterken oppervlaktegroei en in de volgende series was deze geheel afwezig. Toch kan men in deze verschillende bouillons geen sterk verschil in zuurstofhoeveelheid veronderstellen, daar ze alle op dezelfde manier werden bereid.

Wanneer men verder in tabel VI ziet, dat de diphtheriebacil aan de oppervlakte van gistbouillon en van bouillon volgens Martin groeit en niet aan de oppervlakte van onverhitten en verhitten runderbouillon, dan lijkt een verklaring daarvan, met behulp van de aanwezige hoeveelheden zuurstof, ook niet aannemelijk.

Uit onze proeven volgt dus, dat de oorzaak van den oppervlaktegroei niet gelegen is in den diphtheriestam, maar in den bouillon en dat het verschil in de daarin aanwezige hoeveelheden zuurstof niet den doorslag geeft.

Door **Engelsche onderzoekers (10)** wordt verband gelegd tusschen de oppervlaktespanning van den bouillon en den oppervlaktegroei van de daarin groeiende diphtheriebacillen. Een hooge oppervlaktespanning van den bouillon zou den bacillen noodzaken zich op den bodem te ontwikkelen, terwijl een lage oppervlaktespanning een oppervlaktegroei ten gevolge zou hebben.

Wij hebben daarom nagegaan of met het verschil in oppervlaktegroei in de verschillende bouillonsoorten, ook een verschil in oppervlaktespanning gepaard ging.

Voor deze proeven hebben we gebruikt onverhitten en verhitten runderbouillon van verschillende series; verder gistbouillon en bouillon volgens Martin.

We kregen zoodoende 8 verschillende bouillonsoorten en hebben deze geënt met den diphtheriestam L vanaf Löfflerserum en met den bekenden toxine produceerenden stam P.W. No. 8 zoowel vanaf Löffler-serum, als vanaf onverhitten bouillonagar.

We konden dus nagaan of er verschil in oppervlaktegroei bestond tusschen 2 verschillende stammen en tevens tusschen bacillen van denzelfden stam, maar afkomstig van verschillende voedingsbodems.

Van deze 8 bouillonsoorten hebben we ook de oppervlaktespanning onderling vergeleken, door het aantal droppels te tellen, dat per minuut uit een zelf gemaakten stalagmometer viel.

Een glazen buis werd aan beide zijden in een lange fijne punt uitgetrokken. Het eene einde diende om de vloeistof te laten uitdruppelen; het andere om de vloeistof tot een aangegeven streepje in een nauwkeurig bepaalde hoeveelheid op te kunnen zuigen. Telkens voor het gebruik werd deze stalagmometer achtereenvolgens doorgespoeld met physiologische zoutoplossing, met absoluten alcohol en met aether. Nadat de stalagmometer dan zorgvuldig was gedroogd werd de te onderzoeken vloeistof eerst eenmaal opgezogen en weer uitgeblazen. Daarna werd deze opnieuw opgezogen tot een bepaalde hoogte in het fijn uitgetrokken zuigstuk en het aantal per minuut uitloopende druppels geteld. Hoewel we zoodoende de oppervlaktespanning niet in bekende eenheden konden uitdrukken, waren we toch in staat de bouillonsoorten onderling te vergelijken.

Het resultaat is beschreven in tabel no. VI, waarin de sterkte van den oppervlaktegroei met kruisjes is aangegeven:

—	=	geen oppervlaktegroei.
+	=	zeer geringe „
+ +	=	goed zichtbare „
+ + +	=	sterke „
+ + + +	=	zeer sterke „

We zien dus, dat de 2 verschillende diphtheriestammen zich in de verschillende bouillonsoorten nauwkeurig gelijk gedragen wat betreft hun oppervlaktegroei.

Eveneens de diphtheriebacillen van denzelfden stam, maar afkomstig van verschillende voedingsbodems. Verder zien we, dat de oppervlaktegroei in de verschillende bouillons en de oppervlaktespanning daarvan niet parallel loopen.

De oppervlaktespanning mag dus niet als oorzaak aangenomen worden van het verschil in oppervlaktegroei van diphtheriebacillen in de verschillende bouillonsoorten.

Samenvattende blijkt dus uit deze proeven, dat de oorzaak

TABEL VI

Voedingsbodem	Stam	Oppervlakte groei:			Aantal droppels per min. uit stalagmometer
		na 1 dag	na 2dagen	na 3dagen	
	L. vanaf Löffler-				
Runderbouillon O 1e serie	serum	—	—	—	94
„ V 1e „		—	—	—	93
„ O 2e „		—	—	—	89
„ V 2e „		—	—	—	97
Gistbouillon O		+	+ +	+ +	90
„ V		+	+ +	+ +	93
Bouillon v. Martin O		+ +	+ + +	+ + + +	90
„ „ „ V		+	+ +	+ + +	90
	P. W. No. 8 vanaf				
Runderbouillon O 1e serie	Löffler-serum	—	—	—	94
„ V 1e „		—	—	—	93
„ O 2e „		—	—	—	89
„ V 2e „		—	—	—	97
Gistbouillon O		+	+ +	+ +	90
„ V		+	+ +	+ +	93
Bouillon v. Martin O		+ +	+ + +	+ + + +	90
„ „ „ V		+	+ +	+ + +	90
	P. W. No. 8 vanaf				
Runderbouillon O 1e serie	bouillonager O	—	—	—	94
„ V 1e „		—	—	—	93
„ O 2e „		—	—	—	89
„ V 2e „		—	—	—	97
Gistbouillon O		+	+ +	+ +	90
„ V		+	+ +	+ +	93
Bouillon v. Martin O		+ +	+ + +	+ + + +	90
„ „ „ V		+	+ +	+ + +	90

van het verschil in oppervlaktegroei der diphtheriebacillen niet gelegen is in de diphtheriestammen maar in den bouillon, en dat de oppervlaktegroei niet veroorzaakt wordt door een bepaalde waterstofionenconcentratie, noch door een bepaalde oppervlaktespanning, noch door verschil in verhitting, die de voedingsbodems bij de bereiding ondergaan.

Wat dan wel de oorzaak is van den oppervlaktegroei hebben we echter niet kunnen opsporen.

HOOFDSTUK III.

Diphtherietoxine-productie in onverhitten bouillon.

Op de ontdekking van den diphtheriebacil door **Löffler (22)** in 1884, volgde al spoedig die van het diphtherietoxine door **Roux** en**Yersin (11)** in 1888.

Deze onderzoekers filtreerden een 7 dagen oude diphtheriebouilloncultuur door Chamberlandkaarsen, zoodat het filtraat geen diphtheriebacillen meer bevatte. Toch bleek dit filtraat voor de meeste dieren en vooral voor de cavia zeer giftige eigenschappen te bezitten. Tijdens den groei van de diphtheriebacillen was dus in dezen bouillon een stof gevormd met zeer giftige eigenschappen.

Na deze mededeeling werd het diphtherietoxine al spoedig het onderwerp van zeer veel onderzoekingen, vooral nadat Behring in 1890 de vorming van antitoxine na inspuiting bij dieren met diphtherietoxine kon aantoonen.

Toxine-produceerende diphtheriestammen.

De serumbehandeling van de diphtheriepatienten was in den aanvang niet bevredigend, en daar dit geweten werd aan het lage antitoxinegehalte, trachtte men de toxinesterkte zoo hoog mogelijk op te voeren, om daarmede serum met een hoogen titer te verkrijgen. Tal van voedingsbodems werden aangeprezen en eveneens tal van diphtheriestammen, als zijnde goede toxinevormers.

Toch moest men zich tevreden stellen met een toxine waarvan de d.l.m. voor een cavia ongeveer $^1/_{20}$ à $^1/_{30}$ c. cm. bedroeg. Bovendien was de toxinesterkte zeer wisselend, daar de verschillende diphtheriestammen in hun toxinevormende eigenschappen groote verschillen vertoonden.

Een groote kentering ten goede trad echter bij de toxinebereiding in na de publicatie van **Dr. Anna W. Williams (12)** in 1894. Zij had n.l. een diphtheriestam rein gekweekt, die bijzonder sterke toxinevormende eigenschappen bezat en waar-

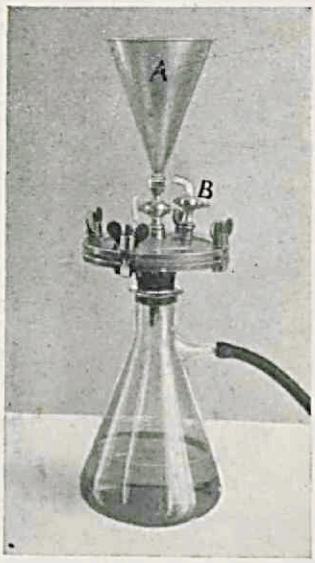

Foto No. 1 Entkeimungsfilter.

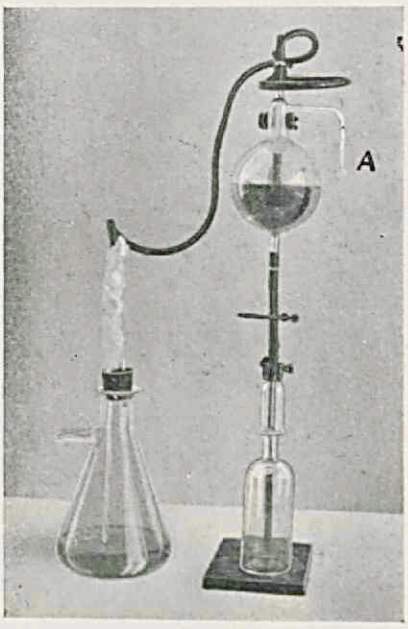

Foto No. 2 Aftapballon.

V O

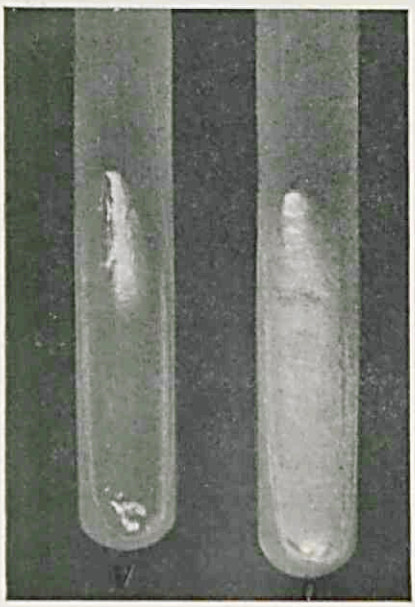

Foto No. 3
24 uur oude diphtherieculturen op verhitte en onverhitte bouillonagar.

V O

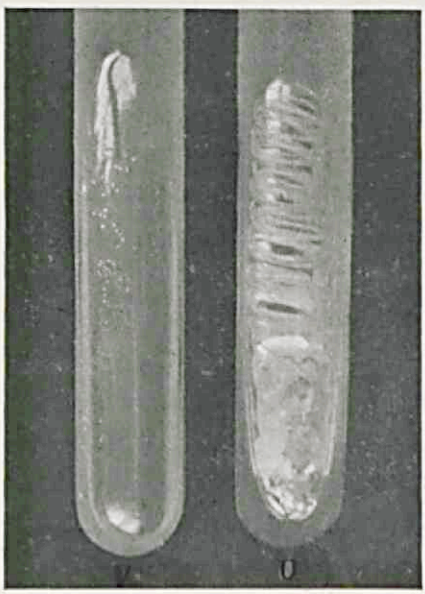

Foto No. 4
48 uur oude diphtherieculturen op verhitte en onverhitte bouillonagar.

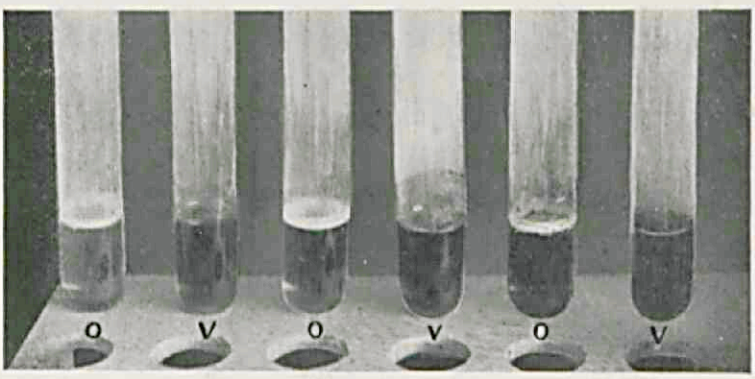

Foto No. 5
24 uur oude diphtherieculturen in onverhitten en verhitten bouillon.

mede het haar gelukt was een toxine te verkrijgen met een d.l.m. van $^1/_{200}$ c.c.

Deze stam, als Park-Williams No. 8 bekend, is jaren lang de eenige geweest, die voor de toxinebereiding gebruikt werd en is aanwezig in alle laboratoria, waar deze bereiding plaats vindt.

Tot heden is het nog niet gelukt een diphtheriestam te vinden, die dezen beroemd geworden amerikaansche overtreft. Ook in het Rijks-Serologisch Instituut bedient men zich van dezen stam voor de bereiding van het diphtherievergif en ook in onze proeven zal men den P.W. no. 8 herhaaldelijk aantreffen.

