

BIJDRAGE TOT DE
KENNIS DER TYPEN VAN HET
CORYNEBACTERIUM
DIPHThERIAE

B. W. L. SIEMENS

BIJDRAGE TOT DE KENNIS DER TYPEN VAN HET
CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIÆ

BIJDRAGE
TOT DE KENNIS DER TYPEN VAN HET
CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIÆ

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN
DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN
DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM, OP GEZAG VAN
DEN RECTOR-MAGNIFICUS Mr. Dr. H. FRIJDA,
HOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER ECONOMISCHE
WETENSCHAPPEN, IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN
IN DE AULA DER UNIVERSITEIT OP DINSDAG
21 JUNI 1938, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

BERNARD WILHELM LEOPOLD SIEMENS
GEBOREN TE AMSTERDAM

1844
1845
1846
1847
1848
1849
1850
1851
1852
1853
1854
1855
1856
1857
1858
1859
1860
1861
1862
1863
1864
1865
1866
1867
1868
1869
1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900

1901
1902
1903
1904
1905
1906
1907
1908
1909
1910
1911
1912
1913
1914
1915
1916
1917
1918
1919
1920
1921
1922
1923
1924
1925
1926
1927
1928
1929
1930
1931
1932
1933
1934
1935
1936
1937
1938
1939
1940
1941
1942
1943
1944
1945
1946
1947
1948
1949
1950
1951
1952
1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978
1979
1980
1981
1982
1983
1984
1985
1986
1987
1988
1989
1990
1991
1992
1993
1994
1995
1996
1997
1998
1999
2000

1901
1902
1903
1904
1905
1906
1907
1908
1909
1910
1911
1912
1913
1914
1915
1916
1917
1918
1919
1920
1921
1922
1923
1924
1925
1926
1927
1928
1929
1930
1931
1932
1933
1934
1935
1936
1937
1938
1939
1940
1941
1942
1943
1944
1945
1946
1947
1948
1949
1950
1951
1952
1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978
1979
1980
1981
1982
1983
1984
1985
1986
1987
1988
1989
1990
1991
1992
1993
1994
1995
1996
1997
1998
1999
2000

1844
1845
1846
1847
1848
1849
1850
1851
1852
1853
1854
1855
1856
1857
1858
1859
1860
1861
1862
1863
1864
1865
1866
1867
1868
1869
1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900

1901
1902
1903
1904
1905
1906
1907
1908
1909
1910
1911
1912
1913
1914
1915
1916
1917
1918
1919
1920
1921
1922
1923
1924
1925
1926
1927
1928
1929
1930
1931
1932
1933
1934
1935
1936
1937
1938
1939
1940
1941
1942
1943
1944
1945
1946
1947
1948
1949
1950
1951
1952
1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978
1979
1980
1981
1982
1983
1984
1985
1986
1987
1988
1989
1990
1991
1992
1993
1994
1995
1996
1997
1998
1999
2000

Aan mijn Ouders.
Aan mijn Vrouw.

Het verschijnen van dit proefschrift biedt mij de gelegenheid, U, Oud-Hoogleraren, Hoogleraren en Lectoren der Geneeskundige en Natuur-philosophische faculteiten te Amsterdam te danken voor het van U genoten onderwijs.

In het bijzonder U, Hooggeleerde VAN LOGHEM, Hooggeachte Promotor, dank ik voor de geboden gelegenheid dit proefschrift onder Uw leiding te bewerken. Uw grote belangstelling voor mijn werk, Uw vele waardevolle raadgevingen, hebben mij zeer aan U verplicht. De gastvrijheid, die ik op Uw laboratorium mocht ondervinden, zal bij mij in dankbare herinnering blijven.

Hooggeleerde BENJAMINS, een voorrecht acht ik het Uw assistent te kunnen zijn. De gelegenheid, die Gij mij gegeven hebt, naast het klinische werk, op Uw laboratorium de bacteriologie te kunnen blijven beoefenen, stemt mij tot grote erkentelijkheid.

To you, Professor McLEOD I am very indebted indeed, for your generous assistance in sending strains.

Ook U, Hooggeleerde KAPSENBERG, dank ik voor de gezonden stammen. Gaarne benut ik deze gelegenheid U in het bijzonder te danken voor de vriendelijke wijze waarop Gij mij thans, gedurende mijn tijd te Groningen, steeds met Uw raad terzijde staat.

Zeergeleerde Mejuffrouw RUYS, de bijzondere medewerking en opbouwende critiek, die ik van U bij mijn werk mocht ondervinden, vervullen mij met gevoelens van grote dankbaarheid.

Zeergeleerde DEN DOOREN DE JONG, ook U dank ik voor de bereidwilligheid waarmee Gij mij het Rotterdamse materiaal ter beschikking stelde.

U, Geachte Mejuffrouw BENJAMINS, dank ik voor de op zo nauwkeurige wijze verleende hulp, waarmee Gij in niet geringe mate mijn werk hebt verlicht.

Rest mij nog een woord van dank aan U, REDEKER, QUELLE, VAN NOORD, VAN DEN BERG en PITS voor de vele malen, dat Gij allen mij van dienst zijt geweest.

INHOUD.

	Blz.
Hoofdstuk I. INLEIDING	11
Hoofdstuk II. DE KENMERKENDE EIGENSCHAPPEN DER TYPEN <i>GRAVIS</i> , <i>MITIS</i> EN <i>INTERMEDIUS</i> VAN <i>CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE</i>	16
§ 1. <i>Inleidende opmerkingen</i>	16
<i>a. De kweekgrond van McLEOD</i>	16
<i>b. De illuminator van MURRAY</i>	20
§ 2. <i>Het verschil in kolonievorm tussen gravis, mitis en inter-</i> <i>medius op de kweekgrond van McLeod</i>	23
§ 3. <i>De celvorm der typen van de diphtheriebacil</i>	23
<i>a. Het vervaardigen der preparaten</i>	24
<i>b. De morphologie der typen</i>	26
§ 4. <i>De omzetting der koolhydraten, glucose, saccharose, maltose,</i> <i>stijfsel, glycogeen, dextrine</i>	27
§ 5. <i>Vershil in haemolytisch vermogen</i>	31
§ 6. <i>De groeiwijze in bouillon</i>	35
§ 7. <i>De verandering in de waterstof-ionenconcentratie van</i> <i>bouillon als kweekgrond der typen</i>	36
§ 8. <i>De pathogeniteit voor het proefdier</i>	39
<i>a. De techniek van het onderzoek</i>	41
<i>b. Verschillen in pathogeniteit</i>	44
Hoofdstuk III. NEDERLANDSE STAMMEN NAAR HUN TYPE BEPAALD	46
§ 1. <i>Overzicht van het materiaal</i>	46
§ 2. <i>Superisolatie</i>	46
§ 3. <i>De typen op Liebig-bouillon-agar</i>	50
§ 4. <i>Vergelijking van de kweekgronden van McLeod en</i> <i>Gundel</i>	52
§ 5. <i>Engelse stammen</i>	53
§ 6. <i>Amsterdamse stammen</i>	53
§ 7. <i>Rotterdamse stammen</i>	55
§ 8. <i>Groningse stammen</i>	55
§ 9. <i>De biochemische reacties der stammen</i>	56

Hoofdstuk IV. DE TYPEN VAN DE DIPHTHERIEBACIL UIT GENETISCH OOGPUNT BESCHOUWD	57
§ 1. <i>Inleidende Beschouwingen</i>	57
§ 2. <i>Schijnbare veranderlijkheid der typen</i>	61
§ 3. <i>Experimenten over veranderlijkheid met negatieve uitslag,</i> <i>in de literatuur vermeld</i>	64
§ 4. <i>Experimenten over veranderlijkheid met positieve uitslag,</i> <i>in de literatuur vermeld</i>	65
§ 5. <i>Eigen onderzoek over experimentele veranderlijkheid der</i> <i>typen</i>	69
<i>a. Veranderlijkheid bij herhaalde overentingen in</i> <i>bouillon</i>	69
<i>b. De veranderlijkheid van de CHRISTISON-varianten</i>	71
<i>c. Veranderlijkheid verkregen door bouilloncultures in</i> <i>een collodiumzakje in de buikholte van een cavia te</i> <i>brengeu</i>	72
<i>d. Veranderlijkheid bij het voortkweken op vaste voe-</i> <i>dingsbodems</i>	74
§ 6. <i>Atypische stammen</i>	75
§ 7. <i>Onderverdeling der typen</i>	78
<i>a. Serologische onderverdeling</i>	78
<i>b. Onderverdeling op grond van kleine verschillen in</i> <i>culturele eigenschappen</i>	80
Hoofdstuk V. ENKELE OPMERKINGEN OVER DE BE- TEKENIS VAN DE TYPEN VAN DE DIPHTHERIE- BACIL VOOR DE EPIDEMIOLOGIE EN DE CLINIEK	82
§ 1. <i>Epidemiologische waarnemingen</i>	82
<i>a. Letaliteit, mortaliteit en morbiditeit</i>	82
<i>b. Het ontstaan van kleine epidemieën</i>	88
<i>c. Vermogen der typen bij personen met een negatieve</i> <i>reactie van SCHICK diphtherie te verwekken</i>	89
<i>d. Verschillen der waarnemingen te Amsterdam en</i> <i>Rotterdam</i>	89

§ 2. Clinische waarnemingen	91
a. Het verband tusschen de typen en de ernst van de ziekte	91
b. De typen en de complicaties	93
c. De typen en de serumtherapie	94
d. Menginfecties en de betekenis hiervan voor de ver- pleging in ziekenhuizen	95
Hoofdstuk VI. SAMENVATTING en SLOTBESCHOUWING; 98	
SUMMARY	103
GERAADPLEEGDE LITERATUUR	108

HOOFDSTUK I.

INLEIDING.

Sinds lang hebben onderzoekers zich bezig gehouden met de vraag of van de diphtheriebacil verschillende typen nader kunnen worden onderscheiden.

Zo hebben ZUPNIK (1897), HAMMERSCHMIDT (1924) en PARKER (1928) reeds verschillen in de kolonievorm van sommige diphtheriestammen gezien. Anderen, zoals WESTBROOK WILSON Mc. DANIEL en ADAIR (1898), en WESTBROOK, WILSON, en Mc. DANIEL (1899—1900) trachtten op grond van morphologische verschillen der cellen tot een indeling van de soort *Corynebacterium diphtheriae* te geraken. Zeer velen, waaronder VAN RIEMSDIJK (1915), DURAND (1918), EAGLETON en BAXTER (1923) en onlangs nog NISHIMOTO (1936) kwamen tot een serologische groepering. Aan geen van deze pogingen is door de bacteriologen tenslotte veel betekenis gehecht.

In 1931, kort nadat zich in heel Europa weer ernstige epidemieën hadden voor gedaan en de aandacht van de onderzoekers aldus op de diphtheriebacil was gevestigd, publiceerden ANDERSON, HAPPOLD, McLEOD en THOMSON een onderzoek door hen te Leeds verricht, waaruit bleek, dat een aantal diphtheriestammen te verdelen was in drie typen, die door een bepaalde kolonievorm en verschillende biochemische eigenschappen gekenmerkt bleken.

Wellicht had men aan dit onderzoek niet die aandacht besteed, indien niet door ANDERSON e.a. een verband tussen de door hen gevonden typen en het klinische beloop van de diphtherie gelegd was.

In overeenstemming met de ernst van de infecties, die de door hen gevonden typen bij de mens veroorzaakten, gaven zij aan deze de suggestieve namen *gravis*, *mitis* en *intermedius*.

In de aanvang stond men tegenover deze ontdekking tamelijk sceptisch. Later kwam er echter van alle delen van de wereld een stroom van bevestigingen.

Wanneer men uit de in 1923 verschenen monographie van de Medical Research Council „*Diphtheria*”, door ANDREWES, BULLOCH, DOUGLAS, DREYER, FILDES, LEDINGHAM, en WOLF een indruk krijgt van het zeer groote aantal onderzoekingen, dat aan dit ene micro-

organisme is gewijd, dan wekt het verbazing, dat bijna een halve eeuw, nadat deze bacterie voor het eerst door LOEFFLER was gekweekt, de mogelijkheid van een indeling in typen werd erkend.

Het is de bedoeling van dit proefschrift een korte samenvatting te geven van de belangrijkste feiten, die door de ontdekking van ANDERSON e.a., aan het licht zijn gekomen en de uitslag van een eigen onderzoek mede te delen.

Het eerste deel van dit onderzoek bestond uit het nagaan van de verschillende eigenschappen van de drie typen. Hierbij werd tevens de waarde van de door MURRAY (1935) beschreven „illuminator” onderzocht en het type van een aantal Nederlandse stammen bepaald.

Bij het tweede deel van het onderzoek werd de veranderlijkheid van de drie typen onderzocht, vooral in verband met de vraag, of werkelijk een verdeling in „typen” in de zin van „rassen” geoorloofd is.

Tenslotte heb ik de betekenis van de onderverdeling in typen voor de kliniek en de epidemiologie, ook aan de hand van enige eigen waarnemingen, in het licht trachten te stellen.

De bestudering van de groep van de „diphtheroïden” en het zogenaamde unitaristische en dualistische standpunt lag buiten het kader van dit proefschrift.

Alvorens tot mijn onderwerp over te gaan lijkt het mij van nut de belangrijkste eigenschappen, waardoor de soort *Corynebacterium diphtheriae* gekenmerkt is, in het kort te overzien.

Wat de vorm betreft, stelt men vast, dat de cultuur bestaat uit rechte of licht gebogen, soms knotsvormige, GRAM-positieve, onbewegelijke, niet zuurvaste staafjes, die een sterke polymorphie vertonen en veelal als palissaden of de vingers van een handschoen gerangschikt zijn.

Volgens NEISSER gekleurd kunnen zij de poolkorrels van BABES en ERNST vertonen.

De vorm alleen is echter steeds onvoldoende om met zekerheid een diphtheriebacil van de groep der „diphtheroïden” te differentiëren, iets waar nog maar al te vaak tegen wordt gezondigd. In verband hiermee kan een uitspraak uit de monographie van de MEDICAL RESEARCH COUNCIL worden geciteerd:

„..... we have repeatedly insisted that the recognition of *C. diphtheriae* by morphological characters alone is no more than a presumption, likely indeed, to be correct in cases of acute sore throat, but under other circumstances beset with fallacies. It is the failure to recognize this fundamental fact, and the consequent neglect to

carry out suitable tests for verification, that are responsible for the unsatisfactory state of laboratory diagnosis in diphtheria and for the danger that it may fall into disrepute. It is our duty here to emphasize not only the importance of verification, but its absolute necessity in many groups of cases, if the laboratory report is to have any serious value.”

Ten aanzien van de *biochemische eigenschappen* valt het volgende op te merken:

De diphtheriebacil vormt zuur en geen gas uit glucose. Saccharose wordt niet omgezet.¹⁾ Vroeger werd veelal alleen genoegen genomen met een omzetting van glucose, waardoor de diphtheriebacil van de pseudo-diphtheriebacil van HOFMANN is te onderscheiden. In het bijzonder van Engelse zijde, en in ons land ook door VEDDER (1933) en DE WOLFF (1927), is de aandacht er op gevestigd, dat het van groot belang is ook na te gaan, dat saccharose *niet* wordt omgezet. Deze waarneming is nodig om de diphtheriebacil te differentiëren van het *Corynebacterium xerosis*, die, wat de celvorm betreft, de typische diphtherie-eigenschappen kan bezitten. *C. xerosis* zet echter zowel glucose als saccharose om.

Ook bij mijn eigen onderzoek ben ik enige malen op *C. xerosis* gestuit. Het viel hierbij op, dat deze bacil een kolonievorm vertoont, die zeer veel op die van het intermedius-type lijkt.

Theoretisch is het echter ook met behulp van de suikerproeven onmogelijk met zekerheid de diphtheriebacil te diagnostiseren. Er zijn n.l. specimina van *C. ovis* en *C. pyogenes* beschreven, die gelijke biochemische eigenschappen vertoonden. Practisch zal men deze moeilijkheid echter kunnen verwaarlozen, vooral indien de herkomst van de stam bekend is.

BARRATT (1933), die een uitgebreide studie van de „diphtheroïden” gemaakt heeft, is van oordeel, dat het niet omzetten van saccharose door virulente diphtheriebacillen zo algemeen geaccepteerd is en zozeer in overeenstemming is met het werk van zorgvuldige onderzoekers, dat een verdere bewerking van deze kwestie niet meer noodzakelijk is. Hij vraagt zich af, of de bij een chronische bacillendrager door WRIGHT en RANKIN (1932) gevonden stam, die steeds

¹⁾ De schrijvers van de monographie van de MEDICAL RESEARCH COUNCIL hechten nog betekenis aan de omzetting van galactose als een typisch kenmerk voor de diphtheriebacil. Deze fermentatieproef wordt echter door de meeste onderzoekers niet in hun schema opgenomen. Trouwens MAIR (1936) vond, evenals later HENNEBERG en PELS LEUSDEN (1937), enige virulente diphtheriebacillen, die geen galactose omzetten. Ik vond geen aanleiding deze suiker mede te onderzoeken.

saccharose bleef omzetten en zwak virulent was, wellicht tot de groep der „diphtheroïden” heeft behoord.

EAGLETON en BAXTER (1922) deden interessante waarnemingen over verontreinigingen, die op LOEFFLER-serum geheel door de diphtheriebacil worden overgroeid, zodat ze in het preparaat niet zijn te vinden. Deze verontreinigingen kunnen in sommige gevallen echter saccharose omzetten; een schijnbare vergisting van deze suiker door de diphtheriebacil doet zich dan voor. Bij mijn eigen onderzoek heb ik enige malen dezelfde waarnemingen kunnen doen. Op bldz. 62 wordt nog nader op deze kwestie teruggekomen.

De *pathogene eigenschap* ¹⁾ — het vermogen bij de mens diphtherie te verwekken — is de meest karakteristieke eigenschap van de diphtheriebacil. Bij de experimentele infectie van de cavia volgt na een of meer dagen de dood. Bij de sectie worden in hoofdzaak de gezwollen en rode bijniere als pathognomisch beschouwd. Het specifieke antiserum is in staat de dood van het dier te voorkomen.

Het is algemeen bekend, dat de diphtheriebacil zijn pathogeniteit kan verliezen. Er zijn talrijke zogenaamd avirulente diphtheriebacillen beschreven. Ondanks het verlies van deze zo uiterst belangrijke eigenschap blijft een dergelijke bacterie toch tot de soort *C. diphtheriae* te rekenen. Het onderscheid met de groep der „diphtheroïden” behoort dan op grond van de andere genoemde eigenschappen te geschieden.

Bijna alle „diphtheroïden” zijn apathogeen. Een uitzondering hierop vormen weer *C. ovis* en *C. pyogenes*. Hun gedrag is echter geheel anders dan van *C. diphtheriae*. Moeilijkheden zullen hier niet spoedig rijzen.

Volgens BARRATT lijken de met deze pathogene „diphtheroïden” na intracutane injectie verkregen laesies, meer op een papeltje en een pusteltje dan bij een infectie van *C. diphtheriae* het geval is. Diphtherie-antitoxine voorkomt de laesies niet. Evenmin gelijken de laesies, veroorzaakt door de eventuele toxinen van de „diphtheroïden”, op de door de echte diphtherie-toxinen ontstane reacties.

De bedoeling van het voorgaande is slechts, de voor de practijk belangrijkste eigenschappen van de diphtheriebacil in herinnering te brengen ter inleiding van een nadere behandeling der „typen”.

Zoals reeds werd gezegd, valt een bespreking van het verschil tussen *C. diphtheriae* en de groep der „diphtheroïden”, buiten het kader van dit proefschrift.

Een beschouwing over het zogenaamde „unitarisme” en „dualisme” vormt evenals de classificatie van de groep der „diphtheroïden” een studie op zich zelf. Na de ontdekking van de typen met behulp van de voedingsbodem van McLEOD, zou het ten aanzien van dit onderwerp als een eerste vereiste kunnen worden beschouwd, ook met betrekking tot de eigenschappen van de kolonies, de biochemische verschillen tusschen diphtherie- en pseudo-diphtheriebacillen te toetsen.

¹⁾ In Hoofdstuk II § 8 worden de begrippen *toxiciteit*, *virulentie* en *pathogeniteit* nader besproken.

HOOFDSTUK II.

DE KENMERKENDE EIGENSCHAPPEN DER TYPEN *GRAVIS*, *MITIS* EN *INTERMEDIUS* VAN *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*.

§ 1. *Inleidende opmerkingen.*

Zoals in Hoofdstuk I is uiteengezet, was het reeds lange tijd bekend, dat sommige stammen, in het bijzonder wanneer men ze op ongecompliceerde voedingsbodems kweekt, onderling verschillende kolonievormen opleveren. Grote betekenis is aan deze vondsten nimmer gehecht en geen enkel voorstel deze verschillen te gebruiken voor een indeling van de soort *Corynebacterium diphtheriae* in verschillende typen, vond ingang. Als belangrijkste oorzaak kan hiervoor genoemd worden, dat op de gebruikelijke voedingsbodems, zoals van LOEFFLER en CLAUBERG, geen enkel verschil tussen de typen te zien is.

ANDERSON, HAPPOLD, McLEOD en THOMSON, zijn de eersten geweest, die in 1931 een bruikbare nadere indeling van de diphtheriebacil publiceerden. Dank zij het toepassen van een bijzondere voedingsbodem ontdekten zij, dat vrijwel alle door hen onderzochte diphtheriestammen in drie groepen te verdelen waren, met als belangrijkste kenmerk een duidelijk verschil in kolonievorm.

a. De kweekgrond van McLEOD.

Het principe van de bereidingswijze van hun voedingsbodem, hier verder aangeduid met de naam van McLEOD, dankten zij aan WRIGHT (1929).

Deze verrichtte een fraai onderzoek over de aard van de voedingsstoffen, die voor een goede groei van de pneumococcus vereist zijn. Zijn belangrijkste conclusie was, dat de pneumococcus door organische stoffen, die sterk verhit worden, in zijn groei geremd wordt. Hierdoor werden ANDERSON c.s. op de gedachte gebracht voor bijzonder paratrophe organismen een medium te gebruiken, dat door filtratie was gesteriliseerd en dat bij zijn bewerking nimmer aan de gebruikelijke hoge temperaturen was blootgesteld. Bij het kweken van gonococci kregen zij hiermee verrassende resultaten. Zij beproefden de voedings-

bodem ook voor de diphtheriebacil en voegden, overeenkomstig het principe van CONRADI en TROCH, een weinig kaliumtelluriet toe, dat in geringe concentraties een electieve werking op de diphtheriebacil uitoefent.

De bereidingswijze van de voedingsbodem van McLEOD is als volgt:

Neem $1\frac{1}{2}$ tot 2 pond gehakt vlees. Vul met leidingwater aan tot 1000 cM.³ en breng dit gedurende een uur op een temperatuur van 48° C. Coleer en laat een nacht in de ijskast door papier filtreren.

Voeg bij 1000 cM.³ filtraat 20 gr. pepton „Parke, Davis & Co.” en 5 gr. NaCl.; verwarm tot 45° C. tot alles is opgelost.

Verhit een proefje van 50 cM.³ gedurende een kwartier op 80° tot 90° C. Filtreer door papier en bepaal, met behulp van indicatoren en buffermengsels, hoeveel alkali bij het geheel moet worden gevoegd om als eindresultaat een PH 7.6 te verkrijgen. (Met behulp van electrometrische PH bepaling kon ik de mededeling bevestigen, dat de hoge verhitting van het monster niet van invloed is op het resultaat van de zuurgraad van de voedingsbodem).

Filtreer door een Seitz K. filter. (Een grote tijdbesparing verkrijgt men door eerst het dikste af te centrifugeren).

Evenals CHRISTISON (1933) kwam ik tot de conclusie, dat het overbodig is daarna door een CHAMBERLAND-kaars te filtreren.

Verdeel het geheel in kolfjes en controleer op steriliteit. Bewaar het in de ijskast.

Wenst men de platen, die steeds zo vers mogelijk moeten zijn, te bereiden, dan gaat men als volgt verder:

Meng gelijke delen van de bouillon met 5% water agar. (In navolging van MURRAY werd door mij van het oorspronkelijke recept afgeweken en 3% wateragar genomen, aangezien ook mij bleek, dat een hoog vochtigheidsgehalte van groot belang is voor een fraaie ontwikkeling van de kolonies).

Voeg 7 tot 10% vers gedefibrineerd konijnenbloed toe en 0.04% kaliumtelluriet.

Meng en verhit gedurende 10 tot 15 minuten in een waterbad van een temperatuur van 75° C. Hierna kunnen de platen worden gegoten.

In den beginne werd er door mij, ondanks zeer voorzichtig schudden, veel hinder ondervonden van de schuimvorming, met als gevolg talrijke kleine moeten in het oppervlak van de agar, hetgeen vooral op de fotografische plaat vaak aanleiding gaf tot minder fraaie beelden. Dit euvel is echter gemakkelijk te voorkomen, door de kolven met de nog vloeibare „chocolade”-agar even onder een klok te zetten en

de lucht weg te pompen, totdat de vloeistof juist begint te koken. Na deze kleine bewerking is het schuim practisch geheel verdwenen en verkrijgt men een spiegelglad oppervlak.¹⁾

Verder deed ik de ervaring op, dat niet meer dan hoogstens een halve liter tegelijkertijd in het waterbad moet worden verhit, daar zich anders klonters vormen.

De voedingsbodem van McLEOD is inderdaad een medium, waarop de diphtheriebacil bijzonder rijkelijk groeit en fraaie, duidelijk te differentiëren kolonies vormt.

Een bezwaar is de gecompliceerde en tijdrovende bereidingswijze. Sommige onderzoekers hebben naar andere voedingsbodems van eenvoudiger samenstelling gezocht.

Er zij hier de aandacht op gevestigd, dat men reeds op gewone bouillon-agar menigmaal de typen aan hun kolonievorm kan herkennen.

HORGAN en MARSHALL (1932) gebruikten, daar filtratie in de Soedan op grote moeilijkheden stuitte, vlees-agar, die door verhitting op de gewone wijze was gesteriliseerd en waaraan 7—10% bloed en 0.04% kaliumtelluriet werd toegevoegd. De bloedsoort was van weinig invloed, runder- of paardebloed leek hun het beste. Dadelijk, nadat het bloed was afgenomen, deden zij het kaliumtelluriet er bij en niet, zoals gebruikelijk, onmiddellijk voor het gieten van de platen. Dit bracht het voordeel mee, dat zij het bloed gedurende 21 dagen konden bewaren, zonder dat het bedierf. Een maatregel, die voor de tropen zeker aanbeveling verdient.

De drie typen zouden op deze kweekgrond goed te herkennen zijn, terwijl de positieve uitkomsten in aantal gelijk waren aan die met het LOEFFLER-serum te verkrijgen. Zij onderzochten echter slechts een klein aantal stammen. Volgens O'MEARA en PARISH (1933) zijn gravis en mitis op deze platen niet goed te onderscheiden.

GUNDEL en TIETZ (1935) werkten een voedingsbodem uit, die in principe bijna geheel met die van HORGAN en MARSHALL overeenkomt. Zij gingen systematisch te werk door verschillende bloedsoorten en sera in verschillende concentraties met elkaar te vergelijken en tevens de invloed van cystine op de groei van de diphtheriebacil na te gaan. Volgens deze onderzoekers is een voedingsbodem van de

volgende samenstelling het meest aan te bevelen tot het onderscheiden van de typen:

10% schapebloed (eventueel kan ook runder- of paardebloed genomen worden.)

0,001% cystine.

0,04% telluriet.

2½% agar; PH 7,5.

Het oplossen van het cystine geschiedt door middel van een 10% hete sodaoplossing, en wel zodanig, dat 1 gr. soda in 10 cM.³ gedestilleerd water wordt gekookt. Hierna wordt 1 gr. cystine toegevoegd, waarna nogmaals wordt gekookt. Deze oplossing wordt met gedestilleerd water tot 100 cM.³ aangevuld en in bruine flesjes bewaard.

GUNDEL en TIETZ delen niet mee, welke soort agar door hen is gebezigd. Bij mijn eigen vergelijkend onderzoek is zowel van Liebig-bouillon-agar als van vlees-bouillon-agar gebruik gemaakt. Een verschil van enig belang leverde dit niet op.

In vergelijking met de voedingsbodem van McLEOD, is die van GUNDEL ongetwijfeld zeer veel gemakkelijker te bereiden. Daar dit voor de practijk van het diphtherieonderzoek een groot voordeel zou opleveren, ben ik er toe overgegaan, ongeveer driehonderd maal de beide voedingsbodems met elkaar te vergelijken. Vele stammen werden enige malen onderzocht, waarbij ook werd nagegaan, bij welke kweekgrond de kolonies verder uiteen moesten liggen om in moeilijke gevallen een differentiatie van het type mogelijk te maken.

Het bleek hierbij, dat de voedingsbodem van GUNDEL kwalitatief achter staat bij die van McLEOD. Vaker was een sterke isolatie van de kolonies vereist om in twijfelachtige gevallen een juiste diagnose te maken. Daarbij komt, dat de diphtheriebacil er iets moeilijker op groeit en dat men niet die scherp gedifferentieerde en fraaie vormen krijgt. Het onderscheid tussen het intermedius- en het mitis-type komt op GUNDEL-agar minder goed uit, vooral als men met een mitis-stam te doen heeft, die zeer kleine kolonies vormt (fig. 9 en 10).

Ook zou het bijvoorbeeld onmogelijk geweest zijn de in Amsterdam gevonden gravis-stammen als zodanig te herkennen, indien alleen gebruik gemaakt was van de GUNDEL-agar.

Men kan zich in noodgevallen, waarbij het onmogelijk is de voedingsbodem van McLEOD te bereiden, met die van GUNDEL behelpen. Het percentage fouten wordt dan echter noodzakelijk iets hoger; men brengt dus de waarde van het onderzoek op een wat lager peil. In het bijzonder geldt dit voor het veranderlijkheidsonderzoek, waarbij het veelal op kleine verschillen aankomt.

¹⁾ MENTON e.a. (1933) delen mede, dat indien het oppervlak van een plaat ruw is geworden door luchtbelletjes, een mitis-kolonie hierop het karakter van het gravis-type kan krijgen.

Ik kan mij dan ook geenszins verenigen met de uitspraak van GUNDEL en TIETZ, waarin zij het medium van McLEOD als minderwaardig ten opzichte van het hunne beschouwen. Het is onbegrijpelijk, dat zij, na de zo talrijke gunstige ervaringen, zich min of meer misprijzend over het werk van ANDERSON c.s. uitlaten, die „zwar nur mit ihrem Schokoladenährmedium gearbeitet haben, von dem wir wissen, dass es nicht nur ein ziemlich ungeeigneter Diphtherienährboden ist, auf dem die Diphtheriebacillen ein im allgemeinen nur recht zartes Wachstum aufweisen, von dem wir aber weiter festgestellt haben, dass ein Teil der echten Diphtheriebacillen ebenso wie auf dem Nährboden nach CLAUBERG auch auf diesem englischen Nährsubstrat überhaupt nicht wachsen". Wanneer men zelf met deze „chocoladeagar" gewerkt heeft en de juistheid van de uitslating van CARTER (1936): „it saves time and problems" heeft leren inzien, vraagt men zich af, wat toch de oorzaak van het oordeel van GUNDEL en TIETZ heeft kunnen zijn.

Wanneer men bovendien bedenkt, dat van het gehele werk over de diphtherie-typen, dat eigenlijk kritisch beschouwd nog in statu nascendi verkeert, de voedingsbodem van McLEOD de grondpeiler is, dan dringt zich al spoedig de overtuiging op, dat men mede ter wille van de noodzakelijke eenheid, slechts dan deze peiler door een andere mag vervangen, indien men hiermee minstens even goede resultaten verkrijgt. ¹⁾

b. De illuminator van MURRAY.

Alvorens tot de beschrijving van de kolonievormen over te gaan, wil ik vooraf de aandacht vestigen op een belangrijke technische verbetering, die tot nu toe nog geen verdere navolging heeft gevonden en waardoor het mogelijk geworden is, de kolonievormen op vaak verrassend goede wijze te beoordelen en van elkaar te onderscheiden.

MURRAY (1935) kwam op de ingenieuze gedachte een kleine doos te construeren, zonder bodem, met in de deksel een rond gat, waaromheen zes kleine lampjes waren gemonteerd. Onder de lampjes was een plaat aangebracht, waarop de te bestuderen PETRI-schaal kon worden gezet. Het geheel werd onder een microscoop geplaatst. De

¹⁾ STRIGLER (1936) heeft nog een voedingsbodem beschreven, met 5% Campolon. Deze is zeer gemakkelijk te bereiden en zou speciaal voor klinische laboratoria zeer geschikt zijn. VON BORMANN verklaart er goede resultaten mee gehad te hebben. Volgens hem is deze voedingsbodem beter dan die van GUNDEL. Met de Gundel-agar had VON BORMANN namelijk ook menig maal moeite met het differentiëren van mitis- en intermedius-kolonies.

lichtjes, die dan in de kolonies weerspiegelen, maakten het MURRAY mogelijk zeer fijne verschillen in de kolonievorm waar te nemen.

De eerste proefnemingen, die ik met een dergelijk toestelletje nam, waren zo bemoedigend, dat ik besloot het verder te gebruiken. Het bleek echter gewenst enige wijzigingen aan te brengen, zodat de illuminator ten slotte als volgt is geconstrueerd:

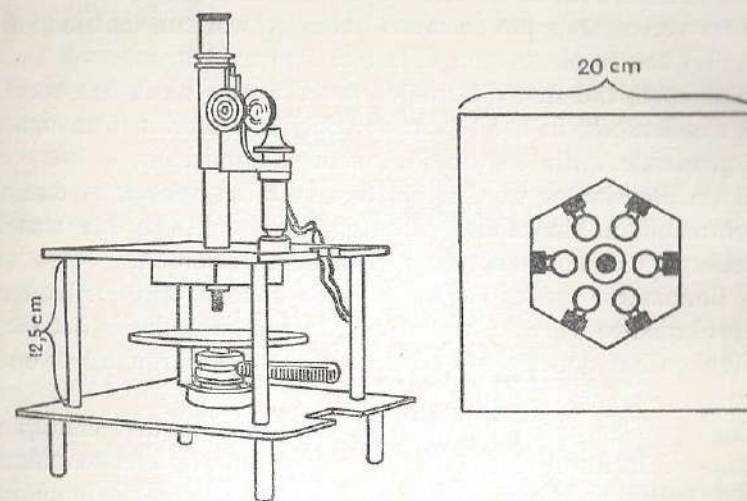


Fig. 1.

In een vierkant stuk eboniet wordt een rond gat geboord, waarin de tubus van de microscoop juist past. Rondom dit gat worden aan de binnenkant van de plaat zes zaklantaarnlampjes gemonteerd en wel zo, dat ze tegen de plaat komen aan te liggen. De lampjes werden aanvankelijk met opzet bewegelijk gemaakt, om na te gaan bij welke stand de beste resultaten werden verkregen. Het bleek mij, dat het aanbeveling verdient de lampjes zo dicht mogelijk te bevestigen bij het gat in de ebonieten plaat.

Vervolgens wordt de ebonieten plaat door middel van vier staafjes op een stevige ijzeren plaat gemonteerd. In het midden van deze plaat wordt een rond ijzeren tafeltje aangebracht om de PETRI-schaal op te zetten. Dit tafeltje kan door middel van een ijzeren staaf, die in een kogelgewricht past, omhoog en omlaag worden bewogen. Hierdoor is de invloed van het verschil in afstand tussen lampjes en PETRI-schaal op het beeld van de kolonies na te gaan. Tevens moet het tafeltje heen en weer bewogen kunnen worden, daar kleine onregelmatigheden in de agar of de PETRI-schalen reeds een scheve projectie van de lampjes op de kolonies teweeg brengen.

Op de ebonieten plaat wordt een tubus van een oude microscoop gemonteerd. Deze tubus past juist in het gemaakte gat. De grove schroefregeling wordt intact gelaten. Het lenzenstelsel dient te bestaan uit een oculair $4 \times$ en een objectief $3 \times$.

De lampjes zijn door middel van een weerstand regelbaar.

Het bleek mij, dat de beste resultaten verkregen werden, indien de afstand tussen PETRI-schaal en lampjes zo groot mogelijk was. Hiervoor moet een verlengstuk aan de tubus bevestigd worden, ten einde dicht genoeg bij het te observeren object te kunnen komen.

Nadat korte tijd met dit toestel gewerkt was, bleek het voor het verdere onderzoek, in het bijzonder voor het onderscheiden van een klein groeiende mitis en een intermedius, onmisbaar.

Met de illuminator werden betere resultaten verkregen dan met de gebruikelijke binoculaire „Plattenmicroscop”. Tevens was het fotograferen van kolonies zeer gemakkelijk geworden.

De illuminator maakt het mogelijk de kolonievorm der bacteriën op geheel nieuwe wijze te bestuderen. In het bijzonder is het toestel geschikt om het onderscheid tussen „smooth” en „rough” te onderzoeken.

Talrijke malen werd ik voor de taak gesteld, met behulp van GUNDEL- of McLEOD-platen uit een mengcultuur op LOEFFLER-serum een diphtheriestam zuiver te kweken. Ook hierbij bewees de illuminator goede diensten. Na enige oefening gelukt het de kolonies, die men door het microscoop ziet, met een fijn kwartsnaaldje af te enten. Zo was het mogelijk van platen, waar te midden van honderden verschillende kolonies slechts enkele van de diphtheriebacil gegroeid waren, deze bacterie toch zuiver te kweken.

Voor het practijk-laboratorium kan de illuminator verder van dienst zijn bij het determineren van keelplaten. Men ziet hierbij, dat de talrijke kolonies, die zijn opgekomen, in bijvoorbeeld vier of vijf verschillende vormen zijn te verdelen; van iedere vorm ent men een kolonie af, waarna de verschillende bacteriestammen verder kunnen worden onderzocht.

Een zeer belangrijk voordeel werd verder dankzij de illuminator verkregen, doordat het mogelijk was ook tussen verschillende stammen, die toch tot hetzelfde type van de diphtheriebacil behoorden, fijne verschillen te zien. Hierdoor kon in enkele gevallen met zekerheid de infectiebron van een bepaald geval aangewezen worden. Iets wat voor de epidemiologische kennis van de diphtherie nog zijn belang kan hebben.

Resumerende kan men tot de conclusie komen, dat de illuminator

van MURRAY een belangrijke aanwinst is, zowel voor het wetenschappelijke als voor het klinisch-bacteriologische laboratorium. Wanneer men beschouwt met welke geringe kosten en eenvoudige hulpmiddelen dit toestel te vervaardigen is, kan men zich er over verwonderen, dat aan het denkbeeld van MURRAY niet meer aandacht is besteed.

§ 2. Het verschil in kolonievorm tussen *gravis*, *mitis* en *intermedius* op de kweekgrond van *McLeod*.

Overeenkomstig de door de Engelse onderzoekers aangegeven criteria en de door mijzelf opgedane ervaringen, kunnen de verschillen als volgt worden beschreven:

Gravis. Grote ruwe kolonie, met onregelmatige rand en radiaal verlopende groeven. De vorm is pyramidaal. De kleur is meestal grijs, een enkele maal zwart. Onder de illuminator worden de lichtjes op zeer onregelmatige wijze gereflecteerd. (fig. 2).

Mitis. Middelgrote „smooth” kolonie, regelmatig ronde rand. Bolvormig, met een heel fijn randje, zodat het geheel vaak doet denken aan een klein bolhoedje. De kleur is overwegend zwart. Onder de illuminator ziet men de zes lichtjes helder gereflecteerd en wel één maal door het bolletje en één maal door de rand. (fig. 3).

Intermedius. Deze kolonies zijn steeds zeer klein. Voor het blote oog zien zij er uit als kleine stippen. Ze zijn geheel plat van vorm, met soms in het midden een kleine papil. De rand vertoont meestal een uiterst fijne karteling. De kleur is in het midden veelal zwart, soms met een iets groenige tint, de rand is iets grijzer. Met de illuminator ziet men de lampjes als een fijn lichtend randje om de kolonie gereflecteerd. Soms ziet men in het geheel geen reflex. Nimmer wordt echter iets anders dan de randreflex gezien, hetgeen zijn oorzaak vindt in de zeer platte vorm van de kolonie. Voor de differentiëring van *mitis* en *intermedius* is dit het belangrijkste kenmerk. (fig. 4).

De beoordeling van de kolonies dient na 2 maal 24 uur te geschieden. Vóór die tijd is een juiste differentiatie in de meeste gevallen onmogelijk.

Zoals te verwachten is, worden wel eens grotere of kleinere afwijkingen van de beschreven normen gevonden. Deze verschijnselen worden later nog uitvoerig besproken.

§ 3. De celvorm der typen van de diphtheriebacil.

In de inleiding werden de typische morphologische eigenschappen der cellen van *Corynebacterium diphtheriae* reeds aangegeven.

Voor dertig jaar, in 1898 hebben o.a. WESTBROOK, WILSON, MC. DANIEL and ADAIR en WESTBROOK, WILSON en MC. DANIEL (1899—1900) reeds een poging gedaan op grond van verschillen in de celvorm, de diphtheriebacil in typen te verdelen. Zij gaven toe, dat iedere cultuur practisch uit een mengsel van allerlei vormen bestaat, maar trachtten, lettende op het overheersen van een bepaalde morphologische gestalte, de stam in een bepaalde groep in te delen.

Inderdaad staat aan iedere poging, de diphtheriebacil op grond van zijn cultuur-morphologische eigenschappen in groepen te verdelen, de meest kenmerkende eigenschap van deze bacterie, namelijk zijn sterke polymorphie, in de weg. Men zal hoogstens kunnen zeggen, dat een bepaalde celvorm overheerst. Ook dan echter ondervindt men nog grote moeilijkheden. Het is een ieder, die met diphtheriebacteriën werkt, bekend, dat een zelfde stam, enige malen onder dezelfde omstandigheden gekweekt, vaak zeer wisselt van vorm en poolkorreling.

Het ligt voor de hand, dat een zo gevoelige bacterie als de diphtheriebacil op verschillende voedingsbodems eveneens in verschillende vormen zal groeien. Door de meeste schrijvers echter wordt, indien zij de morphologie van de diphtheriebacil bespreken, de vorm bedoeld waarin deze bacterie zich voordoet in een 20-uur oude cultuur op LOEFFLER-serum, gegroeid bij 37° C.

De schrijvers van de monographie „*Diphtheria*”, delen mee, dat op verschillende partijen van deze voedingsbodem, diphtheriebacillen van één stam met een andere celvorm kunnen groeien. Ook is volgens hen de vochtigheidsgraad van het oppervlak van invloed. Zij zijn van mening, dat het practisch onmogelijk is, op deze wijze tot een definitieve classificatie te komen.

a. Het vervaardigen der preparaten.

KAPSENBERG (1935) heeft onlangs fixatie in 10% formaline aanbevolen, daar door de gebruikelijke methode van „drie maal door de vlam halen”, de morphologie van de diphtheriebacil lijdt en de poolkorrels minder goed gekleurd worden.

Deze waarneming kon ik in alle opzichten bevestigen. In de eerste plaats bleek mij, dat het een groot verschil maakt, hoe men het objectglas door de vlam haalt. Een ook maar iets te sterke verhitte wijze is voldoende om de latere kleuring van de poolkorrels op opvallende wijze te schaden of geheel te verhinderen. De beste resultaten met de classieke fixatie verkreeg ik nog met de, op het Laboratorium voor de Gezondheidsleer gebruikelijke methode. Hierbij wordt het

objectglas enige malen snel door de vlam gehaald totdat, wanneer men het op de muis van de hand legt, juist een prikkeling wordt gevoeld.

Deze laatste methode heb ik met vijftig verschillende preparaten, afkomstig van vijftig verschillende diphtheriestammen, vergeleken met de fixatiemethode volgens KAPSENBERG. Hierbij werd als volgt te werk gegaan. Eerst werd een suspensie gemaakt van de te onderzoeken 24-uur oude cultuur op LOEFFLER-serum. Op een objectglas werd een oogje physiologische zoutsolutie gebracht. Een oogje van de suspensie werd met het druppeltje zoutsolutie vermengd, uitgewreven, aan de lucht gedroogd en op de reeds beschreven wijze door de vlam gehaald. Vervolgens werd, nadat het objectglas was afgekoeld, op hetzelfde glaasje een druppeltje 10% formaline gebracht. Dit druppeltje werd vermengd met een oogje van de suspensie en aan de lucht gedroogd. Aldus werden op één objectglas twee preparaten verkregen, waarvan één gefixeerd was volgens de classieke methode en één met formaline. Hierna werd de kleuring volgens NEISSER ¹⁾ toegepast. Door deze manier van werken waren de te vergelijken preparaten op dezelfde wijze gekleurd, zodat hierin geen mogelijke bron van fouten lag.

Na de kleuring werden de preparaten met elkaar vergeleken. Hierbij werd in het bijzonder gelet op de poolkorreling.

Van de vijftig onderzochte preparaten waren 8, volgens de methode KAPSENBERG vervaardigd, evengoed als de door verhitte gefixeerden; 23 waren beter en 19 zeer veel beter.

In de fixatie volgens KAPSENBERG beschikken wij dus over een belangrijke verbetering in de kleurtechniek. Deze methode heeft tevens voor, dat de preparaten steeds op dezelfde wijze worden gemaakt, zodat eventuele verschillen in temperatuur van het objectglas, die bij het door de vlam halen kunnen ontstaan, niet van invloed zijn.

Ook met deze methode blijft nog zeer veel onzekers bij het bepalen van de vorm van de diphtheriebacil over.

¹⁾ De kleuring werd verricht volgens de, in het Laboratorium voor de Gezondheidsleer gebruikelijke, wijze:

1. Kleur met een mengsel van 2 delen NEISSER A- en 1 deel NEISSER B-oplossing gedurende 20 seconden.
2. Spoel het preparaat zeer kort af.
3. Kleur gedurende 20 seconden met een NEISSER C-oplossing.
4. Droog het preparaat tussen filtreerpapier, zonder eerst af te spoelen.

b. De morphologie der drie typen.

Toch zijn de ontdekkers van de typen tot het besluit gekomen, dat het overheersen van een bepaalde vorm voor een bepaald type karakteristiek is.

De door hen aangegeven kenmerken luiden als volgt:

Mitis: Een vorm zoals die in de leerboeken als kenmerkend voor *C. diphtheriae* beschreven wordt: de staafjes zijn gewoonlijk lang, met fraaie poolkorrels.