In het Rijks Serologisch Instituut werden ook tal van diphtheriestammen op hun toxineproduceerend vermogen onderzocht, maar er werd niet één gevonden die den P.W. no. 8 daarin evenaarde; ja zelfs niet één, die voor de immuniseering van paarden een bruikbaar toxine vormde.

Walbum (13) schrijft in zijn verhandeling over het diphtherietoxine zelfs: „Man kann mehrere hundert Stämme durchprobieren, ohne einen einzigen für Toxindarstellung geeigneten zu finden".

Voedingsbodems.

Na de ontdekking van den P.W. no. 8 heeft men getracht de toxineproductie te versterken, door den voedingsbodem daarvoor zoo geschikt mogelijk te maken. In de literatuur hebben wij een 17-tal als om strijd aangeprezen voedingsbodems gevonden. Ook uit onze proeven blijkt, dat de voedingsbodem grooten invloed op de toxinevorming heeft.

Glycogeengehalte.

Roux en **Yersin** hadden bij hun eerste proeven omtrent het diphtherietoxine reeds gezien, dat dit toxine zich slechts vormt in een alcalisch milieu. Nu vertoont de diphtheriebacil de eigenaardigheid in den bouillon gedurende de eerste dagen van zijn ontwikkeling zuren te doen ontstaan, waardoor de bouillon zuur wordt, om na eenige dagen weer meer en meer alcalisch te worden.

Gedurende deze „zure periode" wordt geen toxine geproduceerd, zoodat men al spoedig naar een voedingsbodem zocht, waarin deze periode of geheel afwezig, of zoo kort mogelijk zou zijn. **Roux** en **Yersin** raadden een doorstrooming van den bouillon met lucht aan, welke methode echter spoedig verlaten werd en in Duitschland zelfs nooit werd toegepast.

Spronck (3) zocht de oorzaak van deze zuurvorming in het glycogeengehalte van het vleesch. Om dit zoo gering mogelijk te doen zijn, liet hij het vleesch voor de bereiding van den bouillon eenige dagen staan, waardoor een lichte rotting optrad en het glycogeen grootendeels werd omgezet.

Deze methode heeft ingang gevonden, maar is door **Martin (2)** in dien zin gewijzigd, dat het gemalen versche vleesch gedurende een nacht in de broedstoof geplaatst wordt, waardoor de omzetting van het glycogeen sneller en volledíger verloopt.

Waterstofionenconcentratie.

Naast het glycogeengehalte is ook de waterstofionenconcentratie van den bouillon, waarin men den diphtheriebacil zal enten, van belang. Wanneer de bouillon op het oogenblik van enting b.v. zuur is, loopt men gevaar, dat de „zure periode" heel lang duurt, of zelfs dat de bouillon zuur zal blijven, waardoor men de hoop op een goede toxinevorming wel kan laten varen. Is de bouillon sterk alkalisch, dan wordt het toxine daardoor eerst verzwakt en tenslotte vernietigd, terwijl ook de groei van den diphtheriebacil wordt belemmerd. Daarom heeft men gezocht naar die z.gn. „begin Ph.", waarbij het sterkste toxine werd verkregen. De resultaten van deze onderzoekingen zijn niet geheel eensluidend, maar over het algemeen wordt toch een „begin Ph." van 7,0—7,3 à 7,4 het best geacht.

Peptongehalte.

Om een sterk toxine te verkrijgen, is het noodzakelijk aan het vleeschextract een zeker percentage pepton toe te voegen.

Sinds **Park en Williams (12)** hier den nadruk op legden, is de peptontoevoeging dan ook overal ingevoerd, waarvoor dan

meestal een der handelspraeparaten gebruikt wordt en wel voornamelijk het pepton Witte.

Deze handelspraeparaten blijken echter zeer te wisselen in hun peptongehalte, zelfs hetzelfde merk heeft niet steeds dezelfde samenstelling, zoodat men ook bij de toxinebereiding wisselende resultaten verkrijgt.

Martin trachtte deze moeilijkheid op te lossen, door het pepton zelf te maken. Hij deed dat, door varkensmagen in een zure omgeving aan een autodigestie te onderwerpen, waardoor het in de magen aanwezige pepsine de weefsels tot albumosen en peptonen afbreekt.

Hoewel men zoodoende ook niet zeker is van het peptongehalte van de verkregen vloeistof, heeft deze methode grooten opgang gemaakt en wordt nog steeds gebruikt in het Institut Pasteur te Parijs en is o.a. ook de gebruikelijke methode in het Rijks Serologisch Instituut.

Voof de nauwkeuriger beschrijving zie pag. 31.

Sterilisatiemethode.

In de inleiding is reeds gesproken over de methode van sterilisatie van den bouillon, met het oog op zijn waarde voor de diphtherietoxineproductie. **Madsen (1)** kon geen verschil in waarde aantoonen tusschen bouillon, die bij lage temperatuur door Chamberlandkaarsen gefiltreerd was en bouillon gesteriliseerd bij 134°. **Martin (2)** daarentegen hecht heel groote waarde aan de methode van sterilisatie en vindt, dat bij een verhitting van den bouillon maximaal tot 70°, de toxineprotie daarin veel beter is, dan in bouillon, die bij 120° is gesteriliseerd, terwijl tevens meerdere diphtheriestammen in de laag verhitte bouillon geschikt zijn voor de vorming van een sterk toxine.

Ook **Walbum (13)** hecht veel waarde aan de sterilisatiemethode. Hij vergeleek met elkaar bouillons gesteriliseerd bij 100° en andere gesteriliseerd bij 115° en vond dat de toxineproductie in den eersten, die in den laatsten verre overtrof. Zijn conclusie was: „Die Untersuchungen machen absolut den Eindruck, dasz die Temperatur bei welcher die Bouillon erhitzt wird, ebenso wie die Erwärmungszeit und die Wasserstofionenkon-

zentration Faktoren sind, die einen groszen Einflusz auf die Verwendbarkeit des Nährbodens auch hinsichtlich der Toxinbildung ausüben".

Groeitijd.

Hoelang moet men een diphtheriebouillon-cultuur laten groeien, om een zoo sterk mogelijk toxine te verkrijgen?

Zooals reeds gezegd is wordt de Ph van een diphtherie-bouilloncultuur gedurende de eerste dagen lager, om daarna meer en meer te stijgen; — op de zure periode volgt een alkalische. Laat men een cultuur echter lang groeien, dan wordt de alkaliciteit tenslotte zóó sterk, dat het toxine er door vernield wordt en het milieu ongeschikt voor een verdere ontwikkeling van den diphtheriebacil.

De verzwakking van het toxine begint reeds bij een Ph van ongeveer 8.4, waarom men meestal een cultuur afbreekt wanneer de Ph 8.3 of 8.4 begint te naderen .

De duur van den groeitijd is dus afhankelijk van de waterstofionenconcentratie van de cultuur.

Reactie van Ramon.

De bepaling van de waterstofionenconcentratie is slechts een aanwijzing of de toxinevorming nog voortschrijdt; een rechtstreeksche bepaling van de toxinesterkte tijdens den groei der cultuur was natuurlijk veel zekerder. Het is echter niet mogelijk tijdens dezen groei telkens de kleinste doodelijke dosis te bepalen, daar deze methode te veel tijd en te veel dieren zou kosten.

In de laatste jaren hebben we echter in de reactie van **Ramon (14)** een methode gekregen, om binnen enkele uren de sterkte van een toxine te bepalen. Deze reactie berust op de ervaring van **Nicolle, Césari** en **Debains (15)** dat toxine en antitoxine, in elkaar juist neutraliseerende hoeveelheden aanwezig zijnde, een binding met elkaar aangaan, welke binding zich als een troebeling in het door hen gebruikte vaste milieu vertoont. De omslachtige methode van **Nicolle** en zijn medewerkers is door **Ramon** tot een eenvoudige laboratorium-methode omgewerkt.

Wanneer men aan een serie buisjes, met een bepaalde hoeveelheid toxine-bouillon gevuld, stijgende hoeveelheden antitoxisch serum toevoegt, ziet men na een zekeren tijd in één buisje een uitvlokking optreden, welke uitvlokking later ook in de naburige buisjes volgt. De vlokjes zakken spoedig op den bodem en in de daarboven heldere vloeistof van dat buisje waarin de uitvlokking het eerst optrad, kan men noch toxine, noch antitoxine aantoonen. In de naburige buisjes ter eener zijde kan men na de uitvlokking nog toxine, in die ter andere zijde nog antitoxine aantoonen. In het buisje, waarin de uitvlokking het eerst is opgetreden zijn dus toxine en antitoxine volledig in het neerslag overgegaan, hebben elkaar volledig gebonden of geneutraliseerd.

Dit resultaat blijkt telkens weer te keeren, wanneer toxine en antitoxine bij elkaar worden gevoegd, zoodat op aanwijzing van **Ramon** deze methode, „de reactie van Ramon", gebruikt wordt om de sterkte, zoowel van een onbekend toxine als van een onbekend serum, te bepalen.

Deze reactie van Ramon heeft reeds de noodige critiek moeten ondervinden, welke ze echter heeft kunnen doorstaan. Toch heeft ze, hoewel ze in vele laboratoria reeds is ingeburgerd, de titratie van toxinen en sera door middel van den dierproef niet geheel kunnen verdringen, daar de resultaten, die verschillende onderzoekers er mee bereikten, niet geheel eensluidend zijn. Dit komt voornamelijk, omdat de techniek grooten invloed op het resultaat heeft en omdat niet door alle onderzoekers dezelfde techniek wordt gevolgd. **Ramon** zelf b.v. achtte de gebruikelijke conserveermiddelen voor sera en toxinen van geen invloed op de uitvlokkingsreactie en liet deze verloopen bij een temperatuur van 55° C.

Kraus, Löwenstein en Baecher (16) daarentegen vinden, dat bij versche sera de verhouding tusschen flocculatie-eenheden en antitoxine-eenheden constant is, maar dat dit niet meer het geval is bij oudere sera, waaraan conserveermiddelen zijn toegevoegd.

Ook de russische onderzoekers **Hoen, Zipp** en **Tschertkow** (17) gebruiken versche toxinen en sera, terwijl ze bovendien het milieu voor een goede diffusie tusschen deze beide zoo ge-

schikt mogelijk maken en de reactie bij kamertemperatuur laten verloopen.

Weer anderen plaatsen de buisjes in de ijskast of in de stoof bij 37°.

In 't Rijks Serologisch Instituut, waar de reactie van Ramon reeds lang in gebruik is, wordt op de verschheid van het serum en de temperatuur van 50°, waarbij de reactie verloopt, grooten nadruk gelegd.

Het behoeft dus geen verwondering te wekken, dat de resultaten in de verschillende laboratoria verkregen niet geheel overeenstemmen.

Daar het door ons bereide diphtherietoxine zich bevond in onverhitten bouillon, dus een milieu, waarvan de invloed op de uitvlokkingsreactie van Ramon geheel onbekend was, hebben we op deze titratie-methode niet geheel durven vertrouwen, maar daarnaast tevens de dierproef verricht, vooral ook omdat door sommigen o.a. **Scholz (18)** aan het milieu, waarin het toxine of serum zich bevindt, een grooten invloed op deze reactie wordt toegekend.

Het serum, dat wij gebruikten, was nauwkeurig met behulp van de dierproef getitreerd; verder was het nooit ouder dan 2 maanden en bevatte 1 % superol als conserveermiddel. Het toxine was steeds versch en bevatte geen conserveermiddelen. De reactie verliep bij 50 à 55° en werd gedurende 6 uur gecontroleerd.

Het te onderzoeken toxine werd in een serie buisjes gedaan telkens in een hoeveelheid van 5 c.c. Het serum, verdund met physiologische keukenzoutoplosing tot het 100 A.E. per c.c. bevatte, werd dan in stijgende hoeveelheden aan de buisjes toegevoegd en wel zóó dat elk buisje 1 A. E. per c.c. toxine meer bevatte dan het vorige. De buisjes werden dan geplaatst in een waterbad van 50 à 55° en telkens gecontroleerd, totdat de uitvlokking in één buisje optrad.

Als eenheid van het uitvlokkend vermogen van het toxine werd genomen de Limes flocculationis (L. fl.) d.i. die hoeveelheid toxine in c.c. uitgedrukt, die juist 1 A.E. neutraliseert. Trad b.v. de uitvlokking het eerst op in een buisje met 5 c.c.

toxine waaraan 60 A.E. waren toegevoegd, dus 12 A.E. per c.c. toxine, dan bedroeg de L. fl. van dit toxine $^1/_{12}$.

Voedingsbodem.

De voedingsbodem, dien wij gebruikten voor de bereiding van diphtherietoxine, was de reeds dikwijls genoemde bouillon van Martin. Deze bouillon bestaat uit 2 gedeelten n.l. het vleeschextract en het varkensmaagextract. De bereiding van het eerste werd reeds besproken in hoofdstuk I, die van het varkensmaagextract is als volgt.