Gravis: Op andere kweekgronden dan LOEFFLER's serum, vaak een zeer korte „diphtheroïde” vorm, gewoonlijk zonder poolkorrels. Op LOEFFLER-serum zijn de poolkorrels soms zeer goed gevormd, doch zij kunnen schaars zijn. De gravis-vorm lijkt het meest op de bacil van HOFMANN.

Intermedius: gesegmenteerde „diphtheroïde” vorm. Poolkorrels komen in wisselende grootte tot ontwikkeling, doch vaak slechts in geringe mate.

Men kan zeggen, dat in het algemeen deze kenmerken voor de verschillende typen wel kloppen. Het meest constant luiden de beoordelingen over de morphologie van het intermedius-type. MAIR (1936) vindt het gesegmenteerd zijn zelfs een van de belangrijkste criteria voor het verschil tussen mitis en intermedius. De door hem gepubliceerde foto's zijn overigens niet erg overtuigend. Volgens ROBINSON (1934) waren 98% van de intermedius-stammen gesegmenteerd. Volgens MURRAY is dit cijfer 100%, met dien verstande, dat 30% van de ruim 100 door hem onderzochte stammen behalve de gesegmenteerde ook meer slanke vormen vertoonden met veel poolkorrels.

Bij de andere typen daarentegen, wordt een groter percentage afwijkingen gezien. Zo vond ROBINSON bij 60% van de gravis-stammen de oorspronkelijk voor dit type beschreven vorm. De rest was gesegmenteerd of zag er uit als mitis. Ook van de mitis-stammen waren sommigen gesegmenteerd.

STUART (1938) vond bij verschillende, serologisch te differentiëren, gravis-stammen ook een verschil in morphologie. Een bepaald serologisch type leek morphologisch geheel en al op intermedius.

PERRY e.a. (1936), die de voedingsbodem van DOUGLAS gebruikten en hiermee een veel scherper morphologisch onderscheid tussen de typen verkregen, konden 94.5% van de 146 cultures aan de vorm herkennen. Bij enkele stammen vonden zij de morphologische kenmerken van twee of drie typen gemengd. Terecht maken zij de conclusie, dat het zeer goed mogelijk is, dat dergelijke „typen” zich gedurende

een epidemie in een bepaalde streek kunnen verspreiden, zodat daar de afwijkende vormen gaan overheersen.

Resumerende kan men tot de slotsom komen, dat de diphtherie-stammen in een groot percentage ook de morphologische kenmerken hebben van het type, waartoe zij behoren. Men moet dus bij het type-onderzoek op de vorm van de bacillen letten. Individuële afwijkingen van de genoemde criteria zullen echter voorkomen. Heeft een stam dus alle eigenschappen van een bepaald type, dan mag hij op grond van een afwijkend morphologisch beeld niet als „atypisch” worden beschouwd. De celvorm kan als hulpmiddel bij de typering dienst doen, doorslaande betekenis mag er echter niet aan gehecht worden.

§ 4. De omzetting van koolhydraten.

Als medium voor de suikeromzetting is in Engeland veelal het „Hiss' serum-water” in gebruik. Dit medium is ook door de schrijvers van de monographie van de MEDICAL RESEARCH COUNCIL aanbevolen.

De ontdekkers van de typen van de diphtheriebacil gebruikten serumwater met 1% pepton (Parke, Davis & Co.) en phenolrood als indicator.

Hoewel deze kweekgrond in Nederland voor het onderzoek van de suikeromzettingen weinig gebruikt wordt, heb ik aanvankelijk, ter wille van de gelijke methodiek, een poging gedaan, deze ook bij mijn eigen onderzoek te gebruiken. Hierbij deed zich het merkwaardige feit voor, dat steeds alle suikers, ook die waarvan men het niet zou verwachten, na 1 maal 24 uur werden omgezet.

Ik heb toen de invloed van de verschillende bestanddelen van Hiss' serum-pepton-water nagegaan en deze vergeleken met die van het in Nederland en ook in het Laboratorium voor de Gezondheidsleer gebruikelijke pepton „Witte”-lakmoes-water. De resultaten van dit onderzoek zijn in tabel I vastgelegd.

Hieruit kan de conclusie worden getrokken, dat het serum voldoende glucose of andere suikers kan bevatten om alleen reeds een geringe zure reactie te veroorzaken. Ook DE WOLFF noemt de sporen glucose, die in serum aanwezig kunnen zijn, een bezwaar van Hiss' serum-water. Bovendien beschouwt zij de gecompliceerde eiwitverbindingen als een nadeel, daar deze een tweede onberekenbare factor vormen. Zij vestigt ook de aandacht op de mening van von Pesch, volgens wie de fermentatieve kracht der bacteriën verband houdt met de aard van

de voedingsbodem, zodat, wanneer men een diphtheriebacterie laat groeien op een voedingsbodem, die naast pepton nog serum als stikstofbron bevat, de stikstofvrije bron minder wordt aangetast dan wanneer er alleen pepton aanwezig zou zijn.

Uit tabel I blijkt tevens, dat de door mij gebruikte pepton „Parke Davis & Co.” stoffen moet bevatten, die op zich zelf reeds voldoende zijn na 1 maal 24 uur door de diphtheriebacil te worden omgezet. Er ontstaat dan een zure reactie, ook zonder dat een suiker is toegevoegd. Na 2 maal 24 uur vinden er weer andere omzettingen plaats, die er voor zorgen, dat na 3 maal 24 uur de reactie weer alkalisch is. Was saccharose toegevoegd, dan bleef de reactie zuur.

Kort nadat mij dit was gebleken, publiceerden WRIGHT en CHRISTISON (1935), dat ook zij met een tijdelijke omzetting van het serum-peptonwater te kampen hadden gehad.

De conclusie is dus gerechtvaardigd, dat het pepton van Parke, Davis & Co. niet constant van samenstelling is en ongeschikt voor suikerfermentaties.

TABEL I.

Na Na Na
1 × 24 uur 2 × 24 uur 3 × 24 uur

	Geënte buis	Contrôle	Geënte buis	Contrôle	Geënte buis	Contrôle
Serumwater	sp. ¹⁾	alk.	sp.	alk.	sp.	alk.
Serumwater + pept. „P.D. en Co”	zuur	alk.	alk.	alk.	alk.	alk.
Serumwater + pept. „Witte”	sp.	alk.	sp.	alk.	zuur	alk.
Serumwater + saccharose	sp.	alk.	sp.	alk.	sp.	alk.
Water + pept. „P.D. en Co”	zuur	alk.	sp.	alk.	alk.	alk.
Serumwater + sacch. + pept. „P.D. en Co”	zuur	alk.	zuur	alk.	zuur	alk.
Water + pept. „Witte”	alk.	alk.	alk.	alk.	alk.	alk.
Water + saccharose + pept. „Witte”	alk.	alk.	alk.	alk.	alk.	alk.

Daar dus zowel het serum, als het door de Engelse onderzoekers gebruikte pepton, grote bezwaren met zich meebrachten, achtte ik mij gerechtigd, ondanks de wenselijkheid van eenvormigheid in

¹⁾ Sp. wil zeggen: Geringe omzetting in zure richting.

onderzoekingsmethoden, over te gaan tot de hier te lande gebruikelijke kweekgrond, bestaande uit:

- 1 % pepton „Witte”;
- 0,5% NaCl;
- 4 % lakmoesoplossing „Kahlbaum”.
- 1 % koolhydraat.

De sterilisatie geschiedt bij 100° C., en wel drie opeenvolgende dagen gedurende een kwartier, daar langdurige sterilisatie bij hoge temperatuur schadelijk is voor de suiker.

De controle geschiedde steeds na 1 en 2 maal 24 uur.

Glucose.

De omzetting van glucose geschiedde zonder onderscheid door alle diphtheriestammen van alle typen. Zoals reeds in Hoofdstuk I is opgemerkt, moet deze omzetting als een kenmerk van de soort *Corynebacterium diphtheriae* beschouwd worden.

Saccharose.

Evenzo werd saccharose door geen van de door mij onderzochte stammen ontleed. De enkele maal dat dit geschiedde was, zoals reeds gezegd, een verontreiniging in het spel.

Maltose.

Bij wijze van proef werd *maltose* in de reeks der te onderzoeken suikers opgenomen. In het geheel werden hiermee 55 stammen onderzocht n.l. 5 gravis-, 5 intermedius-, 40 pathogene en 5 apathogene mitis-stammen. Evenals DE WOLFF vond ik, na 1 maal 24 uur in vele gevallen een twijfelachtige reactie. Na 2 maal 24 uur echter was de reactie bij alle stammen positief, op 4 pathogene vertegenwoordigers van het mitis-type na. Voor het differentiëren van de typen kan aan *maltose* dan ook geen betekenis worden toegekend.

Stijfsel.

De omzetting van stijfsel is voor het onderzoek van de typen van de allergrootste betekenis, daar, zoals ANDREWES e.a. (1931) meedeelden, dit koolhydraat uitsluitend door het gravis- en niet door het mitis- en intermedius-type wordt omgezet.

Op twee manieren kan men de omzetting van stijfsel onderzoeken, n.l. door gebruik te maken van de stijfsel-plaat en door het stijfsel te voegen bij een van de gebruikelijke vloeibare media.

De stijfsel-plaat is voor het onderzoek der typen van de diphtherie-bacil weinig gebruikt. ANDERSON e.a. (1931) vonden, na 3 tot 4 dagen groei op verhitte serum-agar platen met 0.5% stijfsel, nadat deze met jodium waren behandeld, een duidelijke kring om de gravis-kolonies, doch niet om die van het mitis-type of om de „Park Williams 8"-stam.

MURRAY (1935) verkreeg met deze methode minder duidelijke resultaten. Weliswaar gaven de meeste gravis-stammen de sterkste kring, doch daar stond tegenover, dat enkele negatief waren, terwijl een niet te verwaarlozen aantal intermedius- en mitis-stammen daarentegen een min of meer duidelijk halo gaf. Voor het onderzoek van de stijfselomzetting geeft deze schrijver dan ook aan het gebruik van een vloeibaar medium de voorkeur.

Nadat ik zelf eveneens een aantal proeven met de stijfsel-plaat genomen had en daarbij constateerde, dat ook stammen, die niet tot het gravis-type behoorden, een duidelijke kring te zien gaven, nam ik het besluit, deze proef niet in het onderzoek op te nemen. Vermoedelijk spelen nog andere factoren een rol, zodat de stijfselplaat ongeschikt moet worden geacht voor de differentiëring van de typen van de diphtheriebacil.

Verwonderlijk eensluidend zijn de meningen van bijna alle schrijvers over de waarde van de stijfselomzetting in pepton-water of serum-pepton-water voor de herkenning van het gravis-type. Sommige schrijvers beschouwen deze omzetting als nog belangrijker dan de kolonievorm. Het is echter in de gehele bacteriologie en ook hier onjuist slechts één eigenschap als de belangrijkste te willen zien. In het Hoofdstuk IV zal nader worden besproken, hoe iedere eigenschap op zich zelf aan veranderingen kan bloot staan. Het is dan ook niet te verwonderen, dat ook bij de diphtherie-typen op een bepaalde regel, als het samengaan van een bepaalde kolonievorm met stijfselomzetting, wel eens een uitzondering kan voorkomen.

Sommige onderzoekers beschrijven stammen, die suiker omzetten en een mitis-kolonievorm hebben. Een dergelijke ervaring heb ik met Amsterdamse stammen opgedaan. Het bleek echter, dat door het volgen van een bepaalde techniek, die later nog zal worden besproken, het wel degelijk mogelijk was van deze stammen echte gravis-kolonies te verkrijgen.

Mededelingen van enkele schrijvers, dat een gravis-stam bij het voortkweken in het laboratorium de eigenschap van de stijfselomzetting verloor, heeft ons niet te verbazen. Evenmin als de mededeling van ROBINSON (1934) over een stam, die de eigenschap verkreeg.

Voor de theorie over de bacteriële veranderlijkheid en de onderscheiding van „pseudotypen" en rassen, zijn deze vondsten uitermate belangrijk, voor de practijk van het laboratorium echter niet, daar zij tot de grote uitzonderingen behoren.

Er moet dan ook gewaarschuwd worden tegen het voorstel van WRIGHT en CHRISTISON, die op grond van door hen gevonden gravis-stammen, die geen stijfsel omzetten een nieuw type willen creëren.

Ook zijn er fouten in de techniek mogelijk. Zo waarschuwt CARTER (1936) tegen het rechtstreeks overenten van glucose-bouillon in de kweekgrond met stijfsel, daar sporen glucose of serum reeds een omzetting van de stijfsel zou kunnen teweegbrengen.

Bij mijn eigen onderzoek ben ik nimmer een uitzondering tegengekomen. Alle gravis-stammen zetten stijfsel om, mitis of intermedius deden dit nimmer.

Resumerende kan men de stijfselomzetting als een van de belangrijkste eigenschappen van het gravis-type beschouwen.

Glycogeen.

Met de omzetting van stijfsel gingen de ontdekkers van de typen van de diphtheriebacil nog de omzetting van een ander polysaccharide na, namelijk glycogeen. Het bleek, dat deze suiker ook steeds door gravis en nimmer door mitis of intermedius werd omgezet. Volgens PERRY e.a. (1936) behoeft deze omzetting niet steeds samen te gaan. Ik nam glycogeen in het onderzoek op. Het bleek mij, dat de omzetting in sommige gevallen niet steeds zo duidelijk was als met stijfsel. Van de gravis-stammen gaven 6 een geringe omzetting, met de anderen werd een duidelijk positieve reactie verkregen.

Dextrine.

Door de schrijvers van de reeds enige malen genoemde monographie is er reeds op gewezen, dat aan de beoordeling van de omzetting van dextrine door de diphtheriebacil vele moeilijkheden zijn verbonden, doordat de zuiverheid van dit product vaak veel te wensen over laat. De hiermee door ANDERSON e.a. (1931) verkregen resultaten waren niet erg overtuigend. Gravis zou dextrine omzetten; mitis gaf wisselende resultaten. Ik vond dan ook geen aanleiding deze suiker in het onderzoek op te nemen.

§ 3. Verschil in haemolytisch vermogen van de typen.

Reeds lang voor de ontdekking van de diphtherie-typen zijn de haemolytische eigenschappen van de diphtheriebacil een onderwerp

van studie geweest. Zo vond SCHWONER (1904), dat het haemolytische vermogen gebonden was aan het bacterielichaam zelf, daar filtraten van cultures geen haemolyse gaven. GOLDIE (1933) daarentegen, deelt mee, dat filtraten wel haemolytisch zijn, en dat hun activiteit samen zou gaan met de hoeveelheid toxine, die zij bevatten. De haemolysinen worden echter niet door het antitoxine geneutraliseerd.

ANDREWES e.a. (1923) citeren enige schrijvers, volgens wie de haemolyse een constante eigenschap van de diphtheriebacil zou zijn, terwijl de „diphtheroiden” deze eigenschap nimmer zouden bezitten. Dit laatste is zeker onjuist, daar er twee diphtheroiden zijn, *C. ovis* en *C. pyogenes*, die een haemolytische werking op verschillende bloedsoorten uitoefenen.

ANDERSON e.a. (1931) hebben zich reeds dadelijk bezig gehouden met de vraag of de haemolytische eigenschappen van de diphtheriebacil ook van belang konden zijn voor de verdeling in typen.

Als techniek gebruikten zij die werkwijze, die zij de „HAMMERSCHMIDT-methode” noemen. Deze werd door hen als volgt uitgevoerd:

1 cM.³ van een 48-uur oude bouilloncultuur wordt gevoegd bij 1 cM.³ van een dunne suspensie van gewassen rode menschenbloed-lichaampjes. Dit mengsel wordt 2 uur bebroed, vervolgens een nacht in de koude gezet, waarna aflezing volgt.

KEMKES en STEIGLER (1937) deden proeven met 6 verschillende stammen, die ieder in tienvoud tegelijk door hen op hun haemolytische vermogen werden onderzocht. Zij maakten gebruik van een variant van de z.g.n. „HAMMERSCHMIDT-methode”. Het bleek hun, dat vier van de zes stammen in de tien verschillende buisjes niet steeds dezelfde uitkomst gaven. Volgens hen is haemolyse proef ongeschikt voor de typendifferentiëring.

Het merkwaardige feit doet zich echter voor, dat hier met de naam „HAMMERSCHMIDT-methode” een techniek wordt aangeduid, die door dezen schrijver juist ongeschikt verklaard is om na te gaan of een stam al of niet „haemotoxinen” produceert. Alleen voor quantitative doeleinden zou volgens hem deze methode dienst kunnen doen.

Het spreekt vanzelf, dat reeds in het wassen van de rode bloed-lichaampjes een grote moeilijkheid schuilt door de mogelijkheid, dat zij bij deze bewerking beschadigd worden.

Om na te gaan of een diphtherie-stam „haemotoxinen” bevat, beval HAMMERSCHMIDT (1924) een methode aan, die ook op het Laboratorium voor de Gezondheidsleer steeds gebruikelijk geweest is.

Hierbij doet men vóór de enting 2 druppels van de te onderzoeken bloedsoort bij ± 5 cM.³ bouillon.

Het lijkt mij, dat het volgen van de z.g.n. „HAMMERSCHMIDT-methode”, die op het voorbeeld van ANDERSON e.a. door vele latere onderzoekers is overgenomen, mede aanleiding genoemd kan worden van de zo wisselende en verschillende uitkomsten.

Volgens ANDERSON e.a. (1931) is gravis niet haemolytisch, terwijl mitis deze eigenschap wel zou bezitten. Volgens een latere mededeling uit Leeds van COOPER e.a. (1936), zouden van het gravis-type sommige stammen haemolyse geven, terwijl mitis dit gewoonlijk zou doen.

CARTER (1933) deelde mee, dat met een onderzoek van 12 gravis- en 142 mitis-stammen, slechts 82 van het mitis-type haemolyse gaven, de rest was negatief. Later deelde hij mee, dat van de 93 door hem onderzochte gravis-stammen geen enkele lysis gaf van menschenbloed, terwijl 14 dit in geringe mate ten opzichte van konijnenbloed deden. Hij komt tot de conclusie, dat de haemolyse slechts van geringe waarde is voor de typen-differentiëring en voor dit doel onnodig.

CHRISTISON (1934) heeft bij haar Berlijnse onderzoek nog een poging gedaan om met de „HAMMERSCHMIDT-methode” de haemolytische eigenschappen ten opzichte van verschillende bloedsoorten te gebruiken als kenmerk voor de drie typen. Zij vond echter verscheidene uitzonderingen op de door haar opgestelde regels. Aanvankelijk deelde zij mee, dat mitis vaak haemolyse gaf. Bij een later onderzoek, dat zij tezamen met HELEN WRIGHT in 1935 te Edinburg verrichtte, kreeg zij evenals in 1936 tot uitkomst, dat gravis en intermedius behoudens enkele uitzonderingen geen haemolyse gaven in tegenstelling met mitis.

SCHIFF en WERBER (1935), vonden bij mitis-stammen meestal een veel sterker haemolyse dan bij gravis.

Belangrijk, vooral met het oog op de critische beoordeling, zijn ook hier weer de onderzoeken van ROBINSON en MARSHALL (1934). Acht door hen onderzochte gravis-stammen uit Leeds bleken wel haemolytisch te zijn. In tegenstelling dus met de opinie van de Leedse school. Ongeveer een derde van de 197 door hem onderzochte gravis-stammen gaven haemolyse. Hiervan verloren 33 deze eigenschap bij verder voortkweken. Later bleek het ROBINSON (1934) bij zijn variatieproeven, dat haemolyse een zeer veranderlijke eigenschap was, zonder verband met de kolonievorm.

Ook STUART (1938) vond een sterke variatie in het haemolytische vermogen.

Alleen intermedius en zijn varianten gaven nooit of te nimmer haemolyse. Dit laatste negatieve feit is het enige, dat te midden van de algehele verwarring enige houvast geeft. Vrijwel allen, die over het haemolyse vraagstuk gewerkt hebben, CARTER, CHRISTISON en haar medewerkers, SCHIFF en WEBER, GUNDEL en TIETZ, COOPER e.a. ROBINSON en medewerkers, GREGORY, zijn het hierover eens. Alleen CHRISTISON vond in Berlijn en Edinburgh een paar uitzonderingen op de regel.

Enige eigen proeven over haemolyse.

Met de reeds genoemde zogenaamde HAMMERSCHMIDT-methode kreeg ik zeer wisselende en onzekere resultaten.

In hoofdzaak gebruikte ik buisjes met bouillon, waaraan 1 maal 24 uur tevoren 2 druppels gedefibrineerd geitebloed was toegevoegd. Gedurende dit etmaal hadden de buisjes in de broedstoof gestaan ter controle van de steriliteit. Als de buisjes dan geënt werden, was het bloed geheel uitgezakt. De resultaten met deze methode, die voor het cholera en El Tor-onderzoek steeds zo goed voldoet, waren voor het nagaan van de haemolytische eigenschappen van de diphtherie-bacil wisselend en onzeker, zowel met mensen-, geite- als konijnen bloed.

Tegen het einde van mijn onderzoek, na talrijke mislukkingen, ging ik er toe over de buisjes te enten, aanstonds nadat het bloed erbij was gedaan. De resultaten met deze methode waren zeer bevredigend. De onderzochte gravis- en mitis-stammen gaven alle na 1 maal 24 uur reeds haemolyse zowel met geite- als konijnenbloed. Met drie intermedius-stammen waren de uitkomsten nu zeer verrassend. Met konijnenbloed was de reactie na 1 maal 24 uur negatief, na 2 maal 24 uur positief en na 3 maal 24 uur sterk positief. Met geitebloed kwam de reactie eerst 1 maal 24 uur later.

Hieruit bleek dus, dat het intermedius-type wel degelijk over haemolytische eigenschappen beschikt, doch de werking op de rode bloedlichaampjes eerst later ontplooit. Dit kan samenhangen met de langzame groei van het intermedius-type in het algemeen. Wat de haemolyse betreft is er dus geen principiële verschil tussen intermedius en de beide andere typen.

Deze proeven zullen met een groot aantal stammen moeten worden herhaald.

Met bloedplaten waren de resultaten zeer onbevredigend, daar deze merendeels reeds bedorven waren, alvorens de haemolyse behoorlijk was waar te nemen.

§ 6. De groeiwijze in bouillon.

ANDERSON e.a. hebben aanvankelijk meegedeeld, dat de drie typen op verschillende wijze in bouillon groeiden.

Mitis veroorzaakte een gelijkmatige troebeling, intermedius en gravis lieten de bouillon helder met op de bodem van het buisje een korrelig depôt. Gravis groeide bovendien met een vliesje.

In 1936 geeft de school van McLEOD, (COOPER e.a.) de enigszins gewijzigde criteria aldus weer:

Gravis: a) Duidelijk vliesje en grof korrelig depôt. De bouillon blijft helder.

b) Minder duidelijk vliesje, grof korrelig depôt. De bouillon geheel troebel.

Intermedius: Fijne korrelige troebeling binnen 48 uur, die tot sedimenteren neigt. Nimmer overvloedige groei.

Mitis: Diffuse gelijkmatige troebeling, gewoonlijk rijkelijke groei en vaak later met een week vliesje.

De mening van de onderzoekers te Leeds heeft zich in de loop der jaren dus enigszins gewijzigd. Men kan niet zeggen, dat de criteria thans scherper omschreven zijn.