De magen worden zooveel mogelijk van vet ontdaan, door den vleeschmolen gemalen en daarna met warm water en zoutzuur gedurende een nacht in de broedstoof bij 37° geplaatst in de volgende verhouding:

gemalen magen	200 gr.
water	1000 gr.
onverdund zoutzuur	10 gr.

Den volgenden morgen wordt het mengsel even gekookt om de pepsinewerking te doen eindigen en daarna door een doek gefiltreerd. Met normaal-sodaoplossing wordt het dan zwak alkalisch gemaakt en in flesschen gesteriliseerd bij 115°. In deze flesschen wordt het dan bewaard. Wanneer men het wenscht te gebruiken, wordt het even door watten gefiltreerd en in gelijke hoeveelheden aan het vleeschextract toegevoegd.

Verloop der Cultuur.

Om de flesschen bouillon te enten, maakten wij steeds gebruik van een 48 uur oude voorcultuur van den toxinevormenden stam in kolfjes met verhitten of onverhitten bouillon volgens Martin. Aan elke flesch met 250 c.c. bouillon werden dan eenige c.c. van deze voorcultuur toegevoegd. Daarna werden de flesschen in de stoof bij 37° scheef gelegd, om het oppervlak van den bouillon zoo groot mogelijk te maken. Nu en dan werd de toestand van de cultuur nagegaan, door een kleine hoeveelheid af te tappen, waarvan de Ph werd bepaald en waarmede de reactie van Ramon werd ingesteld. Men kan enkele flesschen voorzien van een eenvoudige hevelinrichting, waardoor het mogelijk is, tijdens de ontwikkeling van de cultuur,

een kleine hoeveelheid bouillon te verkrijgen zonder de flesschen te infecteeren.

Wanneer wij naar aanleiding van de gegevens die wij hierdoor verkregen oordeelden, dat de kweektijd moest worden afgebroken, werd de bouillon gefiltreerd door een steriel. Buchnerfilter met asbestwol, waarna aan het filtraat 0,5% carbol werd toegevoegd en zooveel phosphorzuur tot de Ph een waarde van 7.6 had bereikt.

Bepaling van de kleinste doodelijke dosis (d.lm.)

Van dit filtraat werd dan een gedeelte genomen om de dierproef in te stellen. De hoeveelheid toxine, die wij bij de caviae inspoten, was afhankelijk van de uitkomsten der uitvlokkingsreactie, van de sterkte der oppervlaktegroei en van den reuk, dien de cultuur verspreidde. Als eenheid van toxinesterkte gebruikten wij de dosis letalis minima, „d.l.m.", d.w.z. die hoeveelheid toxine, die een caviae van 250 gr. juist in vier dagen doodt. De hoeveelheid toxine, die deze d.l.m. vormde, drukten wij in milligrammen uit, uitgaande van de veronderstelling dat 1 c.c. toxine 1 gram weegt.

De uitkomsten van onze toxinesterkten in d. l. m. zijn onderhevig aan de individueele verschillen van de caviae onderling tegenover een toxinevergiftiging. Daar we echter voor iedere proef niet verscheidene dieren konden gebruiken, hebben we deze individueele gevoeligheid niet kunnen uitschakelen.

Wanneer verschillende toxinen met elkaar vergeleken zouden worden, maakten wij de verdunningen zóó, dat van elk toxine een gelijke hoeveelheid vloeistof werd ingespoten. De caviae die wij gebruikten hadden een gewicht van 240—260 gram en werden steeds na den dood aan een lijkschouwing onderworpen, om na te gaan of de bekende typische verschijnselen van diphtherietoxinevergiftiging aanwezig waren.

Proef I.

Onze eerste proef had ten doel na te gaan, of de toxineproductie in onverhitten en verhitten bouillon verschillend zou zijn. Daartoe werden eenige flesschen met bouillon O en an-

dere met bouillon V, geënt met dezelfde voorcultuur van den stam P.W. No. 8. Daarnaast werd aan een deel van den verhitten bouillon 2% gelatine toegevoegd om te zien of wij de proeven van **Godey (19)** konden bevestigen.

Deze onderzoeker n.l. merkte op, dat in het Institut Pasteur te Parijs veel sterkere toxinen worden verkregen dan op andere plaatsen, hoewel in de bereidingswijze van den bouillon geen verschillen bestaan. Alleen gebruikt men in Parijs het vleesch van zeer jonge kalveren voor de bereiding van het vleeschextract, terwijl men elders daarvoor het vleesch van meer oudere dieren neemt. Daar de viscositeit daardoor in den Parijschen bouillon veel grooter is, raadde Godoy aan om aan den bouillon 5% gelatine toe te voegen, met welke methode hij zeer goede resultaten verkreeg.

Uit proef 1 (zie tabel) blijkt dus, dat in bouillon V de cultuur 7 dagen noodig had om een Ph van 8,3 te bereiken, in welken tijd een toxine gevormd werd met een d.l.m. van 7,5 mgr. De toevoeging van 2% gelatine had geen grooten invloed. Weliswaar was de Ph van 8.3 in 6 dagen reeds bereikt, maar het toxine was niet sterker dan in den verhitten bouillon zonder gelatine.

In den bouillon O echter steeg de waterstofionenconcentratie zoo snel, dat wij reeds na 4 dagen de cultuur moesten afbreken, terwijl er in dien korten tijd reeds een toxine was gevormd met een d.l.m. van 4 mgr. In veel korteren tijd was dus een veel sterker toxine gevormd dan in den bouillon V.

Tijdens de ontwikkeling van de cultuur was de oppervlaktegroei op den bouillon O ook veel sterker dan op den verhitten; een verschijnsel dat ook bij alle volgende proeven aanwezig was. Ook de kenmerkende diphtherietoxinegeur was aan den onverhitten bouillon zeer duidelijk waarneembaar.

De reactie van Ramon, ingesteld met den verhitten bouillon was duidelijk en prompt in één buisje het eerst.

In den bouillon waaraan 2% gelatine was toegevoegd, verliep de reactie minder mooi. Wel traden groote vlokken op, maar niet zoo duidelijk in één buisje het eerst; soms zelfs in alle ingestelde buisjes tegelijk. We hebben dan ook aan de

TABEL VAN PROEF I

\+ = locaal infiltraat
\+ + = sterk locaal infiltraat
n = locale necrose
z = ziek
† = dood

No.	Voedingsbodem	Stam	Ph.	Kweektijd	L. fl.	Dierproef	d. l. m.
63b	**Martin O**	**P. W. No. 8**	7.1 7.7 7.9 8.2	 2 dagen 3 „ 4 „	 1/4 — 1/13	 5 m.gr. cavia 250 gr. 1' d + +; 2' d †. 3 m.gr. cavia 250 gr. 1' d +; 2' d + +; 3' d + +: 4 d' + + z.	 **± 4 m.gr.**
63	**Martin V**	**P. W. No. 8**	7.1 7.3 7.8 8.1 8.1 8.2 8.3	 2 dagen 3 „ 4 „ 5 „ 6 „ 7 „	 1/3 1/6 1/7 — 1/11 1/11	 10 m.gr. cavia 250 gr. 1' d + +; 2' d † 5 m.gr. cavia 250 gr. 1' d +; 2' d +; 3' d +; 4' d +;	 **± 7.5 m.gr.**
63a	**Martin V + 2% gelatine**	**P. W. No. 8**	7.1 8.1 8.3	 5 dagen 6 „	 1/13 1/15	 10 m.gr. cavia 250 gr. 1' d + +; 2' d †; 5 m.gr. cavia 250 gr. 1' d +; 2' d +; 3' d +; 4' d +;	 **± 7.5 m.gr.**

uitkomsten, die we met de reactie van **Ramon** in bouillon + gelatine verkregen, weinig waarde durven hechten.

Ook in den onverhitten bouillon verliep de reactie niet zoo mooi, als we in den verhitten gewend waren te zien. Niet alleen in deze proef, maar ook in de volgende zagen we meestal, dat de reactie pas optrad na langeren tijd en met kleinere vlokken.

Proef II.

In deze proef hebben we aan de geheele hoeveelheid verhitten bouillon gelatine toegevoegd, maar nu in een kleiner percentage, daar anders de bouillon niet vloeibaar bleef. Helaas hadden we hiernaast geen verhitten bouillon zonder gelatine geplaatst, zoodat de invloed van de gelatinetoevoeging niet nauwkeurig te controleeren viel.

Tevens hebben we nagegaan of gelatinetoevoeging ook invloed zou hebben op de toxineproductie in onverhitten bouillon volgens Martin. We hebben daarvoor onverhitten bouillon met en zonder gelatine geënt met dezelfde voorcultuur.

Daar de toxine, geproduceerd in bouillon O van de eerste proef, zoo sterk bleek te zijn, hebben we nagegaan of we ook nog een bruikbaar toxine konden verkrijgen, wanneer we den onverhitten bouillon met physiologische zoutoplossing verdunden. Indien dit mogelijk was, zouden we een betrekkelijk eiwitarm toxine verkrijgen, wat in het bijzonder voor de actieve onvatbaarmaking tegen diphtherie met uit dit toxine bereid anatoxine van groot belang zou zijn, daar dan de reacties door het vreemde eiwit veroorzaakt in geringere mate zouden optreden.

Bij proef II (zie Tabel) verkregen we dus in den verhitten bouillon + gelatine een toxine met een d.l.m. van 5 mgr. in 7 dagen, terwijl in den onverhitten bouillon reeds na 5 dagen een toxine gevormd was met een d.l.m. van ongeveer 3 mgr. Evenals in proef I werd dus ook hier in den onverhitten bouillon het toxine sneller en krachtiger geproduceerd.

Wanneer we aan den bouillon O nog 1% gelatine toevoegden, werd het resultaat niet beter. We konden immers in deze

TABEL VAN PROEF II

No	Voedingsbodem	Stam	P.h.	Kweektijd	F.fl.	Dierproef	d. l. m.
65	**Martin V + 1% gelatine**	**P. W. No. 8**	7.1 7.9 8.1 8.2 8.4	 4 dagen 5 „ 6 „ 7 „ later	 1/16 ? 1/14 1/14 1/15 1/14	 5 m.gr. cavia 250 gr. 1' d +; 2' d †. 3 m.gr. cavia 250 gr. 1' d —; 2' d +; 3' d +; 4' d —.	**4 à 5 m.gr.**
67	**Martin O**	**P. W. No. 8**	7.1 7.9 8.3	 4 dagen 5 „ later	 1/15 à 1/17 1/18 à 1/20 1/20	 3 m.gr. cavia 250 gr. 1' d + + z; 2' d †. 2.5 m.gr. cavia 280 gr. 1' d +; 2' d ++; 3' d + +; 4' d++;	**<3 m.gr.**
68	**Martin O + 1% gelatine**	**P. W. No. 8**	7.1 8.1 8.3	 4 dagen 5 „ later	 1/12 1/14 1/14	 5 m.gr. cavia 250 gr. 1' d +; 2' d ++; 3' d ++; 4' d †	**5 m.gr.**
69	**Martin O Zoutopl. $\frac{}{aa}$**	**P. W. No. 8**	7.1 8.1 8.2	 4 dagen 5 „	 1/7 1/7	 7.5 m.gr. cavia 250 gr. 1' d —; 2' d +; 3' d +; 4' d +	**>7.5 m.gr.**
70	**Martin O 1 dl. Zoutopl. 3 dl.**	**P. W. No. 8**	7.1 8.0 8.0 8.1 8.1	 4 dagen 5 „ 6 „ 7 „	 — — — —		

vloeistof slechts een toxine van 5 mgr. verkrijgen. De techniek van de bereiding van dezen bouillon + gelatine leverde in zooverre moeilijkheden op, dat de bouillon slechts zeer langzaam het E.K. filter passeerde.

Toch hebben we de proef met gelatinetoevoeging nog eens herhaald, om te zien of het resultaat constant bleef. (zie pr. III)

De verdunningen van den onverhitten bouillon met zoutsolutie stelden onze verwachtingen teleur. De reactie van Ramon toch gaf aan, dat slechts $^1/_7$ c.c. toxine 1 A.E. neutraliseerde (L. fl. $^1/_7$), terwijl de d.l.m. zeker grooter dan 7.5 mgr. was, waardoor het toxine voor immunisatiedoeleinden minder geschikt is. De bouillon, verdund met 3 maal zooveel physiol. zoutoplossing, gaf geen reactie van Ramon en vertoonde geen kenmerkende toxinegeur, zoodat we de d.l.m. niet bepaald hebben.

Proef III.

Deze proef is eigenlijk een herhaling van proef II. De bedoeling is nog eens na te gaan, of het verschil in toxineproductie in onverhitten en verhitten bouillon constant bleef, terwijl we tevens nog eens den invloed van gelatinetoevoeging in beide bouillons wilden beoordeelen.

Ook hebben we nog eenmaal onverhitten bouillon met gelijke hoeveelheden physiol. zoutoplosing verdund in de hoop een bruikbaar toxine in dit mengsel te verkrijgen.

In deze proef hebben we alle flesschen geënt met een voorcultuur van den stam P. W. No. 8 in onverhitten bouillon. Uit proef I en II volgt n.l., dat de toxineproductie sneller en sterker verloopt in bouillon O dan in bouillon V. Wanneer we nu voor de enting den stam gedurende 48 uur in bouillon O kweeken, zullen misschien de toxineproduceerende eigenschappen van de bacillen nog meer versterkt worden. Daar proef II en III alleen van elkaar verschillen in de soort voorcultuur, zouden we dus den invloed daarvan kunnen nagaan.

We zien, dat in deze proef (zie Tabel) in al de bouillons een veel sterker toxine is ontstaan dan in proef II. Hoogstwaar-

TABEL VAN PROEF III

No.	Voedingsbodem	Stam	Ph.	Kweektijd	L. fl.	Dierproef	d. l. m.
73	**Martin V**	**P. W. No. 8 O**	7.2 8.2 8.3 8.4	 5 dagen 7 „ 9 „	 1/9 1/11 1/13	 4 m.gr. cavia 250 gr. 1' d +; 2' d ++; 3' d ++; 4' d †	**4 m.gr.**
74	**Martin V + 1% gelatine**	**P. W. No. 8 O**	7.2 8.1 8.2 8.4	 5 dagen 7 „ 9 „	 1/13 1/13 1/17	 3 m.gr. cavia 240 gr. 1' d +; 2' d ++; 3' d †	**3 m.gr.**
71	**Martin O**	**P. W. No. 8 O**	7.2 8.3	5 dagen	1/21 à 1/23	4 m.gr. cavia 300 gr. 1' d ++; 2' d ++; 3' d † 2 m.gr. cavia 300 gr. 1' d ++; 2' d ++; 3' d ++ z; 4' d † 1.5 m.gr. cavia 250 gr. 1' d +; 2' d ++; 3' d ++; 4' d ++z.	**2 m.gr.**
72	**Martin O + 1% gelatine**	**P. W. No. 8 O**	7.2 8.2	5 dagen	1/21	2 m.gr. cavia 250 gr. 1' d +; 2' d ++; 3' d ++; 4' d †	**2 m.gr.**
71b	**Martin O Zoutopl.** $\frac{}{aa}$	**P. W. No. 8 O**	7.2 8.2	7 dagen	—		**?**

schijnlijk is dit te wijten aan de onverhitte voorcultuur. De toxineproduceerende eigenschappen van den diphtheriebacil worden dus verstrekt, wanneer deze eenigen tijd in onverhitten bouillon heeft gegroeid.

Verder zien we evenals in proef I en II een veel sterkere en snellere toxinevorming in onverhitten dan in verhitten bouillon. Deze vorming geschiedt bijna 2 maal zoo snel, terwijl dan ook nog een 2 maal zoo sterk toxine aanwezig blijkt te zijn.

In tegenstelling met de resultaten van proef II zien we hier een gunstige werking van de gelatine op de productie van het toxine, vooral in verhitten bouillon. Van de verschillende toxinen loopt hier de sterkte ook parallel met het antitoxinebindend vermogen, zooals uit de resultaten van de reactie van Ramon blijkt.

In den onverhitten bouillon verdund met physiol. zoutoplossing wees noch de reactie van Ramon, noch de geur op de aanwezigheid van een sterk toxine.

Proef IV.

Uit proef III was gebleken, dat een onverhitte voorcultuur waarschijnlijk grooten invloed uitoefende op de toxineproductie van den diphtheriebacil. De eigenschap van sterke toxine te produceeren, die de bacil in onverhitten bouillon had verkregen, werd dus behouden, ook wanneer de bacil weer in verhitten bouillon werd geënt. Om dit nog eens na te gaan, hebben we den stam P. W. No. 8 eerst gedurende 5 dagen op onverhitte bouillonagar en daarna gedurende 10 dagen in 3 passages in onverhitten bouillon volgens Martin gekweekt, teneinde zijn toxineproduceerende eigenschappen flink te versterken. Daarna werd deze stam in onverhitten en verhitten bouillon volgens Martin geënt. Andere bacillen van denzelfden stam hebben we 5 dagen op Löffler-serum en daarna ook gedurende 10 dagen in 3 passages gekweekt in verhitten bouillon volgens Martin en toen geënt in Martin V om de toxineproductie na te gaan.

Allereerst blijkt weer uit deze proef (zie Tabel), dat in on-

TABEL VAN PROEF IV

No.	Voedingsbodem	Stam	P.h.	Kweektijd	L. fl.	Dierproef	d. l. m.
76	**Martin O**	**P. W. No. 8 O**	7.2				
			7.1	1 dag	—		
			7.5	2 dagen	—		
			7.6	3 „	—		
			8.3	4 „	—	4 m.gr. cavia 240 gr.	
						1' d +; 2' d ++; 3' d ++ z; 4' d z. 210 gr.	**4 à 5 m.gr.**
77	**Martin V**	**P. W. No. 8 O**	7.3				
			7.1	1 dag	—		
			7.5	2 dagen	1/5		
			7.6	3 „	1/8		
			8.1	4 „	1/10		
			8.3	6 „		5 m.gr. cavia 250 gr.	iets grooter
						1' d +; 2' d ++; 3' d ++; 4' d ++ z.	dan **5 m.gr.**
78	**Martin V**	**P. W. No. 8 V**	7.3				
			7.1	1 dag	—		
			7.5	2 dagen	1/3		
			7.7	3 „	1/6		
			8.1	4 „	—		
			8.3	6 „		5 m.gr. cavia 240 gr.	veel grooter
						1' d +; 2' d +; 3' d +; 4' d +	dan **5 m.gr.**

verhitten bouillon volgens Martin het toxine sneller en sterker wordt gevormd dan in verhitte.

Verder blijkt, dat de diphtheriebacil zijn sterke toxinevormende eigenschappen, verkregen in een onverhitten voorcultuur, eenigszins behoudt, wanneer hij weer in verhitten bouillon gekweekt wordt. De invloed van een onverhitte voorcultuur blijkt toch uit no. 77 en 78, daar in no. 77 een onverhitte voorcultuur en in no. 78 een verhitte voorculuur voor de enting werd gebruikt. De uitkomsten van de reactie van Ramon en van de dierproef wijzen op de aanwezigheid van een sterker toxine in no. 77 dan in no. 78, hoewel de toxineproductie in beide met gelijke snelheid verliep.

Hoewel uit deze ééne proef nog niet veel gevolgtrekkingen mogen worden gemaakt, lijkt het toch waarschijnlijk, dat de diphtheriebacil zijn sterk toxinevormend vermogen in onverhitten bouillon verkregen, nog eenigermate behoudt bij groei in verhitten bouillon.

Ook ziet men in deze proef, dat zoowel in den onverhitten als in den verhitten bouillon de alkaliciteit eerst daalt om reeds na 2 dagen weer duidelijk te stijgen.

Proef V.

Reeds door de ontdekkers van het diphtherietoxine werd gewezen op het groote belang van voldoende luchttoevoer aan de diphtherieculturen. Proef V werd daarom voornamelijk door ons ingesteld, om na te gaan of de goede toxineproductie in onverhitten bouillon, misschien verklaard zou kunnen worden door den grooteren luchtrijkdom van dezen bouillon. Door de sterke verhitting, die de verhitte bouillon ondergaat, zal daaruit toch meer lucht verdreven worden dan uit den onverhitten bouillon, die slechts tot 60° wordt verwarmd.

We hebben daarom verhitten bouillon volgens Martin met behulp van een ballon in een fijn straaltje afgetapt en daarna de flesschen herhaaldelijk geschud, om zoodoende den bouillon weer geheel met lucht te verzadigen.

Deze, met lucht verzadigde verhitte bouillon hebben we vergeleken met verhitten bouillon, die de genoemde bewerking

TABEL VAN PROEF V

No.	Voedingsbodem	Stam	P.h.	Kweektijd	L.fl.	Dierproef	d. l. m.
75 a	**Martin O**	**P. W. No. 8 O**	7.1				
			7.9	4 dagen	1/20		In verband met de l. fl. waarschijnlijk ± **2 m.gr.**
			8.2	5 ,,	1/23	1.5 m.gr. cavia 260 gr. 1' d +; 2' d +; 3' d +; 4' d +	
75b	**Martin V**	**P. W. No. 8 O**	7.3				
			8. 1	4 dagen	1/9		
			8.3	5 ,,	1/8		
			8.4	7 ,,	—	7.5 m.gr. cavia 260 gr. 1' d +; 2' d ++; 3' d ++ †	< **7.5 m.gr.**
75c	**Martin V verzadigd met lucht**	**P. W. No. 8 O**	7.3				
			8.1	4 dagen	1/9		
			8.3	5 ,,	1/8		
			8.4	7 ,,	—		

niet had ondergaan. Evenals in alle vorige proeven hebben we ook hier weer de toxineproductie in onverhitten bouillon volgens Martin nagegaan.

Doordat de reactie van Ramon (zie Tabel) ingesteld met den onverhitten bouillon een l. fl. van $^1/_{23}$ aanwees, hebben we slechts 1.5 mgr. bij een cavia ingespoten. Een 2e dierproef was onmogelijk, daar aan het toxine reeds formlol was toegevoegd om er anatoxine van te maken. Met het oog op de l. fl. van $^1/_{23}$en de reacties van de cavia ingespoten met 1,5 mgr., mag zeker worden aangenomen dat de d.l.m. wel niet veel grooter dan 2 mgr. zal zijn. We zien dus steeds weer, dat in den onverhitten bouillon de toxineproductie veel beter is dan in den verhitten.

Het verzadigen met lucht van den verhitten bouillon bleek verder geen invloed op de toxineproductie te hebben. De stijging der waterstofionenconcentraties en de uitkomsten van de reactie van Ramon waren in 75b en 75c zoo nauwkeurig gelijk, dat we er van afgezien hebben nog een afzonderlijke dierproef in te stellen.

Proef VI.

In al de vorige proeven hebben we slechts den amerikaanschen stam P. W. No. 8 voor de toxineproductie gebruikt, daar deze stam daarvoor bij uitstek geschikt is vanwege zijn sterk toxineproduceerend vermogen.

In de volgende proef hebben we ook van 2 andere stammen de toxineproductie nagegaan, n.l. van een ouden laboratoriumstam L en van een stam A, dien we uit de keel van een diphtheriepatient hadden gekweekt.

Beide stammen hadden gedurende 18 dagen in verschillende passages op onverhitte bouillonagar gegroeid en daarna gedurende 2 dagen in de onverhitte voorcultuur, waarmede de onverhitte bouillon geënt werd. Teneinde een goede vergelijking tusschen de onverhitte en verhitte voedingsbodems mogelijk te maken, hadden we dezelfde stammen ook 18 dagen op Löffler-serum gekweekt en daarna 2 dagen in de verhitte voorcultuur, waarmede de verhitte bouillon werd geënt.

Zoodoende gebruikten we voor de toxineproductie 3 stammen n.l. P.W. No. 8, L en A, die alle dezelfde bewerkingen hadden ondergaan, alleen eenerzijds op onverhitte, anderzijds op verhitte voedingsbodems.

Vóór de enting van de bouillons bleek helaas, dat de verhitte een Ph. bezat van 7.3, terwijl de onverhitte een Ph. van 7.1 vertoonde. Hoewel deze beide „begin Ph.'s" voor de toxineproductie geoorloofd zijn, werd de vergelijking tusschen de beide bouillons door dit verschil in waterstofionenconcentratie toch eenigszins bemoeilijkt.

Wanneer we toch een gering verschil in toxinesterkte zouden verkrijgen, kon dit veroorzaakt zijn door het verschil in „begin Ph." van de twee bouillons.

Een duidelijk verschil in toxinesterkte echter kon niet veroorzaakt zijn door het verschil in „begin Ph", daar dit, zooals de ervaring leert, slechts een geringen invloed op de toxineproductie heeft.

In deze proef beteekent een V achter den geënten stam, dat deze op verhitte voedingsbodems (waaronder ook Löfflerserum) heeft gegroeid, terwijl een O een voorgeschiedenis op onverhitten bodem aangeeft.

We zien dus in deze proef (zie Tabel), dat de stam P. W. No. 8 in onverhitten bouillon een toxine produceerde met een d.l.m. van 6 m.gr. en dat de 2 willekeurig gekozen stammen L en A in denzelfden bouillon eveneens een toxine produceerden van ongeveer 6 m.gr.

Deze 2 stammen waren zooals trouwens vrijwel alle diphtheriestammen in den verhitten bouillon niet geschikt voor de toxineproductie, zooals blijkt uit de geringe toxinesterkten, die in No. 3 en 5 gevormd werden. Deze stammen evenaren dus wat hun toxineproductie betreft in onverhitten bouillon den beroemden P. W. No. 8.

Op dit feit, dat gewone diphtheriestammen blijkbaar door groei op onverhitte voedingsbodems tot sterke toxinevorming zijn te brengen, wordt uitdrukkelijk de aandacht gevestigd. De P.W. No. 8 onderscheidt zich van de andere, doordat hij dat in verhitten bouillon ook doet.