Over de betekenis van de groeiwijze in bouillon wordt door verschillende schrijvers zeer ongelijk geoordeeld.

Sommigen (CARTER, ROBINSON) hechten er meer of minder betekenis aan. Anderen (MURRAY, STUART, PERRY e.a. en WRIGHT en CHRISTISON) vinden een groot aantal uitzonderingen en een sterke variatie.

MURRAY vond dat verschillende serologische groepen van gravis ieder op hun eigen wijze in de bouillon groeiden. Ook STUART vond, dat een bepaalde serologisch gequalificeerde groep van het gravis-type in bouillon als het intermedius-type groeide.

In het algemeen geven de schrijvers niet aan, in welke soort bouillon zij de groei onderzochten, evenmin als het tijdstip van de beoordeling.

PERRY heeft de groei door verschillende van zijn medewerkers laten beoordelen en kwam tot de conclusie, dat de subjectieve beoordeling van den onderzoeker een grote rol speelt.

Zelf kreeg ik met Liebig- en paardevlees-bouillon bij dezelfde stammen zeer verschillende uitkomsten.

Enige malen heb ik een stam tegelijk in verschillende buisjes geënt en kreeg dan in ieder buisje een enigszins andere groeiwijze. Ook meende ik te moeten concluderen, dat de grootte van het inoculum van invloed was.

Ik heb dan ook de groeiwijze in de bouillon niet als hulpmiddel voor de typering in het onderzoek opgenomen.

§ 7. *De veranderingen in de waterstof-ionenconcentratie van bouillon als kweekgrond der typen.*

Het is een bekende eigenschap van de diphtheriebacil, groeiende in een aanvankelijk zwak alkalische bouillon, deze reactie eerst naar zuur te doen omslaan, om vervolgens weer een sterk alkalische reactie teweeg te brengen.

Reeds zeer vroeg is, in het bijzonder door THEOBALD SMITH, deze verandering van de reactie onderzocht. De ijver, waarmee deze kwestie door zo velen op zo uitvoerige wijze is nagegaan, vindt voornamelijk zijn oorzaak in het verband van deze verandering van de zuurgraad met de vorming van het toxine. Daarom werd al dadelijk nauwkeurig gelet op de glucose en de spiersuikers, die de bouillon zou kunnen bevatten. Hiermee begaf men zich op moeilijk terrein, daar de hoeveelheid spiersuikers, die het vlees bevat, waarvan de bouillon gemaakt wordt, zeer pleegt te variëren. Zo heeft ROSENBERGER (1908) bemerkt, dat inosiet niet aanwezig was in vers vlees, maar wel in vlees, dat enige tijd bewaard was.

Aangezien de vorming van veel zuur nadelig bleek voor de toxinevorming, heeft men getracht dit te ondervangen, door in de bouillon eerst *B. coli* te laten groeien. Voor de vorming van het toxine was dit een voordeel.

Het ligt voor de hand, dat ook de buffering van de bouillon een rol moet spelen bij de verandering van de waterstof-ionenconcentratie. Het bleek verder, dat verschillende peptonen zich onderscheiden in hun vermogen als buffer te fungeren. Alweer een onbekende factor in dit vraagstuk. Tevens bleek de concentratie van de pepton van belang.

Ook de schrijvers van de monographie van de MEDICAL RESEARCH COUNCIL zijn diep op deze kwestie ingegaan. Hun bleek, dat ook het oppervlak van belang is voor de omzetting. Wanneer de media in flesjes werden omgezet, die op hun kant lagen, veranderde de reactie veel sneller dan wanneer gewone cultuurbuizen werden gebruikt.

Een andere onzekere factor is gelegen in de graad, waarin zekere van de stikstofhoudende groepen worden omgezet in stikstofvrije organische zuren en de mate waarin deze laatsten weer worden omgezet in carbonaten. Ook is de waterstof-ionenconcentratie bij de aanvang van het experiment van belang gebleken voor het eindresultaat.

De schrijvers van de reeds eerder genoemde monographie vatten de oorzaken van de omzettingen als volgt samen:

- 1) De productie van organische zuren.
- 2) De vorming van ammonia.
- 3) De oxydatie van organische zuren tot carbonaten.

Zij slaagden er ten slotte in, zekere regels op te stellen voor de samenstelling van bouillon om tot een zo groot mogelijke toxine productie te geraken.

Beschouwt men al de genoemde factoren, dan moet men wel tot de conclusie komen, dat het vraagstuk van de verandering van de waterstof-ionenconcentratie door de groei van de diphtheriebacil in bouillon er een is met zeer vele onbekenden, die bovendien aan wisseling onderhevig zijn.

Het lijkt op het eerste gezicht weinig rationeel een bepaalde curve van de waterstof-ionenconcentratie te gebruiken voor de indeling van de diphtheriebacil in typen.

Toch hebben ANDERSON e.a. (1931) meegedeeld, dat gravis de bouillon in 2 dagen alkalisch maakte, terwijl mitis hiervoor 4 dagen nodig had. Over het gedrag van intermedius werd door hen, ook in hun latere publicatie, niets vermeld.

Zoals te verwachten was, verschillen de waarnemingen van de schrijvers, die deze kwestie onderzocht hebben, zeer.

ROBINSON vond bij intermedius geen omslag van de PH. Van de 127 door hem onderzochte gravis-stammen, gaven 31 eerst laat alkali-vorming, terwijl de 104 mitis-stammen alle hiermee laat waren. Hij vindt het een onbelangrijk criterium, afhankelijk van een aantal factoren, die moeilijk te controleren zijn.

Later deelde hij mee, dat voor 197 onderzochte gravisstammen de omslag een inconstant kenmerk was.

WRIGHT en CHRISTISON schrijven, dat ook met intermedius-stammen de reactie alkalisch wordt, als men de buisjes maar lang genoeg in de broedstoof laat staan. Hierin verschillen zij dus van mening met ROBINSON, die nooit een omslag zag zelfs niet na vier weken.

In Manchester werd echter „hormonebroth” gebruikt, terwijl de onderzoeksters te Edinburg „gewone” bouillon bezigden. Zeer zeker speelt ook de kwaliteit van het gebruikte glaswerk een rol.

WRIGHT en CHRISTISON zijn bovendien van oordeel, dat de grootte van het inoculum van invloed moet zijn op de resultaten. Voor een differentiëring tussen gravis en mitis is deze proef volgens hen ongeschikt. Bovendien maken zij melding van een uit Cyprus ontvangen intermedius-stam, die reeds na 5 dagen de bouillon alkalisch deed worden.

Ook WRIGHT en RANKIN (1932) vonden bij 2 van de 24 intermedius-stammen na 2 tot 3 dagen reeds alkali-vorming.

Na het bovenstaande behoeft het geen verder betoog, dat het werk van HETTICHE (1935), die de diphtheriebacil in zes typen verdeelde naar aanleiding van de mate van omslag, die zij in 1% saccharose-bouillon veroorzaakten, zeer kritisch moet worden bekeken. Te meer omdat door hem aan al de aan een dergelijk onderzoek verbonden bezwaren geen verdere aandacht wordt besteed; bovendien bepaalt hij de reactie door titratie, een methode, waarvoor reeds in de monographie van ANDREWES e.a. met grote nadruk wordt gewaarschuwd.

Bij wijze van proef heb ik van ieder type twee vertegenwoordigers genomen en deze in verschillende bouillonsoorten gekweekt. Om de eventuele invloed van een indicator op de groei te ontgaan, werd van iedere bouillonsoort en iedere stam een grote reeks buisjes van „Jenaglas” geënt, zodat steeds een afzonderlijk buisje kon worden gebruikt om de reactie met behulp van broomthymolblauw te controleren.

Met neutrale rundervlees-bouillon werd de reactie in alle buisjes reeds na één dag zuur. Na vijf weken was de reactie nog zuur, alleen 1 gravis vertoonde een alkalische reactie. Vermoedelijk is het aantal spiersuikers in deze bouillon zo groot geweest, dat de reactie al dadelijk te zeer naar de zure kant is omgeslagen, zodat een verdere groei van de diphtheriebacil onmogelijk was geworden.

Met neutrale vlees-bouillon, die eerst door *B. coli* was verteerd, werden andere resultaten verkregen; 1 gravis, de andere dan waarvan boven sprake was, vertoonde na vier dagen een alkalische reactie; de tweede gravis- en de beide mitis-stammen deden eerst na drie weken de PH omslaan, terwijl de beide intermedius-stammen na die tijd in het geheel geen verandering van de aanvankelijk zure reactie vertoonden.

Met neutrale Liebig-bouillon in buisjes, kwam bij 1 mitis-stam na vier dagen een alkalische reactie. Bij 1 gravis en 1 mitis gebeurde dit na één week. Bij 1 mitis na twee weken en bij de beide intermedius-stammen na vier weken.

Met neutrale Liebig-bouillon in kolfjes hadden 2 gravis en 1 mitis in 4 dagen, 1 mitis en 1 intermedius na 1 week en 1 intermedius na 2 weken een alkalische reactie veroorzaakt.

Na hetgeen in de literatuur over dit soort proefnemingen vermeld is en na mijn eigen weinig bemoedigende resultaten, achtte ik mij gerechtigd aan deze kwestie voor het differentiëren van de diphtherie-typen voorlopig geen verdere betekenis te hechten.

§ 8. De pathogeniteit van de drie typen voor het proefdier.

De meest kenmerkende eigenschap van de diphtheriebacil is uiteraard, dat hij in staat is bij de mens diphtherie te verwekken. Bij een experimentele infectie van de cavia volgt na één of meer dagen de dood. Bij de sectie worden in hoofdzaak de gezwollen en rode bij-nieren als pathognomisch beschouwd.

ROUX en YERSIN hebben ontdekt, dat de ziekteverschijnselen bij diphtherie veroorzaakt worden door een exotoxine. Zij hebben er de aandacht op gevestigd, dat men *toxiciteit* van *virulentie* dient te onderscheiden. Onder virulentie moet worden verstaan, het vermogen van de bacil zich in het lichaam van een levende dier te vermenigvuldigen ¹⁾. Zij meenden ten onrechte, dat de diphtheriebacil deze eigenschap niet bezat.

Verschillende pogingen zijn gedaan om het verschil tussen virulentie en toxiciteit te onderzoeken (o.a. door ARKWRIGHT). Hierbij werd door centrifugeren en uitwassen met zoutsolutie het bacteriële deel van een bouilloncultuur van het toxine bevattende deel gescheiden en van beide de minimale letale dosis bepaald. In het algemeen bleken virulentie en toxiciteit met elkaar te corresponderen. Een enkele maal werden echter uitzonderingen gevonden.

De schrijvers van de monographie van de MEDICAL RESEARCH COUNCIL hechten grote waarde aan het verschil tussen virulentie en toxiciteit. De vraag is echter of hieraan werkelijk die betekenis mag worden toegekend. Wanneer men de toxiciteit nagaat, beschouwt men uitsluitend het vermogen van de stam om in vitro toxine te vormen. Door de onderzoeken, in het bijzonder van TASMAN en VAN BRANDWIJK, is gebleken, welke moeilijkheden men moet overwinnen om enigszins zeker te zijn van een constante toxine productie in vitro. Het is dan ook bekend, dat toxineproductie in vitro en in vivo niet correleren.

Spuut men gewassen bacteriën in, dan rijst de vraag, welke de invloed van de zoutsolutie op levensvatbaarheid van deze organismen is. Eenmaal in het lichaam van het proefdier ingebracht, zullen de bacteriën dadelijk beginnen met toxine af te scheiden. Het is onder deze omstandigheden zeer de vraag of de dood van het proefdier in hoofdzaak op rekening komt van een snellere vermenigvuldiging in het lichaam.

¹⁾ Hoewel niet geheel terecht, wordt door de meeste schrijvers virulentie synoniem beschouwd met *invasie-vermogen*. Het laatste begrip duidt op het vermogen van de bacil om zich in het lichaam te verspreiden.

De pogingen om een streng onderscheid te maken tussen toxiciteit en virulentie stuiten op talrijke praktische bezwaren. Het lijkt dan ook wenselijker te spreken van *pathogeniteit*. Hierbij laat men in het midden, wat de oorzaak kan zijn. Men constateert alleen, dat de stam het vermogen heeft bij het proefdier pathologische veranderingen te verwekken. Voor de praktijk komt het in de eerste plaats hierop aan.

Voor het determineren van de diphtheriebacil is het verder van belang, dat een inspuiting met antitoxine bij een contrôle proefdier de pathologische afwijkingen voorkomt.

Alleen in dit laatste geval kan met volledige zekerheid gezegd worden, dat men met een pathogene diphtheriebacil te doen heeft.

Een negatieve reactie bij de cavia zegt echter nog niet, dat de stam apathogeen is. PERRY e.a. vonden herhaalde malen zeer verschillende reacties, wanneer één stam achtereenvolgens bij verschillende cavia's werd ingespoten. Bij mijn eigen onderzoek heb ik enige malen hetzelfde kunnen constateren.

In verband hiermee kan nog gewezen worden op de onderzoekingen van KING en MENTEN (1935), die aantoonde, dat cavia's die onvoldoende vitamine C kregen, zonder daarbij scorbuut te vertonen, na inspuiting met toxine ongeveer de helft korter te leven hadden, dan de dieren, die een beschermende hoeveelheid vitamine C in voorraad hadden. De locale haemorrhagie en de necrose waren bij de cavia's, die een gebrek aan vitamine C hadden, duidelijker gemarkeerd.

Een negatieve pathogeniteitsproef bij de cavia zegt dus niet met volledige zekerheid, dat de stam apathogeen is. Toch zijn de moeilijkheden in hoofdzaak theoretisch. In de praktijk ontmoet men weinig bezwaren. Volgens de schrijvers van de monographie van de MEDICAL RESEARCH COUNCIL zijn de voorbeelden van voor de cavia apathogene bacillen, afkomstig van mensen lijdende aan diphtherie, hoogst ongewoon; een dergelijke vondst kan zijn oorzaak vinden in de toevallige isolatie van een niet pathogene variëteit. Pathogene bacillen kunnen dan daarnaast aanwezig zijn. De toevallige isolatie van een niet pathogene kolonie kan oorzaak zijn van een foutieve diagnose.

Men mag op grond van apathogeniteit niet zeggen, dat de te onderzoeken stam geen diphtherie bacil is. Na de talrijke onderzoekingen, die hierover ook in ons land door VAN RIEMSDIJK (1915) gedaan zijn, behoeft dit geen nader betoog. Aan het bestaan van apathogene stammen, die toch tot de soort *Corynebacterium diphtheriae* behoren, wordt tegenwoordig door niemand meer getwijfeld. Het is voldoende

bekend, dat een pathogene diphtherie bacil deze eigenschap kan verliezen.

Zoals reeds gezegd, moet de aandacht van de onderzoeker er op gevestigd blijven, dat in de groep van de diphtheroiden ook enkele species voorkomen, zoals *Corynebacterium pyogenes* en *Corynebacterium ovis*, die voor de cavia pathogeen kunnen zijn. De laesies verschillen dan echter van de door diphtheriebacil veroorzaakte, terwijl een injectie met antiserum niet voorbehoedend werkt. In de praktijk zal men van deze „diphtheroiden”, vooral als de herkomst bekend is, weinig moeilijkheden ondervinden.

a. De techniek van het onderzoek.

Het eenvoudigste pathogeniteitsonderzoek geschiedt door een suspensie van de primaire gemengde cultuur op LOEFFLER-serum, subcutaan bij de cavia in te spuiten. Bij de sectie wordt dan nagegaan of de voor diphtheriebacil typische veranderingen zijn opgetreden. Op dezelfde manier kan ook intracutaan worden ingespoten. Hierbij zou men minder last hebben van andere bacteriën. Vooral BULL en MC. KEE (1923) zijn zeer tevreden over deze methode, die overigens om begrijpelijke redenen door weinig bacteriologen wordt gevolgd. Mogelijk is hij te gebruiken voor practisch laboratoriumwerk, voor een wetenschappelijk onderzoek is deze „ruwe methode” uiteraard ongeschikt. Natuurlijk moet hier steeds gebruik gemaakt worden van een contrôle cavia, die met serum is ingespoten.

Oorspronkelijk werd het pathogeniteitsonderzoek met zuivere cultures van de diphtheriebacil als volgt uitgevoerd:

Een deel van een bouilloncultuur werd intramusculair, intraperitoneaal of subcutaan ingespoten, waarna men afwachtte of het proefdier, meestal een cavia, al of niet na een vastgestelde tijd stierf. Deze methode had voor de praktijk het grote nadeel van zeer on-economisch te zijn.

RÖMER (1909) werkte een techniek uit, die veel minder proefdieren vereiste, daar de verschillende stammen op deze wijze bij één cavia konden worden onderzocht. Door intracutane injecties van diphtherietoxine verkreeg hij met 1/25 tot 1/500 van de dosis, die anders nodig was om door subcutane inspuiting een cavia te doden, zeer duidelijke en typische laesies (zwellen en roodheid). Grotere doses gaven een locale necrose. De contrôleproef was aanvankelijk zo ingericht, dat een mengsel van een kleine hoeveelheid van het toxine met een weinig antitoxine, bij hetzelfde dier op dezelfde plaats werd ingespoten.

ZINGHER en SOLETSKY (1915) voerden de methode in, waar bij een

afzonderlijke contrôlecavia 24 uur van te voren 0.5 c.M^3 antitoxine (500 E.H. per c.M^3) intraperitoneaal was ingespoten. Voor spoedgevallen bevalen zij de methode aan, waarbij tegelijkertijd met de intracutane injectie het antiserum intracardiaal gegeven werd. Bij beide cavia's werd door hen vervolgens 0.15 c.M^3 van de bouilloncultuur intracutaan ingespoten. Vier tot zes stammen konden op deze wijze met behulp van één cavia op hun pathogeniteit worden onderzocht. Pathogene stammen veroorzaakten roodheid en necrose bij de niet door antitoxine beschermde cavia. De resultaten werden na één, twee en drie etmalen gecontrôleerd. Zij deelden verder mede, dat in zestig gevallen dezelfde uitkomsten werden verkregen als met de subcutane methode. Volgens GLENNY en LLEWELLYN-JONES (1931) verdient de intracutane methode zelfs de voorkeur boven de subcutane.

In navolging van de school van NEISSER werden voor de intracutane injectie na 1913 veelal suspensies gebruikt in plaats van bouilloncultures. Zij maakten deze suspensies in bouillon en niet in zoutoplossing, zoals later veelal gedaan werd.

EAGLETON en BAXTER (1921) voerden de volgende modificaties in:

1) Standardering van de suspensie, zodat deze steeds ongeveer 50 miljoen bacteriën per c.M^3 bevatte. Dit heeft weinig navolging gevonden.

2) Het bijvoegen van een bekende pathogene stam als contrôle. Deze modificatie van de gebruikelijke techniek leek ook bij mijn eigen onderzoek van groot belang. Een enkele maal werden namelijk cavia's gebruikt, die door een individuele immuniteit geen reactie vertoonden. Over cavia's, die zelfs voor zeer virulente stammen resistent zijn, is meer dan eens geschreven.¹⁾

Voor de practijk leiden deze ervaringen tot de consequentie, dat, indien op één cavia alle stammen negatief zijn, de proef herhaald moet worden met toevoeging van een bekende pathogene stam. Men mag anders niet besluiten, dat de te onderzoeken stammen avirulent zijn. *Zo mogelijk ente men op iedere cavia tevens een stam van bekende pathogeniteit.*

Schrijver zag ook, evenals PERRY e.a., dat één stam binnen een kort tijdsbestek bij verschillende cavia's alle gradaties van reactie vertoonde. Hieruit volgt noodzakelijkerwijs, dat indien men een vergelijkend onderzoek wil verrichten tussen de pathogeniteit van gravis, mitis en intermedius, met het individuele reactievermogen van de proefdieren rekening moet worden gehouden. Trouwens bij de

ijking van het antitoxine is eveneens gebleken, dat een vergelijking slechts dan waarde heeft, wanneer een groot aantal proefdieren gebruikt worden.

3) Een andere door EAGLETON en BAXTER ingevoerde verandering in de methodiek, is vooral in Engeland veel nagevolgd. Hierbij wordt een zogenaamde „volgende dosis” antitoxine geïnjecteerd. De bedoeling is op deze manier het leven van het proefdier te redden en een ontijdige dood te voorkomen, zonder dat de huidreacties er door verminderen.

Aan deze werkwijze heb ik bij mijn onderzoek nimmer behoefte gevoeld. Indien men er zorgvuldig voor waakt, dat de injectie steeds zuiver intracutaan plaats vindt, overleven practisch alle cavia's het experiment. Zelfs een viertal zeer virulente gravis-stammen op de buikhuid van een kleine cavia geïnjecteerd, hadden de dood niet tengevolge. Zodra bij het inspuiten de weerstand, die men bij een intracutane injectie voelt, ook maar even vermindert, dient men de naald terug te trekken en elders te injecteren. Slechts éénmaal, bij de talrijke pathogeniteitsproeven, stierf een cavia vóór de tweede dag. (Hier was dan ook bij vergissing subcutaan ingespoten). Het verdient verder aanbeveling, het fijnste nummer naalden te gebruiken en deze voor het gebruik op een nat amaril steentje te slijpen. De naald is slechts dan geschikt voor de injectie, wanneer hij glad en zonder moeite door de opperhuid van de eigen vinger heen gaat. Door deze kleine maatregelen is de methodiek van de „volgende dosis” te vermijden. De daaraan verbonden moeilijkheid, dat men alle negatieve stammen nog eens over moet doen op cavia's, die deze volgende dosis niet gekregen hebben, is dan te ontgaan.

Bij de door schrijver uitgevoerde pathogeniteitsproeven werd nog gebruik gemaakt van een kleine wijziging in de gebruikelijke methodiek.

Het bleek namelijk, dat het inspuiten van suspensies in fysiologische zoutoplossing nadelen met zich meebracht, daar op de pathogeniteit van de bacteriën hierdoor een ongunstige invloed werd uitgeoefend. Bij één cavia werden tegelijk intracutaan ingespoten:

1) een suspensie, in fysiologische zoutoplossing, die enige uren had gestaan.

2) een vers bereide suspensie in fysiologische zoutoplossing.

3) Een vers bereide suspensie in bouillon.

4) Een 24 uur oude cultuur in bloed-bouillon.

Bij deze proef, die enige malen herhaald is, bleek, dat de suspensie in fysiologische zoutoplossing, de kleinste reactie, of een

¹⁾ Zie ook het vermelde op blz. 40.

negatieve uitkomst gaf. Het staan had bovendien nog een ongunstige invloed.

Een suspensie in bouillon gaf bijna steeds een betere reactie. De reactie van de 24 uur-oude bloed-bouillon-cultuur was echter van alle het duidelijkst. Bij mijn pathogeniteitsproeven is deze laatste methode in hoofdzaak gebezigd.

Het zij nog opgemerkt, dat men in de praktijk, als de laesies typisch zijn, de proef met de contrôle cavia vaak achterwege zal kunnen laten.

b. Verschillen in pathogeniteit.

Iets wat in vrijwel ieder artikel, dat men over dit onderwerp ter hand neemt, opvalt, is het uiterst geringe aantal apathogene gravis- en intermedius-stammen, dat in de loop der jaren gevonden is. Van het mitis-type zijn daarentegen een groot aantal stammen gevonden, die bij cavia geen enkel ziekteverschijnsel veroorzaakten. COOPER e.a. zijn zo overtuigd van de pathogeniteit van het gravis-type, dat zij een cavia-proef voor dergelijke stammen overbodig achten. Het lijkt mij, dat men hiermee voorzichtig moet zijn, daar er ook door de Leedse onderzoekers uitzonderingen op de regel gevonden zijn. Volgens het onderzoek van WRIGHT en CHRISTISON hebben zich in Edinburg verscheiden apathogene gravis-stammen verspreid. GREGORY (Zuid-Afrika) is eigenlijk de enige, die een belangrijk percentage apathogene intermedius-stammen gevonden heeft. Zoals reeds gezegd, is het aantal apathogene mitis-stammen zeer groot. Men mag dus wel tot de slotsom komen, dat vertegenwoordigers van het mitis-type gemakkelijker hun pathogeniteit verliezen, dan gravis- of intermedius-stammen.

De meeste schrijvers zijn het er over eens, dat de aard van het geproduceerde toxine van de drie typen gelijk is. Steeds gelukte het bij het proefdier het toxine met behulp van het gewone antitoxine (meestal vervaardigd met behulp van de stam P.W. 8) te neutraliseren.

Volgens sommige schrijvers zouden enkele mitis-stammen in vitro meer toxine vormen, dan gravis en intermedius. De proeven kunnen echter de toets der critiek niet doorstaan. Mogelijk, dat in de toekomst met de door TASMAN en VAN BRANDWIJK beschreven techniek, op dit punt overtuigender resultaten te verkrijgen zijn.

ANDERSON e.a. (1931) hebben aanvankelijk nog een poging gedaan de graad van de reactie na intracutane injectie van mitis-, gravis- en intermedius-stammen met elkaar te vergelijken. Duidelijke verschillen werden hierbij niet verkregen. Sommige mitis-stammen gaven een zeer duidelijke reactie, sommige gravis-stammen slechts een geringe. Het bleek ook, dat de heftigheid van de reactie bij de cavia in het geheel

niet samenging met de ernst van het ziektegeval, waarvan de stam afkomstig was.

Door sommige schrijvers is nog geëxperimenteerd over het invasievermogen van de drie typen. POVITSKY e.a. (1933) vonden, dat men van gravis-stammen minder bacteriën nodig heeft om de cavia te doden, dan van de andere beide typen. Gaf hij enkele uren na de injectie met de pathogene organismen een dosis antiserum, dan was de met mitis geïnfecteerde cavia nog te redden, de met gravis ingespoten ging echter dood. LEETE e.a. (1933) maakten hieruit de conclusie, dat gravis het lichaam van het proefdier sneller invadeert en dat hierop een vlugge absorptie en fixatie van het toxine volgt. Zij concludeerden bovendien, dat gravis voor het konijn gevaarlijker was dan mitis; een waarneming, die door MURRAY is bevestigd.

ROBINSON en MARSHALL injecteerden bij de cavia subcutaan een groot aantal stammen van de verschillende typen. Na de dood van de dieren konden zij bij gravis en intermedius uit het hartebloed in een veel groter percentage der gevallen de bacil terug kweken dan bij mitis.

GUNDEL en ERZIN (1936) verkregen overeenkomstige resultaten. Zij toonden bovendien aan, dat mitis veel minder snel in de organen was aan te tonen.

Daar GUNDEL en ERZIN in een bepaald aantal gevallen de bacillen van de tonsillen terug konden kweken, wilden zij de diphtherie opvatten als een bacteriaemie, waarbij de bacillen secundair op de tonsillen zouden worden uitgescheiden. CLAUBERG nam terecht stelling tegen deze opvatting. Hij wees er op, dat de bacteriaemie het gevolg is van de subcutane inspuiting. Bij infectie van de vagina bleek niets van dit alles. Ook moet worden verhinderd, dat de dieren de plaats van inenting aflikken.

Uit de proeven, die tot nu toe zijn gedaan, kan met enige mate van waarschijnlijkheid de conclusie worden getrokken, dat gravis en intermedius zich sneller in het lichaam van de cavia vermenigvuldigen en verspreiden dan mitis.

De aandacht moet nog even gevestigd worden op proeven van DRIMITRYEVIC e.a. (1937). Deze onderzoekers vonden, dat de bergmuis in grote mate resistent was tegen infecties met vertegenwoordigers van het intermedius-type. Indien deze proeven zouden kunnen worden bevestigd, zou men hier een soortgelijk verschijnsel hebben gevonden als bij het pathogeniteitsverschil van de humane en bovine tuberkelbacil.

HOOFDSTUK III.

NEDERLANDSE STAMMEN, NAAR HUN TYPE BEPAALD.

§ 1. *Overzicht van het materiaal.*

Zoals reeds in hoofdstuk I is gezegd, lag het in de bedoeling na te gaan, of ook de in enkele plaatsen in Nederland gevonden diphtherie-stammen in, de door de Leedse onderzoekers ontdekte typen *gravis*, *mitis* en *intermedius*, waren te verdelen.

In het geheel zijn 164 stammen onderzocht en getypeerd. Hiervan zijn mij 6 gezonden door Prof. McLEOD te Leeds. Het was dus mogelijk mijn eigen stammen met die van de Engelse ontdekkers te vergelijken, waardoor een basis voor het onderzoek werd verkregen.

Uit Amsterdam kreeg ik dank zij Dr. A. CH. RUYS, de beschikking over 90 stammen, afkomstig van 19 patiënten en 39 bacillendragers.

Uit Rotterdam werden mij door Dr. L. E. DEN DOOREN DE JONG 63 stammen gezonden, afkomstig van 56 patiënten.

Uit Groningen ontving ik van Prof. G. KAPSENBERG, 5 stammen, afkomstig van 4 patiënten en 1 bacillendrager.

Deze stammen worden in §§ 5, 6, 7, 8 en 9 van dit hoofdstuk beschreven.

§ 2. *Superisolatie.*

Dank zij de illuminator van MURRAY was het mogelijk de kolonievormen op veel nauwkeuriger wijze waar te nemen. In het bijzonder voor de diagnostiek van de diphtherie-typen bleek het toestel een grote aanwinst te zijn. Doordat het echter mogelijk was kleine verschillen in de kolonievormen, die anders misschien over het hoofd waren gezien, op duidelijke wijze vast te leggen, deden zich in den beginne enige moeilijkheden voor. Van de eerste twintig Amsterdamse mitis-stammen kwamen vele geheel overeen met de door MURRAY gepubliceerde foto's. De kolonievorm bestond in die gevallen uit een „smooth” bolletje met een fijn randje. Zowel in het bolletje als het randje werden de lichtjes helder gereflecteerd. Andere stammen daarentegen, die overigens alle eigenschappen van het mitis-type hadden, vertoonden enige fijne maar duidelijke afwijkingen van de standaard-vorm. Ook MURRAY had dergelijke kleine verschillen

bij stammen, die tot hetzelfde type behoorden, waargenomen. Hij stelde daarom zelfs een verdeling in „sub-groepen” voor.

De mededeling van MURRAY, dat deze verschillen gedeeltelijk afhankelijk waren van de dichtheid van de groei, kon spoedig worden bevestigd. Zo was bij de stam „Amsterdam I”, behorende tot het mitis-type, in het centrum van sommige kolonies, al naar gelang van de dichtheid, waarin deze bij elkaar lagen, een fijne glinsterende korreling waar te nemen (fig. 8). Dit verschijnsel werd weer gezien bij de stam „Amsterdam XII”. Bij navraag bleek, dat beide stammen van denzelfden patiënt afkomstig waren.

Twee andere stammen vertoonden, slechts bij enkele kolonies, de voor mitis zo kenmerkende heldere lichtjes. De meesten veroorzaakten meer matte driehoekige reflexen, zodat het gehele beeld meer overeenkwam met de door MURRAY gepubliceerde foto van het gravis-type „sub-groep 2b”. Stijfsel en glycogeen werden echter niet omgezet. Het was dus onwaarschijnlijk, dat de beide stammen, die afkomstig bleken te zijn van een moeder en een zoon, die tegelijk diphtherie hadden, tot het gravis-type behoorden.

De stam „Amsterdam XXXI”, bracht mij echter in nog groter verlegenheid. Deze stam vertoonde kolonies, die geheel overeenkwamen met de standaardvorm van het mitis-type (fig. 5). Stijfsel en glycogeen werden echter wel vergist. Biochemisch had deze cultuur dus de eigenschappen van het gravis-type.

Na deze aanvankelijk ondervonden moeilijkheden vroeg ik mij af, of er niet te veel atypische stammen gevonden werden, om de door de Leedse onderzoekers gebezigde indeling te kunnen aanvaarden. Ook moest worden overwogen, om evenals MURRAY en WRIGHT en CHRISTISON, nieuwe typen of „sub-groepen” in te voeren. Een dergelijke onderverdeling zou echter grote verwarring ten gevolge hebben gehad. In dat geval ware het beter geweest, het werk van ANDERSON e.a. als onbruikbaar te beschouwen.

Dank zij een persoonlijke mededeling van Dr. CHARLOTTE RUYS, over haar ervaringen met „rough” en „smooth” kolonies van de dysenteriebacil, verkreeg ik een oplossing van de moeilijkheden. Zij beval mij een sterke isolatie van de kolonies aan.

Gemakshalve werd de term „superisolatie” ingevoerd. Een kolonie mag eerst dan „supergeïsoleerd” heten, indien ten eerste niet meer dan vijf, hoogstens tien kolonies op één plaat voorkomen en indien ten tweede om de kolonie heen, in een straal van anderhalve centimeter, geen andere kolonies gegroeid zijn. ¹⁾

¹⁾ Het gelukte bijna altijd, supergeïsoleerde kolonies te verkrijgen, door steeds weer uitgegloeide spatels op achtereenvolgens drie platen af te vegen.

De beschouwing van de supergeïsoleerde kolonies was bijzonder verrassend. In de eerste plaats bleken de supergeïsoleerde *mitis*-kolonies niet meer aan de steeds gegeven beschrijving te voldoen (fig. 3). Zij waren niet meer bolvormig („dome-shaped”) en glanzend, maar platter en licht „gematteerd”. Zij vormden een zuiver rond plateau met het reeds eerder beschreven heel fijne randje, dat voor *mitis* steeds zo kenmerkend is. Ieder lichtje werd ook hier tweemaal weerspiegeld, eenmaal door de rand van het plateau (echter niet zo glashelder als bij de niet supergeïsoleerde kolonies), en eenmaal door het fijne randje, dat de gehele kolonie omgeeft. De kleur van de kolonies, die anders vaak iets grijsigs had, werd pikzwart. Verder viel op, dat de supergeïsoleerde kolonies veel groter waren, hetgeen uit de foto's, die allen met dezelfde vergroting genomen zijn, duidelijk blijkt.

Voor het praktische onderzoek was de superisolatie van bijzonder belang. Het bleek, dat alle *mitis*-stammen, die de genoemde kleine verschillen in kolonievorm vertoonden, in supergeïsoleerde toestand gelijk waren. Deze vorm was weer geheel identiek met die van de Engelse *mitis*-stammen verkregen supergeïsoleerde kolonies. Zo werd bij het latere onderzoek nog een Amsterdamse stam gevonden, die op het eerste gezicht een mengvorm van *mitis* en *intermedius* leek. Beide vormen werden afgeënt en supergeïsoleerd, waarna bleek, dat alle supergeïsoleerde kolonies een, zij het wel wat kleine, maar duidelijke *mitis*-vorm hadden.

Na deze werkwijze te hebben ingevoerd, werd geen behoefte meer gevoeld het *mitis*-type verder onder te verdelen of te splitsen in andere typen. De beschreven afwijkingen bij een bepaalde concentratie van de kolonies, moeten als een individuele eigenschap van bepaalde clonen worden beschouwd. Voor de typering hebben zij geen belang.

De supergeïsoleerde kolonies van het *gravis*-type bleken in principe weinig af te wijken van de door ANDERSON e.a. beschreven madeliefjes-vorm. Zij waren alleen aanzienlijk groter en van een veel grilliger gedaante (fig. 2). Eenmaal werd een merkwaardige waarneming gedaan; op één plaat kwamen namelijk twee supergeïsoleerde kolonies voor, afkomstig van dezelfde Engelse *gravis*-stam. De ene had de zo juist beschreven typische vorm, de andere daarentegen was geheel plat, met een grillige sterk radiaal gekerfde rand en veel zwarter van kleur. Beide kolonies werden afgeënt en verder gekweekt. De twee verkregen cultures bleken echter geheel identiek. Beide gaven weer de klassieke *gravis*-vorm.

De methodiek van de superisolatie bleek ook van bijzonder belang voor de identificatie van de reeds genoemde stam „Amsterdam XXXI”,

die *mitis*-kolonies vertoonde (fig. 5) maar de biochemische eigenschappen van het *gravis*-type had. Bij een wat sterkere isolatie van de kolonies kwam reeds een voor het *mitis*-type hoogst ongewone aanduiding van radiaire groeven voor de dag (fig. 6). De supergeïsoleerde kolonies bleken op het *gravis*-type te gelijken en deden niet meer aan de *mitis*-vorm denken (fig. 7). Wel waren er nog enige individuele verschillen, maar de ruwe kolonies met hun radiaire structuur en onregelmatige rand voldeden toch aan alle eisen, die men aan een kolonie van het *gravis*-type mag stellen.¹⁾

De vormen van *intermedius* bleken in principe niet veel te verschillen van de reeds vroeger beschreven gedaante. Ook bij superisolatie ziet men de platte veel kleinere kolonies met een soms ietwat gekartelde rand (fig. 4). De lampjes van de illuminator worden in het geheel niet, of als een ineenslopend cirkeltje om de rand van de kolonie weerspiegeld. Vooral bij het gebruik van de GUNDEL-agar, was menigmaal superisolatie noodzakelijk om *mitis* van het *intermedius* type met zekerheid te kunnen onderscheiden. (fig. 9 en fig. 10).

Behalve voor de typering van sommige stammen bleek de methodiek van de superisolatie zijn betekenis te hebben bij het veranderlijkheids-onderzoek. De onjuiste interpretatie van enkele gevallen van schijnbare veranderlijkheid kon op deze wijze worden voorkomen. (zie bldz. 63).

Er werd nog een bescheiden poging gedaan, iets naders te onderzoeken over de invloed, die de kolonies onderling op elkaar uitoefenen. Hiertoe werden 1 maal 24 uur oude *gravis*-kolonies van gelijke grootte en in ongeveer gelijke „kolonie-concentratie” gegroeid, door middel van een glazen manchetje met een stukje van de voedingsbodem uitgesneden. Op deze wijze werden kleine ronde voedingsbodempjes verkregen met een kleine *gravis*-kolonie erop. Deze voedingsbodempjes werden overgebracht naar andere platen, die in tweeën waren verdeeld. Op één helft was een eveneens 1 maal 24 uur oude, brede *gravis*-cultuur gegroeid. Uit beide helften was eveneens een stuk voedingsbodem uitgesneden van gelijke grootte of groter dan het over te brengen voedingsbodempje. Hierbij bleek na nog eens 1 maal 24 uur het volgende:

a) Hoe groter het voedingsbodempje, hoe groter de kolonie (fig. 11 en fig. 12).

b) Indien het voedingsbodempje niet in contact gebracht was met de omgevende agar, dan was het van geen betekenis voor

¹⁾ Een stam met gelijke eigenschappen is door CARTER (1936) beschreven.

de toekomstige grootte van de kolonie, of deze al of niet temidden van maagdelijke agar groeide.

c) Indien het voedingsbodempje wel in contact gebracht was met de omgevende agar, dan werd de groei van de kolonie temidden van de dik gegroeide cultuur vrijwel geheel belemmerd. De kolonie op het voedingsbodempje, dat in contact met de maagdelijke agar gebracht was, groeide ongestoord uit (fig. 13).

In de storende invloed, die de kolonies op elkaar uitoefenen, schuilt dus niets geheimzinnigs. Het tot zijn beschikking hebben van een zo groot mogelijke hoeveelheid voedingsstoffen en het de afwezigheid van dissimilatieproducten, die blijkbaar op grote afstand in de voedingsbodem diffunderen, zijn de factoren voor een zo gunstig mogelijke groei.

In dit verband moet zeker de aandacht gevestigd worden op de fraaie onderzoeken van CRUICKSHANK (1934), die met behulp van lichtende organismen de groeifactoren naging. De lichtproductie, die fotografisch werd opgenomen, nam hij als maatstaf voor de metabolische activiteit. Het bleek, dat de diffundeerbare voedselbestanddelen in de buurt van de kolonies spoedig waren verbruikt en dat over een grote afstand aan de agar voedselbestanddelen werden onttrokken. Indien in het centrum van concentrische cirkels van kolonies, die niet meer lichtten, nieuwe agar werd gebracht, dan begon het lichten opnieuw. Deze waarneming wees erop, dat niet zozeer de dissimilatie-producten, dan wel het gebrek aan voedingsstoffen nadelig werkte op de verdere groei.

Enige tijd, nadat mijn onderzoek geëindigd was, publiceerde KOBLMUELLER (1936) een onderzoek, waarbij eveneens met een „Agar-insel” was geëxperimenteerd. Op grond van het feit, dat de kolonies op een „Agar-insel” zo veel kleiner bleven, dan op een gewone voedingsbodem, kwam hij tot de conclusie, „dass allein die durch die Lebenstätigkeit der Kolonie selbst hervorgerufene Nährbodenverschlechterung das Aufhören des Koloniewachstums bewirkt.

Uit mijn eigen proeven bleek echter, dat de *dissimilatie-producten van een omgevende cultuur wel degelijk, evenals een tekort aan voedingsstoffen, nadelig werken op de ontwikkeling van de kolonies.*

§ 3. De typen op Liebig-bouillon-agar.

In 1924 publiceerde HAMMERSCHMIDT een artikel getiteld „Gruppenbildung bei den Diphtheriebazillen”. Hierin beschreef hij, hoe door verschillen in haemolytisch vermogen zuur- en alkali-vorming in

bouillon, serologische eigenschappen en vooral door een duidelijk onderscheid in kolonievorm op bouillon-agar, 50 door hem onderzochte stammen in 5 groepen waren te verdelen. Drie van deze groepen waren duidelijk omschreven en kwamen, althans wat de kolonievorm betrof, overeen met de later door de Leedse school gevonden mitis-, gravis- en intermedius-typen. Behalve deze drie vond hij echter nog twee gemengde groepen, waarin bijna de helft van de door hem onderzochte stammen moest worden ondergebracht. Deze stammen vertoonden op bouillon-agar twee of drie van de beschreven kolonievormen door elkaar. Een splitsing door middel van één-celcultures, gelukte hem niet. Steeds viel de geïsoleerde stam op agar weer in zijn componenten uiteen.

In 1935 onderzocht hij weer 50 stammen. Hiervan behoorden 11 tot zijn type C (intermedius). Alle anderen waren gemengde vormen. Hiervan behoorden 38 tot zijn type B (gravis) en C en 1 tot zijn type A (mitis) en C. Hij ging weer uit van één-celcultures, maar vond bij verdere passages steeds weer, dat A splitste in A en C en B in B en C. Alleen C bleef constant. Op kwalitatief betere voedingsbodems was deze splitsing van de typen niet te zien. Op grond van zijn waarnemingen bestreed HAMMERSCHMIDT de juistheid van de beweringen van de Engelse onderzoekers. Voor de leer van de bacteriële veranderlijkheid leken mij zijn beschouwingen van principiële betekenis. Om deze redenen heb ik met een aantal stammen van verschillend type, waaronder ook de Engelse, de kolonievorm op gewone Liebig-bouillon-agar onderzocht.

Met gravis- en mitis-stammen deed ik dezelfde waarnemingen als HAMMERSCHMIDT. Het bleek, dat het gravis-type, op bouillon-agar geënt, twee kolonievormen opleverde. Namelijk een klein aantal van de klassieke „daisy-head”-vorm en bovendien zeer veel bijzonder kleine kolonies, die als kristalletjes op de voedingsbodem lagen en geheel met de door HAMMERSCHMIDT in 1935 gepubliceerde foto van zijn C-type overeen kwamen. Werden van iedere vorm geïsoleerde kolonies op LOEFFLER-serum overgeënt en vervolgens na 1 maal 24 uur weer op bouillon-agar uitgestreken, dan vertoonde iedere stam weer beide vormen. In figuur 14 zijn beide kolonievormen te zien. De „daisy-head”-vorm is juist aan de rand van de uitgespatelde streep tot ontwikkeling gekomen. Het deel, dat op de steriel gebleven agar gegroeid is, heeft zich goed kunnen ontwikkelen. De andere helft van de kolonie is door de kristalvormige kolonies in zijn groei belemmerd. Indien beide vormen na een passage op LOEFFLER-serum op de voedingsbodem van McLEOD werden uitgestreken, dan vertoonden

zij beide de classieke gravis-vorm. Geen enkel verschil was er dan tussen de gesplitste stammen te zien.

Met mitis-stammen deed ik geheel dezelfde ervaringen op.

Het onderzoek van intermedius-stammen bracht echter de oplossing van het vraagstuk. Eén stam vertoonde inderdaad alleen de C-vorm van HAMMERSCHMIDT. Een andere daarentegen, die blijkbaar over meer groeikracht beschikte, gaf, behalve de C-vorm ook kolonies te zien, die volkomen gelijk waren aan de gewone intermedius-vorm.

Alle drie de typen vertoonden dus bij mijn onderzoek op gewone bouillon-agar de hun eigen kolonievormen, welke vrijwel geheel identiek waren met de op McLEOD-agar gegroeide kolonies. Behalve deze werden van ieder type nog de kleine kristalvormige kolonies verkregen. Deze kristalvormige kolonies moeten als een involutievorm worden opgevat van bacteriën, die toevallig niet over voldoende groeikracht beschikken om onder gebrekkige omstandigheden tot normale kolonies uit te groeien. Deze involutievorm hebben alle typen gemeen. Als een uiting van splitsing van de typen kan hij niet worden opgevat. Dank zij de door HAMMERSCHMIDT gepubliceerde foto weten we nu, dat hij ten onrechte deze involutievorm als de vorm van het intermedius-type heeft beschouwd.

CLAUBERG, HELMREICH en VIERTHALER (1936) namen op bouillon-agar hetzelfde waar. Zij kwamen tot de conclusie, dat de „Splitterform” als een groeivariant moest worden opgevat.

Een groot aantal stammen heb ik op bouillon-agar onderzocht om na te gaan of deze voedingsbodem geschikt was voor de typering van de diphtheriebacil. Menigmaal gelukte het goede kolonievormen te verkrijgen. Te vaak echter was het beeld onduidelijk en de groei slecht, zodat deze eenvoudige voedingsbodem ongeschikt is om er het type van de diphtheriebacil mee te bepalen.

§ 4. Vergelijking van de kweekgronden van McLeod en Gundel.

Zoals reeds in Hoofdstuk II is gezegd, zijn ongeveer 300 McLEOD- en GUNDEL-platen met elkaar vergeleken. Hoewel de GUNDEL-agar in zeer vele gevallen te gebruiken is en goede resultaten oplevert, is deze toch niet zo goed als het medium van McLEOD. Speciaal intermedius-kolonies waren op de Engelse „chocolade-agar” beter van mitis te onderscheiden (fig. 9). De stam „Amsterdam XXXI” zou alleen met behulp van GUNDEL-agar niet met zekerheid als een gravis-stam herkend zijn. Ook bij het veranderlijkheidsonderzoek waren de resultaten met de voedingsbodem van McLEOD beter. (Zie Hoofdstuk IV, § 2.)