TABEL VAN PROEF VI

No.	Voedingsbodem	Stam	P.h.	Kweektijd	L. fl.	Dierproef	d. l. m.
1	**Martin V**	**P. W. No. 8 V**	7.3 8.2	4 dagen		Geïnfecteerd	
2	**Martin O**	**P. W. No. 8 O**	7.1 8.1 8.2	4 ,, 5 ,,	1/12 1/14	6 m.gr. cavia 240 gr. 1' d +; 2' d ++; 3' d †	**< 6 m.gr.**
3	**Martin V**	**L. V.**	7.3 8.1 8.3	4 ,, 5 ,,	— —	8 m.gr. cavia 240 gr. 1' d —; 2' d +; 3' d —, 4' d —	**> 8 m.gr.**
4	**Martin O**	**L. O.**	7.1 8.1 8.2	4 ,, 5 ,,	1/12 1/14	6 m.gr. cavia 240 gr. 1' d ++, 2' d †	**< 6 m.gr.**
5	**Martin V**	**A. V.**	7.3 8.2 8.3	4 ,, 5 ,,	— —	8 m.gr. cavia 240 gr. 1' d —, 2' d +, 3' d +, 4' d —	**> 8 m.gr.**
6	**Martin O**	**A O.**	7.1 8.1 8.2	4 ,, 5 ,,	— —	6 m.gr. cavia 240 gr. 1' d +; 2' d ++; 3' d ++; 4' d n. z.	iets grooter dan **6 m.gr.**

Van de toxinen, door de stammen L en A in verhitten bouillon gevormd, hebben we 8 m.gr. bij caviae ingespoten, die daarna slechts een geringe plaatselijke reactie vertoonden. De d.l.m. van deze toxinen ligt dus veel hooger, waarschijnlijk nog ver boven de 10 m.gr.

Het is duidelijk, dat een dergelijk verschil in toxineproductie in den onverhitten en verhitten bouillon, zooals in deze proef tot uiting komt, niet veroorzaakt kan worden door het verschil in „begin Ph"; de oorzaak moet dus uitsluitend gelegen zijn in de verschillende bereidingswijze, dus in het verschil van verhitting welke de bouillons hebben ondergaan.

Proef VII.

In de vorige proef hebben 2 willekeurig gekozen d. stammen een even sterk toxine geproduceerd als de P.W. No. 8, doordat ze in onverhitten bouillon werden geent. Vóór deze enting hadden de beide stammen echter ook reeds 20 dagen lang op onverhitte bouillonagar en in onverhitten bouillon gegroeid. Heeft de onverhitte voedingsbodem nu zoo'n langen tijd noodig om de toxineproductie van diphtheriestammen te versterken, of kan ze dat ook in korteren tijd doen? Om dit na te gaan hebben we 5 diphtheriestammen uit het materiaal dat naar het Centraal Laboratorium ter onderzoek was gezonden, met behulp van Löffler-serumplaten rein gekweekt en ze daarna in een verhitte voorcultuur gekweekt, teneinde daarmede den onverhitten bouillon voor de toxineproductie te enten. Deze 5 stammen konden dus in onverhitten bouillon hun toxine produceeren, maar misten een voorgeschiedenis op onverhitten bodem.

Van de 5 gebruikte stammen waren er dus 3, die een toxine met een d.l.m. van 8 m.gr. produceerden, terwijl de sterkten van de toxinen door de 2 andere stammen gevormd ook niet veel daarvan verschilden. (Zie Tabel).

Hieruit blijkt dus, dat de onverhitte bouillon de toxinevormende eigenschappen van willekeurige diphtheriestammen sterk bevordert, daar al de stammen, die vroeger in het

TABEL VAN PROEF VII

No	Voedings-bodem	Stam	P.h.	Kweektijd	L.fl.	Dierproef	d. l. m
84a	**Martin O**	**B V**	7.1 8.2	5 dagen	—	8 m.gr. cavia 270 gr. 1' d +, 2' d + +, 3' d + +, d' d + +	iets grooter dan **8 m.gr.**
84b	**Martin O**	**C V**	7.1 8.2	5 dagen	—	8 m.gr. cavia 260 gr. 1' d +, 2' d + +, 3' d + +, 4' d †	**8 m.gr.**
84c	**Martin O**	**D V**	7.1 8.2	5 dagen	—	8 m.gr. cavia 260 gr. 1' d +, 2' d + +, 3' d + +, 4' d n.	iets grooter dan **8 m.gr.**
84d	**Martin O**	**E V**	7.1 8.3	5 dagen	—	8 m.gr. cavia 260 gr. 1' d +, 2' d + +, 3' d + +, 4' d †	**8 m.gr.**
84e	**Martin O**	**F V**	7.1 8.3	5 dagen	—	8 m.gr. cavia 250 gr. 1' d +, 2' d + +, 3' d + +, 4' d †	**8 m.gr.**

Rijks Serologisch Instituut onderzocht werden in gewone verhitten bouillon, toxinen vormden met een d.l.m. van minstens 20 m.gr.

Toch zijn de toxinen in deze proef verkregen niet zoo krachtig als we gewoonlijk met den stam P.W. No. 8 verkrijgen.

We kunnen dus hieruit besluiten, dat willekeurige diphtheriestammen, gekweekt op verhitten voedingsbodem en daarna geënt in onverhitten bouillon, hierin bruikbare toxinen vormen, die evenwel in sterkte achter staan bij de toxinen, die we meestal met de P.W. No. 8 verkrijgen.

Wanneer echter diphtheriestammen voor de enting in onverhitten bouillon ook nog een tijd op onverhitte voedingsbodems hebben gegroeid, dan produceeren zij toxinen, die de — door de P.W. No. 8 gevormde — in sterkte evenaren.

De diphtheriestammen, met uitzondering van den P. W. No. 8, worden dus door den onverhitten bouillon niet plotseling in hun toxinevormende eigenschappen versterkt, maar slechts langzamerhand.

Proef VIII.

Uit de beide vorige proeven blijkt, dat de diphtheriestam P.W. No. 8 slechts daarin van andere stammen verschilt, dat hij in verhitten bouillon een sterk toxine produceert. De andere stammen vormen in onverhitten bouillon eveneens een sterk toxine, vooral wanneer ze reeds langen tijd op O waren gekweekt, maar missen de eigenschap om het in verhitten bouillon eveneens te doen.

Wanneer het nu blijkt, dat een diphtheriestam, die in onverhitten bouillon een sterk toxine kan produceeren, deze eigenschap bij daaropvolgenden groei in verhitten bouillon behoudt, dan zou hij wat de toxineproductie betreft gelijk zijn aan den P.W. No. 8.

Het sterk toxinevormend vermogen van den P.W. No. 8 zou dan hierdoor verklaard kunnen worden, dat deze stam vroeger eens een tijd gegroeid heeft op een voedingsbodems, welke evenals de onverhitte zijn toxine produceerende eigenschap heeft versterkt.

Daar de diphtheriestammen L en A een groot verschil vertoonen in hun toxineproductie in verhitten en onverhitten bouillon (zie proef VI), zijn deze stammen zeer geschikt om na te gaan, in hoeverre het krachtig toxinevormend vermogen verkregen in onverhitten bouillon behouden blijft, tijdens daaropvolgenden groei op verhitten voedingsbodem.

We hebben daarom in deze proef gebruik gemaakt van den stam L, die 6 weken lang op onverhitte bouillonagar en in onverhitten bouillon had gegroeid en waarvan we op grond van proef VI wisten, dat hij, wat betreft de toxineproductie op onverhitten bodem, kon concurreeren met den P.W. No. 8.

Dezen stam hebben we nu na den groei op onverhitten bodem een week lang gekweekt in drie passages in Löfflerserum en daarna gedurende 2 dagen in de verhitte voorcultuur, waarmede nu verhitten bouillon voor de toxineproductie werd geënt.

Daarnaast hebben we denzelfden stam, die dezelfde bewerkingen had ondergaan maar steeds op verhitten bodem, eveneens geënt in verhitten bouillon.

We hadden dus zoodoende naast elkaar 2 gelijke verhitte bouillons, geent met denzelfden diphtheriestam; een gedeelte van dezen stam had echter vroeger reeds eenigen tijd op onverhitten bodem gegroeid, waardoor we dus na konden gaan of de eigenschap van sterk toxine te produceeren lang door den stam behouden bleef. In de tabel is deze stam met O + V aangeduid.

We zien dus uit deze proef, dat die bacillen van den stam

TABEL VAN PROEF VIII

No	Voedingsbodem	Stam	P.h.	Kweektijd	L.fl.	Dierproef	d. l. m.
82c	**Martin V**	**L. V.**	7.1				
			7.7	4 dagen	1/4		
			8.1	5 „	—		
			8.3	7 „	—	8 m.gr. cavia 250 gr.	
				later	—	1' d —, 2' d +, 3' d +, 4' d +	**> 8 m.gr.**
82d	**Martin V**	**L.O.+V**	7.1				
			7.7	4 dagen	—		
			7.9	5 „	—		
			8.3	7 „	—	8 m.gr. cavia 250 gr.	
				later	—	1' d +, 2' d + +, 3' d †	**< 8 m.gr.**

L, die door groei op onverhitten bodem een sterk toxineproduceerend vermogen hadden verkregen, bij een daaropvolgenden groei in verhitten bouillon ook nog een bruikbaar toxine produceeren, terwijl de bacillen van denzelfden stam, die steeds op verhitten bodem hadden gegroeid, dit niet vermogen te doen. De eigenschap blijft dus door de bacillen zeker gedeeltelijk behouden nadat zij 7 dagen op Löffler-serum en 9 dagen in verhitten bouillon volgens Martin hadden gegroeid.

De mogelijkheid is dus niet uitgesloten, dat de P.W. No. 8 zijn sterke toxineproductie te danken heeft aan een voedingsbodem, die hem jaren geleden dit vermogen verleende.

TABEL VAN PROEF IX

No	Voedingsbodem	Stam	P.h.	Kweektijd	L.fl.	Dierproef	d. l. m.
82a	**Martin 60° C**	**P. W. No. 8**	7.2				
			7.8	4 dagen	1/12		
			8.1	5 ,,	1/10	5 m.gr. cavia 250 gr.	
				later	—	1' d + +, 2' d †	
						3 m.gr. cavia 240 gr.	
						1' d + +, 2' d †	**< 3 m.gr.**
82b	**Martin 100° C**	**P. W. No. 8**	7.2				
			7.8	4 dagen	1/6		
			8.0	5 ,,	—		
			8.3+	7 ,,	—	5 m.gr. cavia 260 gr.	
				later	—	1' d +, 2' d + +, 3' d + +, 4' d †	**5 m.gr.**

Proef IX.

Toen wij verschillende hoeveelheden bouillonagar, bereid bij verschillende temperaturen met elkaar vergeleken met het oog op den groei van den diphtheriebacil, bleek dat deze groei op bouillonagar verhit tot 60° C. het sterkst was en dat de groei minder sterk werd, wanneer de bouillonagar een verhitting tot 90° à 100° C. had ondergaan. Naar aanleiding van dit verschijnsel hebben we ook bouillon volgens Martin bereid, welke niet hooger dan tot 100° was verhit en deze vergeleken met den gewonen onverhitten bouillon, die dus tot 60° C. was verhit geweest. Wanneer nu zou blijken dat de toxineproductie in beide bouillons even sterk zou zijn, dan konden we de sterilisatie door filtratie vervangen door de eenvoudiger methode van verhitting op 100°, waardoor de bereidingswijze veel gemakkelijker zou worden. De bouillon, die we voor deze proef gebruikten, werd gesteriliseerd, door hem drie maal gedurende een half uur op 100° te verhitten en daarna, evenals den gewonen onverhitten bouillon, geënt met den diphtheriestam P. W. No. 8.

Uit deze proef (zie Tabel) blijkt dus, dat een verhitting tot 100° C. den bouillon minder geschikt maakt voor de diphtherietoxineproductie dan een verhitting tot 60° C. In den bouillon verhit tot 100° C. werd toch een toxine gevormd met een d.l.m. van 5 mgr., terwijl in den andere verhit tot 60° een toxine aanwezig was met een d.l.m., die nog belangrijk kleiner was dan 3 mgr.

Proef X.

Uit de vorige proeven blijkt, dat in onverhitten bouillon volgens Martin factoren aanwezig zijn, die de toxineproductie van den diphtheriebacil bevorderen, maar van welken aard deze factoren zijn is ons onbekend, evenmin aan welke bestanddeelen van den bouillon (bloed, eiwitten enz.) zij gebonden zijn. Wij hebben daarom ook onverhitten en verhitten gistbouillon gemaakt, om na te gaan of deze factoren ook in onverhitten

TABEL VAN PROEF X

No	Voedingsbodem	Stam	P.h.	Kweektijd	L.fl.	Dierproef	d. l. m.
83a	**Gistbouillon O**	**P. W. No. 8**	7.2				
			7.7	4 dagen	—		
			7.9	5 ,,	—		
			8.3	7 ,,	—	8 m.gr. cavia 280 gr.	
				later	—	1' d —, 2' d +, 3' d +, 4' d —	**> 8 m.gr.**
No	**Gistbouillon V**	**P. W. No. 8**	7.1				
			7.5	4 dagen	—		
			7.7	5 ,,	—		
			8.1	7 ,,	—	8 m.gr. cavia 280 gr.	
				later	—	1' d —, 2' d +, 3' d —, 4' d —	**> 8 m.gr.**

gistbouillon aanwezig waren. Wanneer dit n.l. het geval bleek te zijn, dan konden we daaruit besluiten, dat ze gebonden waren aan stoffen, die zoowel in den gistbouillon als in den bouillon volgens Martin aanwezig zijn, terwijl ze anders gebonden moesten zijn aan stoffen, die wel in den bouillon volgens Martin en niet in den gistbouillon aanwezig zijn.