§ 5. De Engelse stammen.

Door Prof. J. W. McLEOD werden mij de volgende stammen gezonden:

1) CORK 181. Deze gravis-stam was kort voor de verzending in Cork, Ierland geïsoleerd.

2) N.S. 16. Deze gravis-stam was drie jaar voor de verzending in Leeds geïsoleerd.

3) AGAR. Deze mitis-stam was kort voor de verzending in Leeds geïsoleerd.

4) N.S. 29. Deze mitis-stam was drie jaar voor de verzending in Leeds geïsoleerd.

5) MARY HINES. Deze intermedius-stam was kort voor de verzending in Leeds geïsoleerd.

6) DAVIDSON. Deze intermedius-stam was kort voor de verzending in Glasgow geïsoleerd.

Alle stammen bleken de voor hun type specifieke kolonievormen en biochemische eigenschappen te bezitten.

Zij waren alle pathogeen voor de cavia. De stammen vormden de basis voor het verdere onderzoek.

§ 6. De Amsterdamse stammen.

In het tijdvak van 1 November 1935 tot 1 Mei 1936 werden mij door Dr. A. CH. RUYS 90 zuivere stammen, afkomstig van 19 patiënten en 39 bacillendragers, ter beschikking gesteld.

17 stammen, afkomstig van 7 patiënten en 5 bacillendragers, behoorden tot het gravis-type. Deze waren alle pathogeen voor de cavia.

73 stammen, afkomstig van 12 patiënten en 34 bacillendragers behoorden tot het mitis-type. Van deze stammen waren er 63 pathogeen en 10 apathogeen voor de cavia¹⁾.

Vertegenwoordigers van het intermedius-type of atypische stammen werden door mij in Amsterdam niet gevonden.

Van de eerste gravis-kweek, begin November geïsoleerd, beantwoordde de kolonievorm geheel aan de door de Engelse schrijvers gegeven beschrijving. De gelijkenis was volkomen met de door Prof. McLEOD gezonden gravis-stammen. Op 18 December werd opnieuw een gravis-stam gevonden, eveneens afkomstig van een patiënt. Deze

¹⁾ Het grootste deel van de pathogeniteitsproeven werd door Dr. Ruys, een klein deel werd door mijzelf verricht. In alle gevallen werd de intracutane methode gebruikt.

cultuur was de reeds enige malen genoemde stam „Amsterdam XXXI”, waarvan de dicht opeengegroeide kolonies niet van mitis waren te onderscheiden, terwijl de supergeïsoleerde kolonies een duidelijke gravis-vorm te zien gaven. De patiënt bleef tot half Maart bacillendragers. Verder werden geen patiënten of bacillendragers met het gravis-type meer gezien, totdat in de laatste dagen van Maart en in de maand April achtereenvolgens bij 5 patiënten, waarvan één aan zogenaamde „maligne diphtherie” overleed, en 5 bacillendragers het gravis-type weer werd geïsoleerd. Al deze stammen hadden dezelfde individuele eigenschappen als de stam „Amsterdam XXXI”.

In dit hoofdstuk zijn nog enige individuele verschillen van enkele mitis-stammen beschreven. Door deze kleine verschillen was het soms mogelijk de identiteit van sommige stammen vast te stellen. Mogelijk kan hiermee nog eens een infectiebron worden opgespoord. Zo werd in één gezin bij 2 patiënten en 2 bacillendragers enige malen een mitis-stam geïsoleerd, die zich door opvallend kleine kolonies kenmerkte.

Bij 8 personen werden de stammen, verkregen door het uitvegen van neus en keel, met elkaar vergeleken. In één geval werd er uit de neus een apathogene en uit de keel een pathogene mitis-stam gekweekt. Bij de andere onderzoeken bleken alle stammen identiek.

3 Bacillendragers werden binnen een week twee maal onderzocht; hetzelfde type (mitis) werd gevonden. Bij allen had de stam beide malen dezelfde individuele kenmerken.

De bacillendrager van de reeds genoemde stam „Amsterdam I”, die bij sommige kolonies in het centrum een kleine korreling vertoonde, (fig. 8), is gedurende 6 weken drie maal onderzocht. Steeds werd een stam met dezelfde individuele eigenschappen geïsoleerd.

7 Bacillendragers werden gedurende een tijdvak van 6 tot 8 weken twee maal, een enkele drie maal onderzocht. 1 Bacillendrager en 1 patiënt werden gedurende 3 maanden drie maal nagekeken. Bij geen van allen werden veranderingen van de stammen, die allen tot het mitis-type behoorden, geconstateerd.

Bij 1 bacillendrager, die gedurende 2 maanden vier maal werd onderzocht, werd de drie eerste keren een pathogene, de laatste maal een apathogene mitis-stam geïsoleerd.

De reeds genoemde patiënt met de gravis-stam „Amsterdam XXXI” is gedurende drie maanden herhaaldelijk onderzocht; steeds werd een stam met dezelfde individuele eigenschappen gevonden. Eerst

nadat bij patiënt tonsillectomie verricht werd, konden geen diphtherie-bacillen meer uit de keel worden gekweekt.

Interessant was het hoe, kort voordat de keel van deze patiënt negatief geworden was, een stam met geheel dezelfde eigenschappen een kleine epidemie verwekte in een groot gezin met de burens. Bij navraag was het niet vast te stellen, hoe een eventueel contact tot stand gekomen zou zijn.

De waarnemingen te Amsterdam pleiten dus voor een sterke mate van gefixeerd zijn van de typen. Bovendien bleek, dat de individuele eigenschappen van sommige stammen eveneens gedurende lange tijd bleven bestaan.

§ 7. De Rotterdamse stammen.

Van Dr. L. E. DEN DOOREN DE JONG ontving ik gedurende de maanden Februari, Maart en April 1936, een aantal buizen met gemengde cultures, gekweekt uit kelen en neuzen van patiënten, die opgenomen waren in het Gemeente-Ziekenhuis aan de Coolsingel en het Gemeente-Ziekenhuis aan de Bergweg.

Met behulp van de platen van McLEOD en GUNDEL werden uit dit materiaal 63 diphtherie-stammen gekweekt, afkomstig van 56 patiënten. Hiervan behoorden 57 stammen, afkomstig van 50 patiënten tot het gravis-type. Alle stammen waren pathogeen voor de cavia en vertoonden de klassieke „daisy-head”-vorm. Cultures, die dezelfde eigenschappen hadden als de gravis-stam „Amsterdam XXXI” werden niet gevonden.

6 Stammen, afkomstig van 6 patiënten, behoorden tot het mitis-type. Deze stammen waren eveneens alle pathogeen voor de cavia.

Vertegenwoordigers van het *intermedius*-type werden ook bij het Rotterdamse materiaal niet gevonden. Evenmin waren er *atypische* stammen bij.

§ 8. De Groningse stammen.

Gedurende de periode van het onderzoek kwam in Groningen de diphtherie slechts zeer sporadisch voor, zodat het aantal van daar afkomstige stammen gering was.

Van Prof. KAPSENBERG ontving ik 5 stammen, afkomstig van 4 patiënten en 1 bacillendrager.

3 Stammen, afkomstig van 3 patiënten, bleken tot het *intermedius*-type te behoren. Alle 3 waren pathogeen voor de cavia.

2 Stammen, afkomstig van 1 patiënt en 1 bacillendrager, behoorden tot het mitis-type. De stam afkomstig van de patiënt was pathogeen

voor de cavia. De reactie van de andere stam was zwak positief. Wanneer men bedenkt, dat in de gemeente Groningen van 1 November 1935 tot 1 Mei 1936 slechts 4 gevallen van diphtherie zijn aangegeven, dan moet men tot de conclusie komen, dat ook een intermedius-infectie zeer goed sporadisch kan blijven.

§ 9. De biochemische reacties der stammen.

Alle 164 onderzochte stammen vergistten *glucose* wel en *saccharose* niet.

Alle 76 stammen behorende tot het gravis-type zetten *stijfsel* en *glycogeen* om. (6 Stammen gaven een slechts geringe omzetting van *glycogeen*.)

De 83 stammen behorende tot het mitis-type en de 5 stammen behorende tot het intermedius-type vergistten *stijfsel* en *glycogeen* niet.

Geen enkele stam vertoonde een afwijking van de bij zijn type behorende reacties.

HOOFDSTUK IV.

DE TYPEN VAN DE DIPHTHERIEBACIL UIT GENETISCH OOGPUNT BESCHOUWD.

1. Inleidende Beschouwingen.

Nadat wij de verschillen tussen de typen van de diphtheriebacil hebben leren kennen, doet zich de vraag voor, op welke wijze zij zijn te classificeren. Zijn de typen van de diphtheriebacil als rassen of ondersoorten op te vatten, d.w.z. als standvastige eenheden, die zich door hun genotypische constitutie onderling onderscheiden; of vormen zij verschillende verschijningsvormen van één enkele soort?

Het lijkt mij onnodig er uitvoerig aan te herinneren, dat de grondslag tot beantwoording van deze vraag nog nauwelijks gelegd is. Zolang de veranderlijksheidsverschijnselen in de bacteriologie geheel verschillend worden opgevat, blijft elke classificatie onzeker¹⁾.

De opvatting, waartoe ik na bestudering van dit onderwerp ben gekomen, sluit zich aan bij de voorstellingen van hen, die ook voor de microben de standvastigheid van de soort aanvaarden. Indien men zich met de door JOHANNSEN voor de hogere organismen ingevoerde fundamentele begrippen phaenotypus en genotypus vertrouwd heeft gemaakt, kost het geen moeite te erkennen, dat deze begrippen ook voor de bacteriën kunnen gelden.

De *genotypische constitutie* omvat de erfelijke aanleg van alle eigen-

¹⁾ Ik behoef hier slechts te verwijzen naar het zoo juist verschenen en onder leiding van Prof. KLUYVER bewerkte proefschrift van H. D. MAYER, getiteld *Das „Tibi” Konsortium*. Deze onderzoeker benut de experimentele gegevens over mutatie, die bij enkele hogere organismen verkregen zijn, tot het opbouwen van de voorstelling, dat de dagelijks waar te nemen veranderlijksheidsverschijnselen bij bacteriën op mutatie (verandering van de genotypische constitutie) berusten. Daar de bacterieveranderingen slechts zelden tot iets nieuws voeren en tot de norm plegen terug te keren, neemt MAYER tevens aan, dat remutatie — reversibiliteit van de veranderlijkheid der genotypische constitutie — eveneens tot de dagelijks waar te nemen levensverschijnselen van de bacteriën behoort. Op deze wijze worden dus begrippen als buigzaamheid der genotypische constitutie, erfelijkheid van verworven eigenschappen, vervaging van de soortgrenzen enz., van welke de Genetica der hogere organismen zich heeft trachten te zuiveren, voor de microbenwereld gehandhaafd.

schappen. Binnen een soort of ras (ondersoort) zijn individuen van dezelfde genotypische constitutie verenigd.

De genotypische constitutie is dus even constant als de soort. Het ontstaan van nieuwe soorten of rassen berust op veranderingen van de genotypische constitutie; deze veranderingen zijn zelf eveneens constant.

De *phaenotypus* — de verschijningsvorm van een wezen — is het resultaat van de ontwikkeling van de aanleg onder invloed van het milieu. Uit de *phaenotypus* is de genotypische constitutie niet zonder meer af te leiden.

Door VAN LOGHEM is er onlangs op gewezen, dat de begrippen genotypische constitutie en *phaenotypus* niet alleen voor de bacteriologie bruikbaar zijn, doch dat de bacteriologische toepassing zelfs leidt tot een scherpere definitie van het begrip *phaenotypus* dan door JOHANNSEN werd gegeven. Ik wil mij veroorloven, in verband met mijn onderwerp, deze beschouwing in haar geheel over te nemen.

„Aanvankelijk verstond JOHANNSEN onder *Phaenotypus* een gemiddelde, zoals hij zelf zegt: een centrum, waaromheen de individuen zich groepeeren.

Een groep individuen, die genotypisch identisch zijn, vertoont dan ook in een bepaald milieu een eigen *phaenotypus*.

„Für jede Lebenslage ein besonderer *Phaenotypus*” (2e druk, pag. 275).

In de derde druk van zijn „*Elemente der exakten Erblchkeitslehre*” heeft hij moeten erkennen, dat de *phaenotypus* volstrekt individueel is: het resultaat van een individuele ontwikkeling van een bepaalde aanleg onder toevallige voorwaarden.

Hij maakt dan ook geen bezwaar het woord *phaenotypus* zonder meer te gebruiken ter aanduiding van de „persönliche Beschaffenheit irgendeines Individuums”.

„Für jede Lebenslage ein besonderer *Phaenotypus*” handhaaft hij dan ook niet; in de derde druk (p. 317) schrijft hij: „Für jede Lebenslage ein besonderer *durchschnittlicher Phaenotypus*”.

Wanneer wij ons afvragen, op welke wijze het begrip *phaenotypus* in de bacteriologie is toe te passen, stuiten wij nog op een onzekerheid in de definitie.

Wat is „persönliche Beschaffenheit”?

Is de *phaenotypus* van een kruidje-roer-mij-niet veranderd, als een mechanische prikkel de blaadjes doet slap hangen; is de *phaeno-*

typus van een hond veranderd, als hij op volwassen leeftijd immuun is tegen hondenziekte na het doormaken van deze besmetting in de jeugd; is de *phaenotypus* van een mens veranderd, als hij van een donkere, zeer warme kamer is getreden in zeer koude buitenlucht en volle zonneschijn, zodat zijn huidskleur en de wijdte van zijn pupillen zijn gewijzigd?

Het is duidelijk, dat al deze aanpassingen mede tot de *phaenotypus* behoren. Wij kunnen zelfs zeggen, dat de „persönliche Beschaffenheit” eerst omschreven kan worden, indien wij de aanpassingstoestanden van het individu aan mogelijke voorwaarden van het milieu ten volle overzien.

Aldus begrepen is de phaenotypus van een individu de totaliteit van zijn adaptaties.

Wij erkennen dan tevens, dat deze omschrijving van de *phaenotypus* ook voor den bacterioloog bruikbaar is.

Het kennen van het persoonlijke voorkomen en wezen van een bacterie geschiedt meer nog dan bij hogere wezens uit een opzettelijke en proefondervindelijke studie van zijn adaptaties.

Aankweking, zuivere kweek, groei in gesuikerde media, vorming van kolonies, groeibelemmering in eigen stofwisselingsproducten, dit alles vertegenwoordigt tezamen een reeks van extreme en onnatuurlijke groeivoorwaarden, aan welke de bacterie door ons gedwongen wordt zich tot het uiterste aan te passen.

Onze voorstelling omtrent de *phaenotypus* van de bacterie bouwen wij dan ook op uit de experimentele studie van deze aanpassingen.

Wat wij reeds zagen aangeduid bij de hogere organismen, geldt zeker ten volle voor de bacteriën. *De phaenotypus van een bacterie is de totaliteit van zijn adaptaten*”¹⁾.

Daar aldus in de *phaenotypus* de adaptatietoestanden van het individu mede zijn opgenomen, zal het nodig zijn ter verdere inleiding het begrip *adaptaat* nader te omschrijven.

Aanvaardt men als bacterie-individu de voortgroeïende cloon, dan zijn de meeste groeiwijzen, waaronder wij een uit één cel voortgekweekte „bacteriestam” ontmoeten, als adaptatietoestanden van dat individu, kortweg als *adaptaten*, te beschouwen²⁾.

¹⁾ Over bacterieverandering als normale en ziekelijke functie, *Antonie van Leeuwenhoek*, 1937, no. 2.

²⁾ Clonen met blijvende regressieve veranderingen kunnen als *atropheonten* (*mutilaten*) worden onderscheiden; clonen met pathologisch nieuwe functies als *degeneranten* (VAN LOGHEM).

De kennis van deze adaptatietoestanden is voor het vraagstuk, dat ons bezighoudt, van het grootste gewicht. *Tegenover de mogelijkheid, dat de „typen” rassen of ondersoorten zijn, d.w.z. zich door hun genotypische constitutie onderscheiden, staat een andere mogelijkheid, n.l. dat de „typen” een zelfde genotypische constitutie hebben, doch uitdrukking zijn van een verschillende adaptatietoestand.*

Uit verschillende ervaringen is het bekend, dat aanpassingstoestanden tijdens het individuele bestaan zich zeer lang kunnen handhaven. Een mens of dier, slechts éénmaal met een suspensie van dode typhusbacillen behandeld, vertoont maandenlang de aanmaak van agglutinenen. Nog typischer is de levenslange immuniteit na een bepaalde infectieziekte. Het levenslang immune individu vertegenwoordigt dan een zich onbeperkt tijdens het individuele leven handhavende adaptatie.

Dergelijke gefixeerde adaptatietoestanden worden in de bacteriewereld zeer veelvuldig waargenomen. Een zeer fraai voorbeeld werd onlangs in het Laboratorium voor Gezondheidsleer te Amsterdam door BEKKER bestudeerd. Hij verkreeg, door kweken bij 42° C., een aantal clonen van *Bac. anthracis*, die als aanpassingsverschijnsel asporogenie vertoonden. Onder gewone omstandigheden voortgekweekt, scheen een aantal van deze clonen voor goed het vermogen sporen te vormen te hebben verloren (d.w.z. regressief veranderd te zijn tot *atropheanten* of *mutilaten*). Langdurige waarneming bewees echter, hoe voorzichtig men met deze gevolgtrekking moet zijn. Enkele asporogene clonen herkreten na enige jaren te zijn voortgekweekt het vermogen sporen te vormen. In werkelijkheid waren de asporogene clonen dus adaptaten. Voor deze langdurig gefixeerde adaptatietoestanden heeft VAN LOGHEM voorgesteld de term *fixatie* te gebruiken en de aldus aangepaste clonen als *fixaten* aan te duiden.

Het principiële verschil tussen een *fixaat* als aanpassingstoestand binnen de soort en een nieuwe soort (*mutant*) is hiermede wel duidelijk.

Voor ons vraagstuk is het echter nodig het begrip „type” nader te beschouwen.

Men vergelijk bij JOHANNSEN de verwarring, waartoe het gebruik van het woord „type” aanleiding kan geven. In de terminologie der Genetica overgegaan, duidt het het totaal der eigenschappen aan, waardoor een ras of een ondersoort (soort) gekenmerkt is. Vaak

gebruikt men het woord „type” dan ook als synoniem met „ras” (biotypus).

Dit gebruik is op ruime schaal door de bacteriologen overgenomen. Op weinig gelukkige wijze echter, omdat het principiële verschil tussen *fixaat* en *type* daarbij wordt verwaarloosd. Tegenover de gefixeerde adaptatietoestanden van individuen van eenzelfde soort heeft men standvastige genotypische constituties streng te onderscheiden.

Houdt men er aan vast, dat twee typen binnen een soort verschillen in genotypische constitutie, met andere woorden als „rassen” of „ondersoorten” zijn aan te duiden, dan wordt in de bacteriologie de term „type” zeer vaak misbruikt.

De „typen” van de pneumococcus zijn zonder twijfel slechts schijnbare typen (pseudotypen); in werkelijkheid *fixaten*.

De onderzoekingen van GRIFFITH (1928)¹⁾ hebben immers aangetoond, dat het eene „type” kan overgaan in het andere „type”. Iets dergelijks heeft KORTHOFF reeds jaren geleden aangetoond voor „typen” van de dysenteriebacil. Door voortkweken in collodiumzakjes in de buikholte van dieren, zag hij het eene „type” in het andere overgaan.

Daarentegen hebben zich de typen van de tuberkelbacil tot nog toe als zodanig gehandhaafd. Zoals onlangs nog door RUYS is beschreven, kunnen de phaenotypen van een bepaalde „humane” bacil en van een bepaalde „bovine” bacil gelijk zijn (bij verlies van virulentie en gelijke groei op voedingsbodems). Het verschil in genotypische constitutie tussen beide typen is daarmee niet ontkend.

Na deze korte inleidende opmerkingen²⁾ kan ik opnieuw de vraag stellen: zijn de typen van de diphtheriebacil standvastig, in den zin van onderling verschillend door hun genotypische constitutie; of zijn zij slechts „schijnbare typen” en in werkelijkheid uitdrukking van gefixeerde adaptatietoestanden?

§ 2. Schijnbare veranderlijkheid der typen.

In de allereerste plaats dient uitgeschakeld te worden de schijnbare

¹⁾ Het werk van GRIFFITH is bevestigd en voortgezet door NEUFELD en LEVINTHAL (1928), REIMANN (1929), DAWSON (1931), DAWSON en SIA (1931) en ALLOWAY (1932 en '33).

²⁾ Voor meer bijzonderheden zij verwezen naar de publicaties van VAN LOGHEM (1920 e.v.) en naar de Amsterdamse proefschriften van KORTHOFF (1918), TER POORTEN (1920), BOTMAN (1936) en BEKKER (1938).

veranderlijkheid, waaronder die gevallen verstaan moeten worden, waarbij een foutieve techniek of interpretatie in het spel is.

EAGLETON en BAXTER (1922) hebben reeds met nadruk verklaard, dat meermalen schijnbare veranderingen verkregen worden door verontreinigingen van bijvoorbeeld luchtcoccen. In het bijzonder bij het diphtherie-onderzoek is deze gewone vorm van verontreiniging van groot belang, daar het voorkomt, dat deze coccen op het LOEFFLER-serum geheel overvleugeld worden door de diphtheriebacil, zodat men ze in het preparaat over het hoofd ziet.

Ook ik heb bij mijn onderzoek enige malen met dergelijke verontreinigingen te doen gehad. Zo kreeg ik twee maal bij het voortkweken op vaste voedingsbodems een schijnbare verandering van de cloon, doordat een stam, die eerst geen saccharose omzette, dit later bij het voortkweken op vaste voedingsbodems wel begon te doen. In preparaten, gemaakt van op LOEFFLER-serum of McLEOD-agar gegroeide cultuur, was het ten ene male uitgesloten een verontreiniging te vinden; ook was aan de kolonievorm op McLEOD- en GUNDEL-agar geen verandering waar te nemen. De omzetting van saccharose echter bleef bestaan. Toen nu op gewone bouillon-agar op geïsoleerde kolonies werd uitgestreken, bleken er, vooral daar, waar de kolonies dicht opeengegroeid waren, talrijke witte knopjes te zijn opgekomen. Werden de witte knopjes afgeënt, dan verkreeg men na enkele passages een zuivere cultuur van coccen, die inderdaad de saccharose omzetten en niets met diphtherie gemeen hadden. Eveneens was het mogelijk, indien men verder met bouillon-agar werkte, na enkele malen afenten van geïsoleerde kolonies, de oorspronkelijke diphtheriestam zuiver te krijgen, waarna bleek, dat zijn biochemische eigenschappen onveranderd waren.

Doordat ik bij een groot aantal van de door mij onderzochte stammen ook de kolonievorm op gewone bouillon-agar heb nagegaan, heb ik deze witte knopjes nog al eens ontmoet. Steeds moest ik tot de conclusie komen, dat er van een verontreiniging sprake was, die zich alleen op de bouillon-agar manifesteerde.

Het zij dus als een eis gesteld, dat men, alvorens onverwachte uitkomsten bij het biochemische onderzoek te erkennen, de stam eerst enige passages van geïsoleerde kolonies op bouillon-agar laat ondergaan.

Wanneer men na deze ondervinding het artikel van BAERTHLEIN (1913) leest over zoogenaamde mutaties bij de diphtheriebacil, dringt zich in sterke mate de vraag naar voren, of de witte knopjes, die BAERTHLEIN op bouillon-agar op de diphtheriekolonies heeft zien

verschijnen en die hij „mutaties” noemde, in werkelijkheid verontreinigingen geweest zijn.¹⁾

De malen, dat ik dergelijke knopjes gezien heb, lukte het steeds de verontreiniging van de oorspronkelijke stam te scheiden. Dat het vormen van dergelijke knopjes niet aan de stam inhaerent was, bleek ook, doordat een dergelijk verschijnsel zich bij verdere controles gedurende vele maanden niet meer voordeed.

Ook bij het nalezen van de onderzoekingen van HOBBY (1935) en MENTON e.a. (1933) vraagt men zich af, of hier altijd wel van een zuivere cultuur sprake is.

Een tweede vorm van schijnbare veranderlijkheid is door CARTER (1936) ontsluit. MURRAY (1935) heeft beschreven, dat wanneer men diphtheriestammen om de drie dagen overent in bouillon, die 5% normaal konijnen- of cavia-serum bevat, na twee keer reeds de stijfsel-negatieve stammen stijfsel-positief geworden zouden zijn.

CARTER kon dit niet bevestigen. Het bleek hem dat, indien bij het overenten van de serumbouillon in de stijfseloplossing het inoculum wat ruim genomen werd, zodat een weinig van het serum meekwam, men ten allen tijde een omzetting van de stijfsel verkreeg.

ANDERSON e.a. (1933) verklaren dit, doordat de diastase van het serum de stijfsel zou hydrolyseren.

Na de uiteenzetting over „superisolatie” in Hoofdstuk II § 2 is het duidelijk, dat men bij het beoordelen van de veranderlijkheid van de kolonievorm in vele gevallen zeer voorzichtig moet zijn, daar men vaak eerst met behulp van superisolatie kan constateren, of werkelijk veranderlijkheid in het spel is.

Zo meende ik aanvankelijk een van de Groningse intermedius-stammen door veertig dagelijkse overentingen op bloed-agar, tenminste wat zijn kolonievorm betrof, in een mitis te hebben veranderd (fig. 20). Een dergelijke vondst zou voor de beoordeling van de betekenis van het intermedius-type van grote waarde geweest zijn. Bij verder onderzoek bleek echter, dat supergeïsoleerde kolonies een zuivere intermedius-vorm te zien gaven (fig. 21). Hier kon dus het bewijs geleverd worden, dat aan het wezen van deze kenmerkende eigenschap nog niets veranderd was. Op bldz. 75 wordt dit feit nog nader besproken.

¹⁾ Zo moeten ook de waarnemingen van WEIGMANN en KOEHN (1936), die vertegenwoordigers van de drie typen met speeksel-filtraten in „pseudo-diphtheriebacillen” zouden hebben veranderd, met voor een gravis-stam, het intermedius-type als tussenstadium, kritisch worden beschouwd; te meer daar het SCHÄFER en PESCH niet gelukt is hun resultaten te bevestigen. Bovendien zijn de uitkomsten van WEIGMANN en KOEHN in lijnrechte tegenspraak met alles, wat tot nu toe over de veranderlijkheid van de typen der diphtheriebacil bekend is.

§ 3. *Experimenten over veranderlijkheid met negatieve uitslag, in de literatuur vermeld.*

Vooraf in den beginne, na de ontdekking van de typen van de diphtheriebacil, hoorde men uitsluitend over negatieve resultaten van allerlei pogingen de verschillende typen langs experimentele weg in elkaar te doen overgaan.

Vrijwel alle onderzoekers en in de eerste plaats de ontdekkers, waren van het feit doordrongen, dat, indien men zich gerechtigd wilde achten enigerlei bacteriologische, epidemiologische of klinische betekenis aan de nieuwe verdeling te hechten, als eerste eis gesteld moest worden, dat de verschillende typen niet op eenvoudige wijze in elkaar zouden zijn te veranderen.

Het aantal proeven, dat uitgevoerd is om te trachten mitis, intermedius en gravis in elkaar over te laten gaan, is dan ook zeer groot.

ANDERSON e.a. (1931) hadden bij langdurig kweken op agar en in bouillon bij 37° C. en kamertemperatuur generlei verandering kunnen constateren.

Later hebben ANDERSON e.a. (1933) hun onderzoek op dit gebied aanzienlijk uitgebreid. Zij verkregen hierbij één verandering van ondergeschikte betekenis, die later nog zal worden besproken. Opvallend is ook bij dit onderzoek de grote standvastigheid van de verschillende typen. Zo verkregen zij bij 65 dierproeven, post mortem, steeds de homologe stam terug. Bij 32 konijnen spotten zij overeenkomstig de door GRIFFITH bij het pneumococcon onderzoek gevolgde techniek, een grote hoeveelheid gedode gravis-bacteriën in tezamen met levende mitis-organismen en omgekeerd: gedode mitis met levende gravis. Het gelukte 10 stammen terug te kweken, die allen onveranderd bleken te zijn.

GUNDEL en ERZIN (1936) vonden bij meer dan honderd dieren bij het kweken uit de inwendige organen steeds hetzelfde type terug.

Een zeer uitgebreid onderzoek is door CARTER verricht. Hij heeft stammen in serum-bouillon met antitoxine laten groeien. Hij heeft deze doen bevriezen en ontdooien; verhit tot bijna op het afstervingspunt; talrijke passages door cavia's laten ondergaan; vele weken bij kamertemperatuur voortgekweekt; geïsoleerd van LOEFFLER-serum, nadat de stammen bijna door *Bacillus subtilis* geheel waren overgroeid en hen onder anaërobe omstandigheden voortgekweekt. In geen van de gevallen kreeg hij ook maar de minste verandering. Alleen bij de 6 „aberrant strains”, die mede in het onderzoek waren opgenomen, kreeg hij enige afwijkingen.

Het onderzoek van PERRY e.a. (1936) zij vermeld, daar het een bewijs

levert voor het in grote mate constant zijn der typen. Deze onderzoekers vonden in zeven streken van de Oostkust van Amerika gedurende twee jaren uitsluitend mitis-stammen, op één intermedius na. Overeenkomstige waarnemingen zijn ook door andere onderzoekers gedaan, maar nimmer waren de resultaten zo overtuigend als in dit geval.

In dit verband kan tevens nog melding worden gemaakt van het reeds genoemde feit, dat men praktisch nimmer bij herhaald onderzoek bij één patiënt een andere dan de homologe stam gevonden heeft, tenzij herinfectie kon worden aangenomen.

Uit al deze negatieve resultaten mag zeker de conclusie worden getrokken, dat de typen een grote mate van standvastigheid bezitten, in het bijzonder bij het bewaren en overenten op vaste voedingsbodems.

Mocht uit volgende onderzoekingen blijken, dat men niet met echte *biotypen* maar met *adaptaten* te doen heeft, dan moet men toch zeker tot de slotsom komen, dat deze adaptaten in sterke mate gefixeerd zijn en dus vooral, omdat zij zich bij de epidemiologische verspreiding zo merkwaardig onveranderlijk tonen, de bestudering in alle opzichten waard zijn.

§ 4. *Experimenten der veranderlijkheid met positieve uitslag, in de literatuur vermeld.*

De eerste positieve resultaten op het gebied der experimentele veranderlijkheid zijn vermeld door CHRISTISON (1933). De belangrijkste door haar gevolgde methodiek bestond uit het om de drie dagen overenten in bouillon van PH 7, 8 en PH 7,0.

Het gelukte haar op deze wijze de kolonievormen van de drie typen een opmerkelijke wijziging te doen ondergaan.

Na verscheiden overentingen slaagde zij er in uit een oorspronkelijke mitis-stam een „variant” te kweken, die wat zijn kolonievorm betrof, volkomen op een gravis-stam geleek.

Op soortgelijke wijze verkreeg zij uit een intermedius-stam een tweetal varianten, waarvan bij een de kolonievorm enigszins op mitis geleek, terwijl de andere meer een gravis-vorm had.

Evenzo werd uit een gravis-type een mitis-variant gekweekt.

Het merkwaardige van deze veranderde stammen was, dat hun *biochemische eigenschappen niet de minste verandering vertoonden*. De gravis-varianten uit mitis en intermedius verkregen zetten dus de stijfsel niet om, terwijl de mitis-variant uit de gravis-stam de eigenschap stijfsel om te zetten bleek te hebben behouden.

Een tweede bijzonderheid was, dat de op deze wijze uit bouillon

verkregen varianten op hun beurt op vaste voedingsbodems onveranderlijk bleken te zijn.

Evenzo was op de varianten weinig invloed uit te oefenen door herhaalde overentingen in bouillon. Slechts gelukte het CHRISTISON de op gravis gelijkende variant, afkomstig van een mitis-stam, een vorm te geven, die iets meer „smooth” was.

MURRAY (1935) en ROBINSON (1934) herhaalden de proeven van CHRISTISON en verkregen een overeenkomstig resultaat. Ook bij hen waren de biochemische eigenschappen van de varianten onveranderd.

Bovendien slaagden zij er in aan te tonen, dat de verkregen variant serologisch identiek bleef met de stam, waarvan deze was afgeleid.

Met deze kennis gewapend is het duidelijk, dat men met het vinden van de CHRISTISON-varianten nog niet tot de conclusie mag komen, dat de verschillende typen in elkaar overgaan. Een dergelijke variant kan worden beschouwd als een *adaptaat* of *atropheont* van het oorspronkelijke type, die nu toevallig in enkele eigenschappen op een ander type gelijkt.

Van belang is het dan ook te weten, in hoeverre deze varianten op hun beurt weer constant zijn, een vraag, die ik mij bij mijn eigen onderzoek heb voorgelegd.

Verder verdient het de aandacht, dat men de CHRISTISON-varianten zo uiterst zelden in vivo vindt. Inderdaad wordt een bepaald percentage atypische stammen door vele schrijvers beschreven, maar het is de vraag, of dit met behulp van een verbetering van de techniek (toepassing van de illuminator en superisolatie) mogelijk nog niet zal verminderen.

Zeker mag men niet zo ver gaan als PREUNER, door de gevolgtrekking te maken, dat het nu verder overbodig is de kolonievorm nog na te gaan.

Een andere zeer belangrijke vondst, waaraan slechts weinig aandacht is besteed, is door ROBINSON (1934) gedaan. Door 275 intermedius-stammen gedurende 4 tot 16 maanden op vaste voedingsbodems voort te kweken, gelukte het hem bij één stam een verandering te ontdekken. Deze stam vertoonde n.l. papillen op de kolonies. Bij verdere overentingen ontstond geleidelijk een kolonievorm van het gravis-type.

Daarna onderwierp hij deze variant aan een „starch-training”, door bijna dagelijkse overentingen in stijfsel bevattende media. Na drie en een halve maand ontstond een steeds sterker wordende omzetting.

De stam bleek nog zeer pathogeen voor de cavia te zijn. Door van deze cavia te kweken uit de plaats van inenting, de lever en het pleura-

vocht vond hij atypische gravis-kolonies, die bij verder enten weer een duidelijke gravis-vorm te zien gaven. De stam, afkomstig uit de lever, bleek nog steeds stijfsel en glycogeen te kunnen omzetten. De cultures, verkregen van de andere plaatsen, deden dit pas eerst weer na drie maanden „starch-training”.

Deze proeven herhaalde ROBINSON drie maal, steeds met hetzelfde resultaat.

Resumerende kunnen wij dus zeggen, dat ROBINSON er in geslaagd is, een specimen van het intermedius-type te veranderen in een variant, die, met onze huidige kennis, niet meer van gravis te onderscheiden is. Serologische proeven werden niet gedaan.

De neiging van deze ROBINSON-variant om, wat zijn biochemische eigenschappen betreft, bij de dierproef weer tot zijn oorspronkelijke vorm terug te slaan, is onmiskenbaar. Een dergelijke tijdelijke stijfsel-omzetting is een typisch voorbeeld van *adaptatie*. Juist de, in tegenstelling met de echte stijfselomzetting, zeer geringe standvastigheid van deze door een cloon verworven eigenschap, tezamen met de sterke afhankelijkheid van het milieu, gepaard aan de nog geringe kennis van dit verschijnsel bij de diphtheriebacteriën, doet mij enigszins huiveren hieruit nu het bewijs te aanvaarden, dat de typen intermedius en gravis slechts tijdelijk gefixeerde adaptaten of „pseudotypen” zijn. Het lijkt voorlopig veiliger ook de ROBINSON-variant te rangschikken onder de groep van in enkele eigenschappen op elkaar gelijkende adaptaten, afkomstig van verschillende „typen”, die met hun gelijke phaenotypus nog niet genotypisch identiek zijn, en daarom pseudotypen moeten heten.

Moge in dit verband het oordeel van SCHÄFER (1936) geciteerd worden. „Man fischt bedenklich im Trüben, wenn man eine Umwandlung zu einer anderen Art erkennen will wo nicht weiteres vorliegt, als dass verschiedenste Eingriffe es dazu kommen liessen, dass ein durch den Verlust seiner normalen Leistungen verkümmerter Bazillus auftaucht, der mit den nur negativ gekennzeichneten Diphtheroiden und Pseudo-diphtheriebazillen (keine Polkörperchen, keine Säurebildung, keine Giftbildung) Aehnlichkeit oder Uebereinstimmung aufweist. Erlaubt man einen solchen Stamm, sich auf guten Nährmedien zu regenerieren, so gewinnt er in der überwiegenden Mehrzahl seine verlorenen Eigenschaften wieder zurück und sofern ihm das nicht gelingt, ist nur die Erklärung satthafte, dass er partiell irreversibel geschädigt ist und so verstümmelt noch weiter existiert. Durch diese Eingriffe entstehen keine neuen Arten, sondern Minusvarianten”.

Indien het woord „minusvarianten” vervangen werd door adaptaten

of atropheonten, zouden wij ons met de uitspraak van SCHÄFER geheel kunnen verenigen. Wat hier voor een verloren eigenschap geldt, geldt ook voor een tijdelijk verworven, eventueel pathologische eigenschap.

Het geciteerde gaat volledig op voor het werk van ERZIN (1936). Deze veranderde met behulp van antiserum alle drie types in zeer kleine, tere, met de loupe nauwelijks zichtbare, iets gewelfde kolonies, die door dierpassages weer terugsloegen.

MAIR (1936) zou met een recent onderzoek de laatste sluitsteen gelegd hebben voor de veranderlijkheid, indien hij slechts in alle opzichten zijn onderzoek gegrondvest had op de oorspronkelijk door de ontdekkers aangegeven methodiek. MAIR verwaarloosde n.l. de kolonievorm en hechtte een veel te grote waarde aan de celvorm. Hierdoor valt zijn werk buiten het kader van de talrijke onderzoeken op dit gebied, die zich in het algemeen door een bewonderenswaardige uniformiteit kenmerken. Het behoeft geen betoog, dat het vooral in den beginne zeer op deze uniformiteit in de methodiek aankomt. Hoewel men op deze gronden enigszins huiverig wordt de resultaten van MAIR tot bewijsovervoering te gebruiken, zijn zijn uitkomsten toch belangwekkend genoeg om er de aandacht op te vestigen, terwijl zij tevens een aanmoediging voor verder onderzoek betekenen.

MAIR nu hield 200 stammen gedurende drie jaar onder observatie. Eerst na twee jaar zag hij een verandering optreden bij een stam, die hij als behorende tot het mitis-type hield. Verder begonnen stammen, die oorspronkelijk geen stijfsel omzetten, dit wel te doen en, wat eveneens zeer belangrijk was, ook de serologische geaardheid veranderde.

Het is ongetwijfeld jammer, dat wij niets naders over de kolonievorm uit het werk van MAIR vernemen. Tevens moet worden opgemerkt, dat wanneer men na drie jaren overenten van een diphtheriestam de biochemische eigenschappen veranderd vindt, eerst op gewone bouillon-agar overgeënt moet worden, alvorens men om de reeds op bldz. 62 genoemde redenen mag besluiten, dat hier werkelijk een verandering en geen eventuele verontreiniging in het spel is. Dit geldt te meer, omdat andere onderzoekers bij soortgelijke onderzoeken van gelijke of langere duur (b.v. McLEOD en zijn school) dergelijke waarnemingen juist niet gedaan hebben. Alleen ROBINSON heeft bij zijn uitgebreid onderzoek op vaste voedingsbodems de bovengenoemde variant verkregen.

Ook verkreeg MAIR stijfselomzetting door cultures gedurende een half uur tot 50° C. te verhitten en daarna de overlevende kolonies af te enten. Het door dergelijke manipulaties verkregen resultaat

doet sterk denken aan de mogelijkheid van een *degeneratie* volgens VAN LOGHEM, waarbij een pathologische nieuwe functie voor de dag komt.

PREUNER (1936) gelukte het, door bepaalde concentraties CuSO_4 in de voedingsmedia te verwerken, een intermedius alle eigenschappen van een gravis te geven. ERZIN (1936) gelukte het echter niet dit te bevestigen. PREUNER zelf is van mening, dat men verdere onderzoeken zal moeten afwachten, alvorens aan zijn uitkomsten definitieve waarde te kunnen toekennen.

Tenslotte moet nog melding worden gemaakt van een verandering door ANDERSON e.a. (1933) gevonden. Bij het verder kweken op vaste voedingsbodems van in het geheel honderd stammen bleek hun, dat één gravis geen stijfsel meer omzette. Aan een dergelijke verandering kan niet veel betekenis worden gehecht. Het is immers bekend, dat vrijwel alle bacteriën bij het verder enten bepaalde eigenschappen kunnen verliezen. Zo kan ook de diphtheriebacil apathogeen worden, zonder dat hieraan bijzondere waarde mag worden gehecht. In het verlies van een biochemische eigenschap ligt dan ook op zichzelf niets bijzonders. Wanneer de „varianten” reversibel zijn, dient men ze te beschouwen als *adaptaten*, indien zij niet reversibel zijn, vallen zij onder de groep der *atropheonten* (zie ook bldz. 59 e.v.).

Conclusie: Wanneer men de uitkomsten, in het bijzonder van de jongste onderzoeken nagaat, krijgt men de indruk, dat de mogelijkheid van een ontdekking, dat de „typen” in werkelijkheid gefixeerde adaptaten of pseudotypen zijn, bestaat. Alvorens men echter tot deze conclusie mag komen, dient men als eis te stellen, dat ieder type op zijn beurt, wat al zijn kenbare eigenschappen betreft, in de beide andere is over te brengen, zoals het bij de pneumococci en de atoxische dysenteriebacil gelukt is.

Wanneer men de belangrijkste resultaten van de onderzoeken op het gebied der experimentele veranderlijkheid van de diphtherietypen beschouwt, blijkt het, dat aan deze eisen nog niet is voldaan.

§ 5. Eigen onderzoek over experimentele veranderlijkheid der typen.

a. Veranderlijkheid, verkregen door herhaalde overentingen in bouillon.

Hierbij werd het door CHRISTISON aangegeven principe gevolgd. Tweemaal per week werden de stammen overgeënt in buisjes met

bouillon van PH 7,0 en PH 7,8. Na ongeveer acht tot twaalf weken werden de stammen op de gewone wijze gecontrôleerd op de voedingsbodems van Mc. LEOD en GUNDEL, terwijl tevens de biochemische eigenschappen en bij de veranderde stammen ook de pathogeniteit, werden onderzocht. In alle gevallen werden preparaten gemaakt en volgens NEISSER gekleurd. Ook werd nagegaan of bij superisolatie de eigenschappen behouden bleven.

In het geheel werden 16 stammen op deze wijze onderzocht, namelijk 7 Amsterdamse mitis-stammen, 1 Rotterdamse mitis-stam, de 6 uit Leeds ontvangen stammen, de Amsterdamse gravis-stam met het gewone voorkomen en tenslotte een Groningse intermedius.

Van de Amsterdamse mitis-stammen waren vier totaal onveranderd. Bij twee stammen vormden de kolonies, indien zij vrij dicht opeen waren gegroeid, een niet volkomen regelmatige rand. Indien zij meer uit elkaar lagen, alsook bij superisolatie, verdween dit verschijnsel. De kolonies hadden dan weer de volmaakte mitis-vorm. Als een „type”-verandering kunnen dergelijke fluctuaties niet worden beschouwd.

Uit één Amsterdamse mitis-stam werd echter een typische CHRISTISON-variant gekweekt. Bij het uitzaaien van de bouillon PH 7,0 werden, dooreengemengd, kolonies van een mitis- en een gravis-vorm gevonden (fig. 15). De op de foto zichtbare variant werd afgeënt; bij verdere kweek bleek hij zijn afwijkende eigenschappen te hebben behouden. Ook bij superisolatie behield de kolonievorm de pyramidale ruwe structuur, met radiaire streping en onregelmatige rand. Stijfsel werd echter niet omgezet.

Van de beide uit Leeds ontvangen mitis-stammen bleek stam „N.S. 29” in de bouillon PH 7,0 veranderd te zijn. Ook hier was een mengeling van mitis en meer ruwe vormen te zien. De ruwe variant werd verder gekweekt. Het bleek geen gravis-vorm van het klassieke „daisy-head”-type te zijn; de kolonie neigde meer naar de bolvorm. Wel was het oppervlak tamelijk ruw, terwijl een radiaire structuur en gekartelde rand de variant veel meer het voorkomen van een gravis dan van een mitis gaven (fig. 16). De overeenkomst tussen deze variant en het later in Amsterdam gevonden gravis-type (fig. 7) is echter onmiskenbaar. Ook hier waren de biochemische eigenschappen onveranderd.

Van de Engelse gravis-stam „Cork 181” werd na zes weken uit de bouillon PH 7,0 een kweek verkregen, die bij superisolatie op de voedingsbodem van McLEOD de karakteristieke vormen bleek te hebben behouden, terwijl de evencens supergeïsoleerde kolonies op de kweekgrond van GUNDEL eerder aan een, zij het wat ruwe, mitis

deden denken. Weer een bewijs dus, dat de voedingsbodem van McLEOD gevoeliger is en beter aanspreekt dan die van GUNDEL. Wil men bij het veranderlijkheidsonderzoek niet in moeilijkheden geraken, dan dient steeds de oorspronkelijke door McLEOD aangegeven kweekgrond gebruikt te worden.

Dezelfde ervaringen werden opgedaan bij de in bouillon PH 7,8 voortgekweekte Engelse gravis-stam N.S. 16. Ook hier gaf de GUNDEL-agar aanleiding tot allerlei twijfel, terwijl op McLEOD niet anders dan aan gravis kon worden gedacht.

Dezelfde stam in bouillon PH 7,0 voortgekweekt, gaf een belangwekkende verandering te zien. Er werd een variant verkregen, die, wat de kolonievorm betrof, ook bij superisolatie niet meer van mitis was te onderscheiden (fig. 17). Biochemisch had hij zijn gravis-eigenschappen behouden.

Uit de Engelse intermedius-stam „Davidson” werd op dezelfde wijze uit de bouillon PH 7,8 een stam gekweekt, die zeer kleine kolonies te zien gaf, echter met een typische mitis bolvorm van een „smooth” karakter (fig. 18). Ook deze stam was biochemisch niet veranderd.

Alle vier op deze wijze verkregen varianten hadden hun pathogeniteit voor de cavia behouden.