De bereidingswijze was zooals door **Spronck** (20) in 1898 is aangegeven: 500 gr. koningsgist wordt met 2,5 liter water een uur lang op 60° verhit, waarna het geheel een dag op een rustige plaats wordt gezet om de gist te laten bezinken. Den volgenden dag wordt dan de heldere vloeistof van het bezinksel afgeheveld.

Aan deze vloeistof wordt dan 2% pepton Witte en 0,5% zout toegevoegd, die door verhitting tot 60° worden opgelost. Daarna wordt de Ph op de gewenschte hoogte gebracht en een gedeelte van den gistbouillon gesteriliseerd met behulp van temperaturen tot 115° C., terwijl het andere gedeelte gesteriliseerd wordt door filtratie.

Het verkregen resultaat van deze proef (zie Tabel) is al zeer gering. Hoeveelheden toxine van 8 mgr. gaven slechts zeer geringe reacties bij de daarmee ingesloten caviae. Weliswaar was er tusschen de toxinen gevormd in de beide bouillons geen verschil in sterkte aantoonbaar, maar we durven daaruit toch geen gevolgtrekkingen maken. Gewoonlijk wordt de gist voor de bereiding van gistbouillon met water geëxtraheerd bij 100°. Daar wij bij het extraheeren van geen hoogere temperatuur dan 60° C. konden gebruik maken, is de mogelijkheid niet uitgesloten, dat de gistbouillon in deze proef veel te weinig extractierstoffen bevatte, om een goede toxineproductie van den diphtheriebacil mogelijk te maken.

Overzicht van de proeven omtrent de toxinebereiding.

In deze proeven heeft de reactie van Roman ons niet zelden teleurgesteld. Soms gaf zij juiste resultaten, maar dikwijls ook trad zij in het geheel niet op. In de eerste proeven was de reactie meestal duidelijk aanwezig; toen echter het daarvoor gebruikte serum te oud en door ander versch vervangen werd,

bleef zij meestal uit. Toch is het niet waarschijnlijk, dat hiertusschen een verband gezocht moet worden, daar de verschillende sera aan precies dezelfde handelingen werden onderworpen. Ook kan men niet zeker zeggen, dat de oorzaak van de wisselende uitkomsten der reactie gelegen is in het milieu waarin de toxinen zich bevinden, want in onze eerste proeven was de reactie positief zoowel in den onverhitten als in den verhitten bouillon, terwijl ze later in beide meestal afwezig was. Een verklaring van de afwijkende gedragingen van de reactie van Ramon kunnen wij niet geven, maar in elk geval zouden wij met het oog op de verkregen resultaten, de titratie van de toxinen, gevormd in onverhitten bouillon, met behulp van de uitvlokkingsreactie nog niet in de plaats durven stellen van die met behulp van de dierproef.

Uit de beschreven proefreeksen omtrent de toxineproductie van den diphtheriebacil in onverhitten en verhitten bouillon volgens Martin is dus gebleken:

1. dat de groei van den d. bacil in onverhitten bouillon sterker is dan in den verhitten;
2. dat de toxineproductie in den onverhitten bouillon sneller en krachtiger verloopt;
3. dat de toevoeging van gelatine aan dezen bouillon wisselende resultaten gaf;
4. dat de toxineproductie van den diphtheriebacil in verhitten bouillon toeneemt, wanneer deze met een onverhitte voorcultuur wordt geënt;
5. dat de sterke toxineproductie van den diphtheriebacil in onverhitten bouillon volgens Martin niet kan verklaard worden door den grooten voedingsrijkdom daarvan;
6. dat de waarde voor de diphtherietoxinevorming van den onverhitten bouillon sterk wordt verminderd, wanneer deze met physiologische keukenzoutoplossing wordt verdund;
7. dat 2 willekeurig gekozen diphtheriestammen, die reeds langen tijd op onverhitten voedingsbodem gekweekt en daarna in onverhitten bouillon geënt werden, een toxi-

ne produceerden, vrijwel even sterk als de P. W. No. 8 dit deed;

8. dat 5 willekeurig gekozen diphtheriestammen, die direkt vanaf verhitten bodem in onverhitten bouillon werden geënt, ook een bruikbaar toxine produceerden, maar toch minder sterk, dan wanneer groei op onverhitten voedingsbodem was voorafgegaan;
9. dat de diphtheriebacillen, die door groei in onverhitten voedingsbodem de eigenschap hadden verkregen om een krachtig toxine te produceeren, deze eigenschap een tijd lang behielden, wanneer ze weer in verhitte voedingsbodems werden gekweekt;
10. dat bouillon volgens Martin verhit tot 100° C. voor de toxineproductie minder geschikt is dan bouillon, die slechts tot 60° C. is verhit geweest;
11. dat de reactie van Ramon in deze proeven niet steeds geschikt bleek om met behulp van bekende sera de toxinen te titreeren.

HOOFDSTUK IV.

Virulentie van bacteriën gekweekt op onverhitte voedingsbodems.

Dat de samenstelling van den voedingsbodem van groot belang is voor de virulentie van de bacteriën, die er op gekweekt worden, is algemeen bekend. Men denke slechts, om een modern voorbeeld te noemen, aan de onderzoekingen van **Calmette en Guérin,** die tuberkelbacillen praktisch avirulent konden doen worden door ze in gal te kweeken.

Ook de aanwezigheid van vitaminen schijnt van invloed te zijn op de virulentie der bacteriën.

Hoewel aan de onmisbaarheid van vitaminen voor den groei van bacteriën reeds vele onderzoekingen zijn gewijd, is over den invloed van deze stoffen op de virulentie nog weinig bekend. Naar aanleiding van het waargenomen feit, dat dieren

lijdende aan een avitaminose (beri-beri duiven) spoediger aan een infectie ten gronde gaan dan normale dieren, heeft **Wurzinger** (21) eenige proeven genomen, om na te gaan of de virulentie va nbacteriën in vitamine B vrije voedingsbodems ook zou versterkt worden. Inderdaad bleek dit het geval te zijn. Kunstmatig verzwakte typhusbacillen werden spoedig weer geheel virulent, wanneer ze herhaaldelijk overgeënt werden in gepelde rijstextract. Deze virulentieverhooging bleef uit, wanneer de overenting geschiedde in gepelde rijstextract waaraan rijstzemelenextract was toegevoegd.

Dit zemelenextract gaat dus de virulentieverhooging van den typhusbacil tegen, maar of de oorzaak daarvan gezocht moet worden in de aanwezigheid van het vitamine B, is ook volgens **Wurzinger** zeer twijfelachtig.

Waar de onverhitte voedingsbodem op den groei en de toxineproductie van diphtheriebacillen een zoo duidelijken invloed bleek te hebben, konden wij den aandrang niet weerstaan ook eens na te gaan, hoe de virulentie van verschillende pathogene kiemen door dezen voedingsbodem wordt beinvloed, al konden deze onderzoekingen uiteraard niet diepgaand zijn.

Voor deze proeven hebben we allereerst den diphtheriebacil gebruikt en als tegenhanger van dezen exotoxine produceerenden bacil ook de door endotoxine werkende typhusbacillen, terwijl we bovendien nog enkele proeven hebben genomen met den bac. pneumoniae Friedländer en den tuberkelbacil.

Proeven met diphtheriebacillen.

Voor deze onderzoekingen maakten we gebruik van een diphtheriestam L, waarvan de virulentie voor caviae na groei op Löffler-serum bekend was.

Deze stam werd gedurende 16 dagen in 6 passages gekweekt op onverhitte bouillonagar en evenlang in evenveel passages op Löffler-serum. Vanaf den bouillonagar O werd dan geënt in een buisje met onverhitten runderbouillon en vanaf Löffler-serum in een buisje met verhitten bouillon.

Beide buisjes werden gedurende 48 uur in de broedstoof geplaatst, waarna van elk 0,25 c.c. subcutaan bij caviae werd ingespoten.

0,25 c.c. L O cavia 430 gr. Na 24 uur dood.

0,25 c.c. L V cavia 450 gr. Na 4 dagen dood.

Deze proef werd nog eens herhaald om te zien of het resultaat constant bleef.

0,2 c.c L O cavia 440 gr. Dood na 1 dag.

0,2 c.c. L V cavia 390 gr. Dood na 4 dagen.

We hebben daarna een buisje met onverhitten en een met verhitten bouillon geënt vanaf dezelfde Löffler-serumcultuur, zoodat we na konden gaan of het verschil in virulentie van de bouilloncultuuren reeds spoedig optrad, of dat daarvoor een langeren groei op de verschillende voedingsbodems noodzakelijk was. Van deze beide bouillonbuisjes werd na een broedtijd van 48 uur 0,1 c.c. subcutaan bij caviae ingespoten.

0,1 c.c. L O cavia 360 gr. Dood na 36 uur.

0,1 c.c. L V cavia 400 gr. Blijft leven.

Het resultaat der eerste proef werd dus bevestigd.

Dit verschil in virulentie voor caviae van een onverhitte en een verhitte diphtherie-bouilloncultuur, kan zijn verklaring vinden in het verschil van toxinehoeveelheden, die in de bouilloncultuuren reeds bij inspuiting aanwezig zijn, of in verschil van toxineproduceerend vermogen van de bacillen in het lichaam van het proefdier.

Om deze vraag te beantwoorden, werden naast de proeven met de bouilloncultuuren, ook proeven genomen met afspoelsels van diphtheriebacillen gegroeid op vaste voedingsbodems.

Daartoe hebben we diphtheriebacillen van den stam L afgespoeld van Löffler-serum en van onverhitte bouillonagar, waarop ze gedurende 30 dagen in 10 passages hadden gegroeid. De bacillen in deze emulsies werden dan gewasschen door ze 5 maal te centrifugeeren, telkens met nieuwe steriele physiologische zoutoplossing. Met behulp van fijn uitgetrokken en gegradueerde centrifugebuisjes, konden we gelijke

hoeveelheden bacillen vanaf Löffler-serum en onverhitte bouillonagar verkrijgen om bij caviae in te spuiten.

Deze gewasschen bacillen waren dus van de nog aanklevende exotoxinen bevrijd, zoodat een eventueel verschil in kwaadaardigheid voor caviae uitsluitend veroorzaakt werd door een verschil in toxineproductie in het cavialichaam. In onze eerste proef hadden we de hoeveelheden gewasschen bacillen te klein genomen, daar beide caviae bleven leven, hoewel degene, die met de bacillen vanaf bouillonagar O ingespoten was, een sterkere reactie vertoonde dan de andere, die met bacillen vanaf Löffler-serum was ingespoten.

Diphteriebacillen vanaf Löffler-serum bij cavia 500 gr.:
1' d +; 2' d +; 3' d +; 4' d +; 10^0 d —.

Diphtheriebacillen vanaf bouillonagar O bij cavia 480 gr.:
1' d +; 2' d + +; 3' d + +; 4' d + +; 10^0 d +.

We hebben deze proef daarna herhaald met grootere hoeveelheden bacillen.

Diphtheriebacillen vanaf Löffler-serum bij cavia 760 gr.
1' d + +; 2' d †.

Diphtheriebacillen vanaf bouillonagar O bij cavia 700 gr.
1' d + +; 2' d + +; 3' d †.

We zien uit deze proef, dat de bacillen vanaf Löffler-serum den cavia iets sneller dooden, dan die vanaf onverhitte bouillonagar, maar het verschil is zeer gering. De toxineproductie in het cavialichaam van diphtheriebacillen vanaf deze beide voedingsbodems is dus ongeveer gelijk.

Dezelfde proef hebben wij ook ingesteld met den diphtheriestam P. W. No. 8. Ook de bacillen van dezen stam werden van Löffler-serum en bouillonagar O afgespoeld, gewasschen en daarna in gelijke hoeveelheden ingespoten bij caviae. Diphtheriebacillen P. W. No. 8, vanaf Löffler-serum bij cavia 800 gr.: 1' d + +; 2' d + +; 3' d + + z. 4' d sterke necrose.

Diphtheriebacillen P. W. No. 8 vanaf bouillonagar O bij cavia 780 gr.: 1' d + +; 2' d + +; 3' d †.

Het verschil in virulentie van de diphtheriebacillen ge-

kweekt op verschillende voedingsbodems was in deze proef ook niet zeer sterk.

Hoewel de cavia ingespoten met bacillen vanaf bouillonagar O reeds den derden dag stierf, was de cavia ingespoten met bacillen vanaf Löffler-serum op dien dag ook zóó ziek, dat wij ieder oogenblik verwachtten, dat hij het lot van den andere zou deelen; slechts een sterke locale necrose redde hem van den dood.

Samenvattende kunnen we dus zeggen, dat de onverhitte en verhitte diphtheriebouillonculturen onderling een groot verschil vertoonen in kwaadaardigheid voor caviae, welk verschil wel hoofdzakelijk veroorzaakt wordt door een verschil in de toxine-hoeveelheden, die in de ingespoten bouillonculturen aanwezig zijn. De diphtheriebacillen zelf, vanaf bouillonagar O en vanaf Löffler-serum, vertoonen geen groote verschillen in virulentie voor caviae, d.w.z. in hun toxineproductie in het cavialichaam.

Proeven met typhusbacillen.

Voor deze proeven gebruikten we aanvankelijk een typhusstam E, die 1,5 jaar geleden uit het bloed van een typhuspatient was gekweekt en die daarna steeds op bouillonscheefagar had gegroeid. Dezen stam hebben we gedurende 60 dagen in 8 passages gekweekt op onverhitte en verhitte bouillonagar, alvorens de proeven omtrent de virulentie in te stellen.

Ook hier gebruikten we 48 uur oude bouillonculturen en wel zoo, dat vanaf bouillonagar O geënt werd in buisjes met runderbouillon O en vanaf bouillonagar V in buisjes met bouillon V. Na groei gedurende 48 uur bij 37° werd dan een zekere hoeveelheid van deze culturen intraperitoneaal bij caviae ingespoten. In alle gevallen konden uit het peritoneum en de milt van gestorven caviae weer typhusbacillen worden gekweekt.

In onze eerste proef hebben we 0,2 c.c. van de onverhitte en verhitte typhuscultuur ingespoten.

0,2 c.c. typhus V intrap. bij cavia 430 gr.
1' d —; 2' d —; 5' d — 410 gr.
0,2 c.c. typhus O intrap. bij cavia 400 gr.
1' d —; 2' d —; 5' d — 400 gr.

Wij hadden hier dus de ingespoten hoeveelheid te klein genomen en hebben de proef daarom met grootere hoeveelheden herhaald.

0,6 c.c. typhus O intrap. bij cavia 490 gr.
1' d —; 2' d —; 20' d —.
0,6 c.c. typhus V intrap. bij cavia 510 gr.
1' d †.

Hier zien we dus een zeer groot en eigenlijk niet verwacht verschil optreden. De cavia met een verhitte cultuur ingespoten was binnen 24 uur reeds dood, terwijl de andere met de onverhitte cultuur ingespoten, zelfs geen ziekteverschijnselen vertoonde.

De volgende proef werd met nog grootere hoeveelheden uitgevoerd, om na te gaan of een onverhitte typhuscultuur in groote hoeveelheden een cavia ook zou dooden. De stam E, voor deze proef gebruikt, had reeds 75 dagen lang in 13 passages op bouillonagar O en V gegroeid.

1 c.c. typhus O intrap. bij cavia 450 gr.
1' d —; 2' d — ; 3' d —; 14' d —.
1 c.c. typhus V intrap. bij cavia 410 gr.
1' d †.

Ook nu weer trad het merkwaardige verschijnsel op, dat in tegenstelling met den diphtheriebacil, de typhusbacil, gegroeid in onverhitten bouillon, bij den in verhitten bouillon gekweekten in virulentie sterk achter staat.

Contrôle op de reinheid der gebruikte culturen en op de eigenschappen van de bacteriën geschiedde steeds, zoowel in kweek- als serologische proeven.

We hebben dezelfde proeven herhaald met een anderen typhusstam K, die eveneens 1,5 jaar tevoren uit het bloed van een typhuspatient was rein gekweekt en daarna steeds op bouillonagar had gegroeid. Nadat wij dezen stam gedurende 20 dagen in 7 passages op onverhitte en verhitte bouillonagar

hadden gekweekt, hebben wij er dezelfde proeven mee ingesteld:

0,6 c.c. typhus O intrap. bij cavia 400 gr.
Na 2 dagen dood.
0,6 c.c. typhus V intrap. bij cavia 490 gr.
Na 18 uur dood.

We zien hier weer hetzelfde verschijnsel, n.l. dat een kweek op verhitten voedingsbodem veel kwaadaardiger voor een cavia is, dan een op onverhitten. Het verschil is echter niet zoo groot als bij den stam E. Waarschijnlijk vindt dat zijn verklaring in het feit, dat de stam E bij het begin van onze proeven reeds 2 maanden lang op bouillonagar O en V had gegroeid, terwijl de stam K pas 3 weken lang op O en V was gekweekt.

We hebben daarom opnieuw de proef ingesteld, toen de stam K gedurende 34 dagen in 11 passages op deze voedingsbodems had gegroeid.

0,3 c.c. typhus O intrap. bij cavia 280 gr.
1' d —; 2' d —; 3' d—; 8' d—.
0,3 c.c. typhus V intrap. bij cavia 350 gr.
Na 18 u. dood.

Ligt de oorzaak van dit telkens optredend verschil in toename van de virulentie van den typhusbacil, of is in den verhitten bouillon de autolyse van de bacillen sterker en daardoor het gehalte aan opgeloste endotoxinen grooter?

Om dit na te gaan hebben we een 24 u. oude typhuscultuur van verhitte en eveneens van onverhitte bouillonagar geëmulgeerd in 2 buisjes met 10 c.c. steriele physiologische zoutoplossing en van elk 1 c.c. intraperitoneaal bij caviae ingespoten.

1 c.c. typhusemulsie O intrap. bij cavia 720 gr.
1' d —; 2' d —; 3' d —; 9' d — 700 gr.
1 c.c. typhus emulsie V intrap. bij cavia 680 gr.
1' d —; 2' d —; 3' d —; 9' d — 620 gr.

De hoeveelheden ingespoten bacillen waren te klein genomen. Op den 9en dag na de inspuiting zijn de beide caviae

door middel van chloroform gedood, waarna noch uit het peritoneum, noch uit milt en galblaas typhusbacillen konden worden gekweekt.

We hebben deze proef nog eens herhaald met grootere hoeveelheden van den stam K, die 65 dagen in 17 passages op O en V bouillonagar had gegroeid en met den stam F., die uit de ontlasting van een typhusbacillendrager was gekweekt en daarna 16 dagen in 8 passages op O en V had gegroeid.

Daarvoor werden 24 uur oude culturen van deze stammen met 10 c.c. zoutsolutie afgespoeld en van deze bacillen-emulsies bepaalde hoeveelheden intraperitoneaal bij caviae ingespoten.

2 c.c. typhusbacillenemulsie K, vanaf bouillonagar V intrap. bij cavia 280 gr.
Na 24 u. dood.

2 c.c. typhusbacillenemulsie K, vanaf bouillonagar O intrap. bij cavia 280 gr.
Na 24 u. dood.

1 c.c. typhusbacillenemulsie F, vanaf bouillonagar V intrap. bij cavia 680 gr.
Na 24 u. dood.

1 c.c. typhusbacillenemulsie F, vanaf bouillonagar O intrap. bij cavia 530 gr.
Na 24 u. dood.

We zien dus, dat de typhusbacillen vanaf vaste onverhitte en verhitte bodems onderling geen sterke verschillen vertoonen in virulentie voor caviae en we kunnen dus hieruit besluiten, dat de groote verschillen van onverhitte en verhitte typhusbouillonculturen in kwaadaardigheid voor caviae niet worden veroorzaakt door virulentieverschillen van de bacillen, maar door verschil in de aanwezige hoeveelheden opgeloste endotoxinen, die in de bouillonculturen aanwezig zijn voordat deze worden ingespoten. Het verschil in kwaadaardigheid zou dus veroorzaakt kunnen worden, doordat in de verhitte culturen het endotoxine reeds vrij aanwezig is en dus direkt zijn giftige werking kan ontvouwen, terwijl in de on-

verhitte culturen het endotoxine nog in de levende typhusbacillen aanwezig is en pas het proefdier kan vergiftigen, wanneer dit de bacillen gedood en opgelost heeft.

Uit deze proeven met diphtherie- en typhusbacillen blijkt dus, dat in 48 uur oude onverhitte diphtherieculturen veel meer exotoxinen aanwezig zijn dan in de verhitte en dat in tegenstelling hiermede in 48 u. oude typhusculturen juist in de verhitte, veel meer endotoxinen aanwezig zijn dan in de onverhitte.

In een verhitte bouilloncultuur schijnen dus veel meer typhusbacillen opgelost te zijn dan in de onverhitte, daar de endotoxinen toch afkomstig zijn van doode en opgeloste typhusbacillen.

We kunnen dus zeggen, dat in de verhitte culturen de typhusbacillen sneller sterven dan in de onverhitte, of wel dat ze in de onverhitte langer leven dan in de verhitte.

Op deze wijze zou men ook de uitkomsten van de proeven met diphtheriebacillen kunnen verklaren. Immers, wanneer de diphtheriebacillen in onverhitte bouillonculturen langer leven dan in verhitte, kunnen zij ook langer exotoxine produceeren met het gevolg, dat na 48 uur in den onverhitten bouillon een veel sterker toxine aanwezig is, dan in den verhitten.

De uitkomsten van de proeven met typhusbacillen zoowel als die met diphtheriebacillen kunnen dus misschien verklaard worden door het langere leven van deze bacillen in den onverhitten bouillon.

Proeven met bac. pneumoniae Friedländer.

Naast de diphtherie- en typhusbacillen hebben we nog een derde bacteriesoort genomen, om het verschil in virulentie na te gaan na groei op verhitte en onverhitte bouillonscheefagar, en wel de bac. pneum. Friedländer.

Nadat deze bacil gedurende 6 weken in 13 passages gegroeid had op bouillonscheefagar O en V, werd van elk één

oese afgespoeld in 10 c.c. physiol. keukenzoutoplossing en daarvan 1 c.c. intraperitoneaal bij witte muizen ingespoten.

$^1/_{10}$ oese Friedländer V bij muis 1.
Na 18 u. dood.

$^1/_{10}$ oese Friedländer O bij muis 2.
Na 2 dagen dood.

De bacil vanaf onverhitte bouillonagar schijnt minder virulent te zijn dan die van verhitte. We hebben deze proef nog eenige malen herhaald, om te zien of het resultaat constant bleef.

Daarbij spoten we kleinere hoeveelheden in, in de hoop dat één muis zou blijven leven, terwijl de andere zou sterven, zoodat we het virulentieverschil der bacillen niet in den ziekteduur, maar in leven en dood van de proefdieren zouden kunnen uitdrukken.

$^1/_{20}$ oese Friedländer V intrap. bij muis 1.
Na 18 u. dood.

$^1/_{20}$ oese Friedländer O intrap. bij muis 2.
Na 2 dagen dood.

$^1/_{100}$ oese Friedländer V intrap. bij muis 1.
Na 1 dag dood.

$^1/_{100}$ oese Friedländer O intrap. bij muis 2.
Na 2 dagen dood.

$^1/_{2000}$ oese Friedländer V intrap. bij muis 1.
Na 1 dag dood.

$^1/_{2000}$ oese Friedländer O intrap. bij muis 2.
Na 4 dagen dood.

Daar het verschil in virulentie telkens constant bleek te zijn, hebben we verder geen muizen aan deze proeven opgeofferd. Telkens toch bleek, dat een muis ingespoten met bacillen vanaf verhitte bouillonagar eerder stierf, dan een, ingespoten met bacillen van onverhitte bouillonagar.

Proeven met tuberkelbacillen.

Van een tuberculosestam, die 22 dagen in onverhitten en verhitten bouillon waaraan 5% glycerine was toegevoegd had gegroeid, hebben we van beide een gedeelte tusschen filtreer-

papier gedroogd en daarna 10 mgr. afgewogen. Deze hoeveelheden tbc.-bacillen werden dan eenigen tijd geschud met droge steriele kralen, waarna onder voortdurend schudden langzamerhand physiol. zoutoplossing werd toegevoegd tot hoeveelheden van 10 c.c.

Van elk dezer emulsies hebben we toen 1 c.c., dus 1 mgr. bacillen, subcutaan en intraperitoneaal bij caviae ingespoten.

1 mgr. tbc. O subcutaan bij cavia 250 gr.
Na 29 dagen dood.

1 mgr. tbc. V subcutaan bij cavia 250 gr.
Na 60 dagen gedood. Lijkopening positief.

1 mgr. tbc. O intraperitoneaal bij cavia 250 gr.
Na 28 dagen dood.

1 mgr. tbc. V intraperitoneaal bij cavia 250 gr.
Na 37 dagen dood.

Hoewel deze proef eenige malen herhaald zou moeten worden om met zekerheid eenige gevolgtrekkingen te kunnen maken, schijnen toch de tbc.-bacillen in onverhitten, meer virulent te zijn dan die in verhitten bouillon.

Om de resultaten van deze proeven met verschillende bacteriesoorten te beoordeelen, moeten we scheiding maken tusschen de proeven met bacillen vanaf bouillonagar en die met bacillen in bouillonculturen. De bacillen vanaf bouillonagar bij proefdieren ingespoten ontvouwen hun kwaadaardige werking pas in het cavialichaam, terwijl de bouillonculturen hun kwaadaardigheid te danken hebben, niet alleen aan de virulentie van de bacteriën in het lichaam van het proefdier, maar meer aan de stofwisselingsproducten, die reeds in den bouillon aanwezig zijn voor het oogenblik van inspuiting.

De diphtherie- en typhusbacillen vertoonen geen duidelijk verschil in virulentie voor caviae, wanneer ze gekweekt worden op onverhitte en verhitte bouillonagar, terwijl de bac. pneumoniae Friedländer na groei op onverhitte bouillonagar, een geringere virulentie voor muizen heeft dan na groei op verhitte bouillonagar. Ook de kwaadaardigheid van de tuberkelbacillen wordt veroorzaakt door de werking van de

bacillen zelf in het cavialichaam, hoewel ze in bouillon waren gekweekt. De eventueel aanwezige stofwisselingsproducten van deze bacillen in den bouillon werden immers niet mee ingespoten. Het bleek, dat waarschijnlijk de tuberkelbacillen uit onverhitten bouillon voor caviae virulenter waren, dan die uit verhitten bouillon.

Wat betreft de kwaadaardigheid van bouillonculturen van diphtherie en typhusbacillen, zoo bleek dat een onverhitte diphtheriecultuur veel kwaadaardiger was voor caviae dan een verhitte, terwijl de proeven met typhusbacillenculturen juist een tegenover gesteld resultaat gaven.

Misschien is de oorzaak daarvan gelegen in een langeren levensduur van de bacillen in den onverhitten bouillon, waardoor de diphtheriebacillen daarin dan meer exotoxinen en de typhusbacillen minder endotoxinen zouden doen ontstaan.

SLOTSOM

Wij hebben in onze proeven gebruik gemaakt van verschillende bouillons, welke niet werden gesteriliseerd met behulp van hooge temperaturen, maar door middel van filtratie door de zgn. „Entkeimungsfilter". Zoodoende zouden zoowel de eiwitten, als de vitaminen, de schadelijke werking der hooge temperaturen, meestal 110 à 120 gr. kunnen ontgaan.

Hoewel we oorspronkelijk dachten de voedingsbodems bij kamertemperatuur te bereiden, bleek dit niet mogelijk, daar in een dergelijken bouillon na plaatsing in de stoof bij 37° een groot neerslag ontstond. Om dit neerslag te kunnen voorkomen, waren we genoodzaakt den bouillon een verhitting tot 55 à 60° C. te laten ondergaan.

Door vermenging van dezen onverhitten bouillon met wateragar, gesteriliseerd bij 110 à 120° C., konden we bouillonscheefagar bereiden, waarvan de voedende bestanddeelen voor de bacteriën niet hooger dan tot 60° waren verhit.

Op deze scheefagar hebben we verschillende bacteriën gekweekt en zagen toen dat de diphtheriebacil op de onverhitte, veel sterker groeide dan op de verhitte (zie foto 3 en 4).

Deze sterke groei op onverhitten bodem wordt niet door den diphtheriebacil behouden, maar gaat direkt teloor, bij daaropvolgende enting op verhitte bouillonagar.

Wanneer we de bouillonagar tot verschillende temperaturen verhitten, bleek dat de groei van den diphtheriebacil geleidelijk minder werd, naarmate de voedingsbodem aan een hoogere temperatuur was blootgesteld geweest. (Zie tabel II).

Verder bleek, dat bij toevoeging van onverhitten bouillon aan verhitte bouillonagar, belangrijke hoeveelheden van den eersten noodig waren om den sterken groei van den diphtheriebacil tot stand te brengen en dat deze groei geleidelijk sterker werd, naarmate meer onverhitten bouillon werd toegevoegd (zie tabel III). *Hieruit volgt, dat de groeibevorderende invloed van onverhitte voedingsbodems wel minder van het*

gehalte aan vitaminen, dan aan dat van onveranderde eiwitten afhankelijk is.

Bij de herhaalde bereiding van buisjes met onverhitten bouillon bleek, dat de diphtheriebacil nu eens wel, dan weer niet of in geringe mate, aan de oppervlakte van den bouillon zich ontwikkelde. De oorzaak van dit verschijnsel hebben wij, noch door veranderingen aan te brengen in de waterstofionenconcentratie, noch door vergelijking van de oppervlaktespanning en van de bouillons kunnen opsporen.

Naast den groei, hebben we ook de toxineproductie van den diphtheriebacil nagegaan in onverhitten bouillon. Het bleek uit onze proeven dat in dezen bouillon, niet alleen een veel sterker toxine door diphtheriebacillen werd geproduceerd dan in den verhitten, maar tevens, dat de vorming daarvan aanmerkelijk sneller in bouillon O verliep.

Het vermogen om een sterk toxine te produceeren werd door den diphtheriebacil nog eenigen tijd behouden, wanneer deze, na groei in onverhitten bouillon, weer in verhitten werd gekweekt.

Om na te gaan of de goede invloed van den onverhitten bouillon misschien veroorzaakt zou kunnen worden door den grooten luchtrijkdom daarvan, hebben we verhitten bouillon met lucht verzadigd en de toxinevorming daarin nagegaan. Het bleek echter, dat deze verzadiging met lucht van den bouillon geen invloed had op de toxinevorming.

Hoewel men, volgens **Walbum** en volgens onderzoekingen in het Rijks Serologisch Instituut verricht, honderden diphtheriestammen op hun toxine produceerend vermogen in verhitten bouillon kan nagaan, zonder er één te vinden die een toxine vormt, dat aan de tegenwoordig gestelde eischen kan voldoen, hebben wij van 5 willekeurig gekozen diphtheriestammen een behoorlijk toxine kunnen verkrijgen, door ze in onverhitten bouillon te enten.

Van 2 andere willekeurig gekozen diphtheriestammen, die we vóór de enting in onverhitten bouillon eenigen tijd op onverhitte bouillonagar hadden gekweekt, konden we een toxine verkrijgen, even sterk als dat van den Amerikaanschen stam Park Wililams No. 8.

Oorspronkelijk werd de toxineproductie van diphtheriebacillen in bouillon, bereid met behulp van een temperatuur tot 60°, vergeleken met die in bouillon, welke een verhitting tot 110 à 120° C. had ondergaan. We hebben echter ook nagegaan hoe de toxineproductie van den diphtheriebacil is in bouillon, welke tot 100° C. was verhit. Het bleek, dat het toxine in dezen bouillon gevormd, in sterkte nog aanmerkelijk achter stond bij de toxine gevormd in bouillon verhit tot 60° C.

Den gunstigen invloed van gelatinetoevoeging aan bouillon volgens Martin voor de toxineproductie, door **Godoy** aanbevolen, konden wij niet steeds aantoonen.

De uitvlokkingsreactie van Ramon, tusschen een bepaalde hoeveelheid toxine en een juist neutraliseerende hoeveelheid antitoxine, is in onze proeven niet zelden negatief gebleven. We meenen aan deze reactie voor toxinen bereid in onverhitten bouillon niet te groote waarde te moeten toekennen.

Een verklaring van het slechte resultaat met de reactie van Ramon, kunnen wij niet geven, het steunt de opvatting dat deze reactie niet uitsluitend tusschen toxine en antitoxine verloopt.

Naast de proeven omtrent de toxineproductie van den diphtheriebacil, hebben we ook de virulentie nagegaan van enkele bacteriën, gekweekt op onverhitten voedingsbodem.

Wanneer we diphtheriebacillen kweekten op onverhitte bouillon*agar* bleek, dat deze bacillen voor caviae ongeveer even virulent waren, dan na groei op Löffler-serum en dat ook in de virulentie van typhusbacillen, gekweekt op bouillonagar O en V, voor caviae geen verschil aantoonbaar was.

Verder bleek, dat de bac. pneumoniae Friedländer, gekweekt op onverhitte bouillon*agar*, voor muizen minder virulent was dan na even langen groei op verhitten bodem, terwijl de tuberkelbacillen na groei op onverhitten bodem voor caviae juist meer virulent waren dan na groei in verhitten bouillon.

De proeven met *bouilloncultures* gaven geheel andere resultaten.

Een 48 uur oude diphtheriebouilloncultuur bleek veel kwaadaardiger voor een cavia te zijn dan een evenoude verhitte; terwijl bij typhusculturen het verschil juist andersom aanwezig was.

Wanneer we bepaalde hoeveelheden verhitte typhusbouilloncultuur intraperitoneaal bij een cavia inspoten, bezweek het dier meestal binnen 24 uur, terwijl een even oude onverhitte cultuur bij een cavia ingespoten zelfs geen ziekteverschijnselen verwekte.

Deze verschillen in kwaadaardigheid van diphtherie- en typhusculturen worden veroorzaakt door de stofwisselingsproducten van de bacillen, die in den bouillon aanwezig zijn (exo- en endotoxinen) en niet door verschil in virulentie van de bacillen zelf in het cavialichaam.

Wij hebben deze resultaten gepoogd te verklaren met een langeren levensduur, die den bacillen in onverhitten bouillon zou ten deel vallen; of deze verklaring inderdaad recht van bestaan heeft, zal nog door verdere proeven moeten worden uitgemaakt.

R. 8480

LITERATUURLIJST

1. Madsen. Zeitschr. f. Hyg. u. Infectionskr. Bd. 26. 1897.
2. Martin. Annales de l'Institut Pasteur 1898.
3. Spronck. Annales de l'Institut Pasteur. 1895.
4. Kollath. Centralbl. f. Bakt. Parasitenk. u. Infektionskr. Abt. 1. Orig. Bd. 93. 1924.
5. Knorr. Ergebnisse der Hygiene, Bact. Immunitätsforschung und experimentellen Therapie. Bd. VII. 1925.
6. Thjötta. The journal of exp. med. Vol. 33. No. 6. 1921.
7. Thjötta und Avery. The journal of exp. med. Bd. 34. '21.
8. Zupnik. Berl. Klin. Wochenschr. No. 50. 1897.
9. Neisser und Gins. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen Kolle en v. Wassermann. Bd. V.
10. Publicatie van de Medical Research Council Londen 1923. pag. 98.
11. Roux et Yersin. Annales de l'Institut Pasteur No. 12. 1888 Idem No. 6. 1889.
12. Park and Williams. The journal of exp. med. 1896.
13. Walbum. Communication de l'institut sérotherapique de l'état Danois. 1924.
14. Ramon. Annales de l'Institut Pasteur. No. 12. 1923. Idem No. 1. 1924.
15. Nicolle, Césari et Debains. Annales de l'Inst. Pasteur. No. 9. 1920.
16. Kraus, Löwenstein und Baecher. Wiener Klin. Wochenschr. 1924.
17. Hoen, Zipp und Tschertkow. Zeitschr. f. Immunitätsforschung. u. experimentellen Therapie. Bd. 45. Heft 5. '25.
18. Scholz. Centralbl. f. Bakt. Parasitenk. u. Iufektionskr. Abt I. Bd. 91. 1924.
19. Godoy. Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie. No. 29. 1926.
20. Spronck. Annales de l'Inst. Pasteur. 1898. pag. 701.
21. Wurzinger. Archiv. f. Hygiene. Bd. 97. Heft 5—8.
22. Löffler. Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte. Bd. II. 1884.

STELLINGEN

I.

De onmisbaarheid van bloedbestanddeelen voor den groei van haemophiele bacteriën berust op de aanwezigheid van V- of X-stoffen, of van beide tesamen.

II.

Voor de prophylaxe van mazelen is de behandeling met reconvalescentenserum (Degkwitz) van groote waarde.

III.

De toediening van nitroglycerine bij angina pectoris behoort perlinguaal te geschieden.

IV.

Bij een röntgenulcus is de behandeling met „haute fréquence" aan te bevelen.

V.

Het belang van den patiënt eischt, dat het bepalen van de refractie van een oog niet wordt toevertrouwd of overgelaten aan iemand, die niet bevoegd is tot uitoefening der geneeskunst.

VI.

Aan de vroedvrouwen behoort te worden toegestaan het afleggen van een verklaring over den vermoedelijken duur der zwangerschap, respectievelijk over den vermoedelijken datum der bevalling, in den zin van Art. XIII van het voorontwerp Slotemaker de Bruïne tot wijziging der ziektewet.

VII.

Het verdient aanbeveling, dat de consultatiebureaux voor zuigelingen zich ook belasten met de kleuterzorg.

VIII.

Alvorens de Nederlandsch-Indische regeering de leprabestrijding met succes zal kunnen invoeren, dient zij over te gaan tot het oprichten van een instituut, waar de lepra-epidemiologie nader kan worden bestudeerd.

IX.

De medische journalist vermijde in de leekenpers ongemotiveerde verwachtingen te wekken en wage zich niet aan beschouwingen op specieel diagnostisch en therapeutisch gebied.