De andere onderzochte stammen ondergingen geen verandering.

b. De veranderlijkheid van de CHRISTISON-varianten.

Voor de theoretische beoordeling van de CHRISTISON-varianten is het van grote betekenis te weten, of deze op hun beurt weer aan veranderlijkheid onderhevig zijn en of het misschien mogelijk is hun weer de oorspronkelijke gedaante terug te geven.

Op vaste voedingsbodems bleken zij in hoge mate constant te zijn; maanden hierop voortgekweekt vertoonden de varianten niet de minste verandering; evenmin na veertig dagelijkse overentingen op bloedagar.

De uit intermedius verkregen mitis-variant werd niet aan een dergelijk onderzoek onderworpen, daar deze stam eerst in de laatste week van het onderzoek verkregen is.

Alle varianten waren in staat een cavia te doden. De kweek uit de inwendige organen bleek onveranderd te zijn.

Vervolgens werden de varianten weer op hun beurt tweemaal per week in bouillon overgeënt. Bij de controle na acht tot tien weken bleek, dat de in bouillon PH 7,8 voortgekweekte mitis-variant van de

Engelse gravis-stam N.S. 16 weer de gravis-vorm had teruggekregen en in niets meer van de moederstam was te onderscheiden.

Met dit laatste experiment is dus bewezen, dat de Christison-varianten adaptaten zijn, die een reversibele verandering hebben ondergaan, die hen, wat de kolonievorm betreft, tijdelijk op een ander type doet gelijken, zonder dat men mag zeggen, dat zij in het andere type zijn overgegaan, iets, wat tevens uit hun ongewijzigd biochemisch gedrag blijkt.

c. Veranderlijkheid, verkregen door bouillon-cultures in een collodiumzakje in de buikholte van een cavia te brengen.

De gedachte een cultuur in een collodiumzakje in de buikholte van een cavia in te brengen, is uitgegaan van METCHNIKOFF-ROUX-TAURELLI-SALIMBENI. Zij gebruikten deze methode aanvankelijk om de virulentie van bacillen te verhogen.

In 1918 is het KORTHOFF te Amsterdam gelukt met behulp van deze methode de „typen” FLEXNER en Y van de atoxische dysenteriebacil, zowel wat hun biochemische karakter als wat hun antigene structuur betreft, in elkaar over te laten gaan. De gedachte, die er aan ten grondslag ligt is, dat de collodium als een dialysator werkt voor de weefselvochten, welke dan hun invloed op de cultuur kunnen doen gelden.

Naar aanleiding van deze geslaagde experimenten zijn ook bij dit onderzoek overeenkomstige proeven verricht.

De moeilijkheid hierbij is op eenvoudige wijze collodiumzakjes te vervaardigen, die aan alle eisen voldoen.

Aanvankelijk heb ik de door KORTHOFF beschreven, uit het Instituut PASTEUR afkomstige, methodiek gevolgd, waarbij een agglutinatiebuisje in collodium elasticum gedompeld wordt, waarna men het overtollige af laat druipen. Deze bewerking wordt driemaal herhaald, zodat aan de buitenzijde van het buisje een tamelijk dikke collodium-membraan ontstaat. Na voorzichtig losgemaakt te zijn, kan het aldus gevormde zakje met de volle hand worden afgeschoven. De moeilijkheid is het zakje dicht te maken. Hiertoe wordt in het zakje een klein, op een champagnefles gelijkend buisje zonder bodem geschoven. Aan de hals van dit flesje geeft men een flinke kraag; even voor deze kraag wordt het zakje met zijde stevig dichtgesnoerd. Daarna wordt het geheel in alcohol gesteriliseerd om vervolgens met bouillon te worden gevuld. Door dichtsmelten van het champagneflesje wordt het dan gesloten.

Deze techniek heeft mij niet bevredigd. Het aantal mislukkingen was groot, terwijl het vastmaken van het zakje om het flesje vaak grote moeilijkheden met zich bracht. Tevens waren de aldus gemaakte zakjes vaak te dik en onregelmatig van vorm.

De volgende werkwijze voldeed mij in alle opzichten:

In een van te voren gesteriliseerde reageerbuis van klein model (10 cM. lengte en $1\frac{1}{2}$ cM. diameter) wordt een weinig collodium elasticum gedaan. Dit wordt door voorzichtig heen en weer rollen over de gehele binnenkant van het reageerbuisje gelijkmatig verdeeld. Na vierentwintig uur aan de lucht drogen verkrijgt men op deze wijze een 10 cM. lang collodiumzakje, dat tegen de binnenkant van het reageerbuisje gekleefd zit. Hierin wordt ongeveer 1 cM³. bouillon gedaan, waarna het collodiumzakje voor een klein deel voorzichtig van de glaswand wordt losgemaakt, zodat er ook een weinig bouillon tussen reageerbuisje en de collodium membraan kan worden gebracht. Het geheel kan nu met een wattenprop worden afgesloten en in de autoclaaf worden gesteriliseerd. Na de sterilisatie is het mogelijk, de bouillon in het zakje op de gewone wijze met een lange entnaald te enten. Eerst daarna wordt het zakje met een steriel pincet voorzichtig van de glaswand losgetrokken, wat meestal, dank zij het feit, dat er van te voren ook wat bouillon tussen glas en collodium gebracht is, zeer gemakkelijk gelukt, zonder dat het zakje daarbij beschadigt. Vervolgens draait men, met steriele handschoenen aan, het zeer lange uiteinde ineen tot een dunne streng, waarbij even boven de bouillon begonnen moet worden. In deze streng wordt boven de geënte bouillon een knoop gelegd, waarna het overtollige uiteinde kan worden afgeknipt. Op deze wijze wordt een hermetisch gesloten, met geënte bouillon gevuld collodiumzakje verkregen, dat niet groter is dan een boon en dat, in tegenstelling met de volgens de methode-KORTHOFF vervaardigde zakjes, dun en doorzichtig is, zonder onsterk te zijn.

Verdere voordelen van deze methode zijn de eenvoudige en volkomen zekere wijze van sluiten, zonder behulp van draadjes en speciaal vervaardigde flesjes. Ook voldeed de steriliteit aan hogere eisen, daar het enten geen andere manipulaties vereist, dan bij het enten van een gewone cultuurbuis met bouillon; sterilisatie in de autoclaaf is zonder schade van het zakje mogelijk.

Deze zakjes werden onder steriele voorzorgen in de buikholte van cavia's ingebracht. Bij de narcose voldeed in sterke mate inleiding met chlooraethyl, waarna men met aether vervolgde. Tevens werd de

incisie niet in de mediaanlijn gelegd maar dwars. Hierdoor had ik nimmer last van postoperatieve breuken. Als de cavia geseceerd werd, was het meestal niet mogelijk nog de sporen van de operatieve ingreep te vinden.

Na twaalf tot veertien dagen werden de zakjes weer uit de buikholte gehaald, waarna de stam op veranderingen werd gecontrôleerd.

Van ieder type zijn twee vertegenwoordigers genomen, terwijl tevens de CHRISTISON-varianten, verkregen uit een Amsterdamse mitis en een Engelse gravis, op deze manier zijn onderzocht.

Iedere stam werd op deze wijze bij twee cavia's ingebracht, waarvan één de week te voren driemaal met een gedode cultuur van een ander type was ingespoten. Zo zijn met acht stammen in het geheel zestien caviaproeven gedaan.

In het geheel werd slechts één verandering verkregen. Een Rotterdamse gravis-stam, die aldus veertien dagen in de buikholte van een cavia, die tevoren met een gedode mitis-cultuur was ingespoten, had vertoefd, bleek van kolonievorm veranderd te zijn. Ook bij superisolatie werden kolonies van een duidelijk mitis-karakter verkregen (fig. 19); de vorm was alleen iets meer „gechagrineerd” dan gewoonlijk het geval is. De biochemische eigenschappen waren ook hier onveranderd, evenals de virulentie. Bij voortkweken op vaste voedingsbodems gedurende vijf weken bleef de morphologische verandering gefixeerd.

De op deze wijze verkregen „variant” was dus in alle opzichten identiek aan de reeds besproken CHRISTISON-varianties; zijn vondst opende geen nieuwe gezichtspunten.

d. Veranderlijkheid bij het voortkweken op vaste voedingsbodems.

Beter zou het zijn te spreken van de onveranderlijkheid op vaste voedingsbodems, daar, met uitzondering van sommige niet geheel te vertrouwen mededelingen, alle schrijvers het op dit punt wel eens zijn.

Reeds is er herhaalde malen de aandacht op gevestigd, dat behoudens een enkele uitzondering, zoals de reeds besproken ROBINSON-variant, de diphtherietypen, op vaste voedingsbodems voortgekweekt, in hoge mate constant zijn.

Tijdens het eigen onderzoek zijn de op LOEFFLER-serum of serum-agar bewaarde stammen talrijke malen gecontrôleerd, zonder dat ook maar éénmaal een aanwijzing van veranderlijkheid werd gevonden.

De uit Leeds gezonden gravis-cultuur N.S. 16 en mitis N.S. 29,

die beiden reeds drie jaar oud waren, zijn in het bijzonder herhaalde malen gecontrôleerd, zonder dat een wijziging kon worden waargenomen.

In het Laboratorium voor de Gezondheidsleer waren enige stammen reeds gedurende vele jaren bewaard. Zij bleken allen tot het mitis-type te behoren, hetgeen geen wonder mag heten, daar om didactische redenen steeds die stammen in de verzameling werden opgenomen, die een fraaie poolkleuring vertoonden.

Ook deze waarnemingen doen dus enigszins twijfelen aan de reeds enige malen gecritiseerde uitkomsten van MAIR.

Een experiment om dit onderwerp nader te onderzoeken werd verricht. Acht stammen, namelijk van ieder type twee met de beide besproken CHRISTISON-varianten, werden ruim veertig maal dagelijks op bloed-agar overgeënt. Alle stammen bleken hierna onveranderd. Eén verdient echter een nadere bespreking.

Het is het reeds genoemde geval, waarbij een uit Groningen verkregen intermedius bij de eerste controle behalve enkele intermedius-kolonies een groot aantal met een onmiskenbaar mitis-karakter bleek op te leveren (fig. 20). Het leek dus aanvankelijk of een intermedius door herhaald overenten in een mitis was overgegaan. Ware dit het geval, dan zou men geneigd zijn de conclusie te trekken, dat het intermedius-type slechts een adaptieve vorm is. Enkele kolonies met een typisch mitis-karakter werden afgeënt en verder onderzocht. *Het bleek echter bij superisolatie, dat de op deze wijze verkregen stam zijn intermedius-vorm had behouden.* De bekende platte kolonies kwamen op deze wijze weer voor de dag (fig. 21). Het mitis-karakter bij een bepaalde concentratie van kolonies had dus geen andere betekenis dan die van een fluctuatie. Trouwens dit verschijnsel werd ook bij andere intermedius-stammen wel eens een enkele keer waargenomen. Het is een voorbeeld, hoe een bepaalde eigenschap van een cloon op die van een ander type kan gelijken, zonder dat men daarom tot de slotsom mag komen, dat de cloon in het andere type veranderd is. Hier kon nog juist het bewijs geleverd worden, dat in wezen de stam nog tot het oorspronkelijke type behoorde. Het geheel is echter weer een aansporing om kritisch tegenover velerlei bacteriële veranderlijkheid te staan.

§ 6. Atypische stammen.

De meeste schrijvers vermelden een, in het algemeen klein, aantal stammen, die door hen niet in een van de drie door ANDERSON e.a. gevonden groepen konden worden ingedeeld.

Terecht merkten ANDERSON e.a. (1933) op, dat het niet zou corresponderen met wat over andere bacteriegroepen bekend is, indien niet af en toe atypische stammen werden gevonden.

Het is reeds gezegd, dat individuen, die tot hetzelfde ras behoren, nog niet precies op elkaar behoeven te gelijken.

Indien men de bacteriecloon als één enkel individu opvat, dat door allerlei invloeden van buiten kan worden veranderd, dan verwondert men er zich geenszins over, dat sommige individuen afwijkingen van de zogenaamde kenmerkende eigenschappen gaan vertonen.

Eerder kan men zich er over verbazen, dat het aantal atypische stammen in het algemeen zo gering is. ROBINSON (1935) gaf een overzicht van 1833 door verschillende schrijvers onderzochte stammen. Hiervan waren slechts 36 (dus 2%) atypisch.

Vele schrijvers zijn spoedig geneigd de stammen, die hun bij de typering moeilijkheden opleveren, atypisch te noemen. Zo konden MENTON e.a. aanvankelijk 31,6% niet classificeren. Zij hechtten echter te veel waarde aan de groei in bouillon, haemolyse en andere eigenschappen van ondergeschikt belang. Indien men slechts die stammen telt, bij wie de kolonievorm niet correspondeerde met de biochemische reacties, dan blijkt slechts 8% van hun stammen atypisch te zijn. ROBINSON en MARSHALL twijfelen er aan, of zelfs dit gecorrigeerde percentage van MENTON e.a. niet te hoog is.

Als een ander uiterste kan hier het onderzoek van ROBINSON worden genoemd. Deze schrijver, die met zijn medewerkers naast de Leedse school wel het meest heeft bijgedragen tot de kennis van de typen van de diphtheriebacil, vond in 1935 op een totaal van 940 stammen slechts één, die hij niet kon classificeren.

Indien wij aannemen, dat de waarnemingen van WRIGHT en CHRISTISON juist zijn ¹⁾, dan hebben zich in Edinburg enige „atypische” bacterie-individuen verspreid. De beide onderzoeksters achtten zich gerechtigd op grond hiervan nieuwe „typen” in te voeren. Eén zo’n nieuw „type” bestond uit gravis-stammen, die als enige merkwaardigheid hadden, dat zij avirulent waren. Dat men dergelijke *atropheonten* niet als een apart type mag beschouwen, behoeft na het voorgaande geen verder betoog. ²⁾

¹⁾ Hun waarnemingen gingen namelijk gepaard met de reeds beschreven moeilijkheden met het pepton „Parke, Davis & Co.”.

²⁾ CARTER nam onlangs waar, hoe zich een dergelijke *atropheont* in korte tijd kan verbreiden.

Hetzelfde geldt voor de door WRIGHT en CHRISTISON gevonden gravis-stammen, die geen stijfsel meer omzetten. Ook andere onderzoekers hebben wel eens een dergelijke waarneming gedaan. ROBINSON en PEENEY (1936) konden aantonen, dat dergelijke stammen tot een van de serologische groepen van het gravis-type behoorden. Reden te meer ook deze gevallen als *atropheonten* te beschouwen.

Een enkel woord moet nog gezegd worden over stammen met mitis-kolonies en positieve stijfselreacties. WRIGHT en CHRISTISON beschrijven er enkele, „which were rather smooth”. De vraag rijst, of vele van dergelijke atypische stammen niet identiek zijn met de beschreven stam „Amsterdam XXXI”.

Indien werkelijk stammen mochten worden gevonden, die ook bij superisolatie mitis-kolonies te zien geven en toch de stijfsel omzetten, dan hoeft ons dit geenszins te verbazen. Bij de beschrijving van de CHRISTISON-varianten is de theoretische betekenis van dergelijke afwijkingen reeds beschreven. Het is ongeoorloofd ze als een nieuw type te beschouwen, terwijl ze evenmin het bewijs leveren, dat de typen mitis en gravis slechts „pseudotypen” zijn.

In 1934 heeft ROBINSON een atypische stam gevonden, die een mengeling van gravis, mitis en twijfelachtige kolonies te zien gaf. Slechts de cultures, die verkregen waren van de gravis, en de twijfelachtige kolonies, zetten de stijfsel om. De van mitis-kolonies afkomstige kweken deden dit slechts in enkele gevallen. Na 10 dagen was het aantal mitis-kolonies zeer sterk vermeerderd; er waren toen nog slechts enkele twijfelachtige kolonies, waarvan één stijfsel omzette. Van 10 mitis-kolonies zetten 2 stijfsel om. Bij een derde proef, 8 dagen later genomen, werden alleen mitis-kolonies verkregen. Geen enkele zette stijfsel om. Nog een week later verkreeg hij hetzelfde resultaat. Met de eenmaal afgeleide stammen verkreeg hij eveneens allerlei veranderingen en overgangen. Alle stammen bleven virulent.

Inderdaad lijkt het of hier een stam gevonden is op het ogenblik, dat hij tussen het gravis- en mitis-type in labiel evenwicht verkeerde. Indien dit werkelijk het geval geweest is, moet men tot de conclusie komen, dat de typen gravis en mitis slechts adaptaten zijn. Alvorens men echter op grond van deze éne waarneming tot een dergelijke gewichtige slotsom mag komen, moet men volledige zekerheid hebben. Indien men de beschrijving van ROBINSON leest, denkt men onwillekeurig aan de mogelijkheid van een symbiose. In een dergelijk geval moet het werken met één-celcultures als een eis worden gesteld. Men bedenke, dat indien EAGLETON en BAXTER indertijd hun exacte waarnemingen niet hadden gedaan, men zou zijn blijven geloven,

dat het herhaalde malen voorkomt, dat de diphtheriebacil saccharose vergist. Voorzichtigheid is dus geboden.

§ 7. De onderverdeling van de typen.

Het behoeft ons niet te verwonderen, dat na de op zichzelf reeds zo belangrijke ontdekking van de Leedse school, van verschillende kanten pogingen gedaan zijn, om tot een verdere differentiëring van de diphtheriebacil te komen. Enige onderzoekers, die zich met het onderwerp bezig hielden, bemerkten bij de bewerking van hun stammen, dat verschillende cultures, die wel is waar tot hetzelfde type behoorden, toch min of meer belangrijke verschillen in cultureel of serologisch gedrag vertoonden. Vooral in verband met het theoretische belang zullen hier enkele van deze waarnemingen besproken worden.

a. Serologische onderverdeling.

De eerste, die zich met de serologische onderverdeling van de typen heeft beziggehouden, was Miss ORR EWING (1933). De grote moeilijkheid bij dit onderzoek was het verkrijgen van onveranderlijke suspensies van gravis-organismen. EWING gebruikte hiervoor een bepaalde door haar gevonden techniek. Verder werd met konijnensera geagglutineerd. 106 Gravis-stammen ¹⁾, uit geheel verschillende streken afkomstig, waren in 5 verschillende serologische groepen te verdelen; 50 stammen, die geen stijfsel omzetten, bleken niet met de gravissera te agglutineren. In enkele gevallen verkreeg zij kruisagglutinaties. Absorptieproeven lieten de specifieke titer echter steeds onaangetaast. Op gelijke wijze onderzocht zij 15 intermedius-stammen eveneens uit verschillende streken afkomstig; deze bleken in twee groepen uiteen te vallen; 35 mitis-stammen waren in vier serologische groepen te verdelen, 8 werden niet geclassificeerd.

CARTER (1936) kwam tot de conclusie, dat de gravis-stammen in Glasgow tot verschillende serologische typen behoorden.

MURRAY (1935) onderzocht de serologische eigenschappen van 250 diphtheriestammen. Het bleek hem, dat voor een juiste serologische classificatie absorptieproeven van agglutinenen volstrekt noodzakelijk zijn ²⁾. Op deze wijze slaagde ook hij er in aan te tonen, dat de gravis-

¹⁾ Van deze stammen waren 61 afkomstig van de Greenwich Hospital School (onderzoek van DUDLEY e.a.). Deze bleken allen tot hetzelfde serologische type te behoren.

²⁾ MAIR verkreeg niet een dergelijke strenge verdeling. Hij deelt echter niet mee absorptieproeven verricht te hebben en ging ook de kolonievorm niet na.

mitis- en intermedius-typen serologisch van elkaar verschillen. Ieder type was op zijn beurt weer in serologische „sub-typen” te verdelen. Van belang was zijn vondst, dat de stammen, die van grote centra afkomstig waren, meestal ook tot één enkel serologisch „type” behoorden. Dergelijke waarnemingen pleiten voor de nog nader te bespreken gedachte, dat een bepaald bacterie-individu binnen een zekere gemeenschap zich kan verspreiden en daar de verantwoordelijkheid voor de epidemie draagt. In meer landelijke streken kon hij het predomineren van bepaalde serologische „sub-groepen” niet vaststellen. „The wider the area, the less homogeneous the serological grouping”.

Van belang is ook hier weer het werk van ROBINSON, ditmaal in samenwerking met PEENEY verricht. Zij verzamelden 739 gravis-stammen, uit allerlei plaatsen van de gehele wereld afkomstig. Deze waren in 5 verschillende serologische groepen te verdelen. In Groot Brittannië en Ierland bleek het serologische „type” I zeer veel voor te komen. De stammen afkomstig van het vaste land van Europa, Canada en U.S.A. bleken bijna allen tot het serologische „type” II te behoren. In Massachusetts in U.S.A. vond hij, dat de 10 gravis-stammen, die hem van daar gezonden waren, tot een apart serologisch type behoorden, dat nergens anders voorkwam. Dit „type” correspondeerde evenmin met een van de vier door ORR EWING gevonden groepen.

Men moet voorzichtig wezen met het trekken van de conclusie, dat het overheersen van een bepaalde serologische „sub-groep” in Engeland als de oorzaak beschouwd moet worden van de aldaar gevonden bijzonderheden van het gravis-type. Het materiaal van ROBINSON is namelijk enigszins eenzijdig samengesteld. Van de door hem onderzochte stammen zijn 207 alle uit Manchester afkomstig. Let men in zijn statistiek niet op de getallen, maar beschouwt men de uit iedere plaats afkomstige stammen, die tot één serologisch type behoren gezamenlijk als één individu, dan verkrijgt men het resultaat, dat 15 individuen tot „type” I behoren, 6 individuen tot „type” II, 7 individuen tot „type” III en 3 individuen tot „type” IV. Beziet men zijn cijfers op deze wijze, dan komt men eerder tot de conclusie, dat juist in Engeland de verschillende serologische groepen vrij gelijkmatig zijn verdeeld. Juist dit land moet dus bijzonder geschikt zijn om de hoedanigheden van het gravis-type te bestuderen, daar men hier minder de kans heeft zich op een bepaald serologisch geïdentificeerd individu blind te staren.

b. Onderverdeling op grond van kleine verschillen in culturele eigenschappen.

ORR EWING had reeds bij haar serologische proeven bemerkt, dat stammen, die tot een bepaald serologisch „sub-type” behoorden, soms door eigenaardigheden van hun kolonievorm reeds voor het oog te herkennen waren.

ROBINSON en PEENEY konden deze waarneming bevestigen. Het bleek, dat de stammen, die tot hun typen I en II behoorden, ook de klassieke „daisy-head” kolonievorm hadden, terwijl cultures, die van de andere „sub-typen” deel uitmaakten, een kolonievorm vertoonden, die meer een „smooth”-karakter had. MURRAY had reeds op grond van deze verschillen in kolonievorm bij het gravis-type een verdeling in „sub-groepen” voorgesteld. Hij bemerkte bovendien, dat er ook verschillen bij sommige intermedius-stammen te zien waren. Van sommige verkreeg hij namelijk een kolonievorm, die onder de illuminator een randreflex vertoonde, van andere cultures daarentegen niet.

Bij mijn eigen onderzoek vond ik eveneens de reeds genoemde verschillen tussen de gravis-stammen, die in Amsterdam gevonden werden en de uit Rotterdam en Leeds afkomstige. De eersten waren meer „smooth” en vereisten een sterke isolatie om duidelijke „gravis-kolonies” op te leveren.

Bij de intermedius-stammen, die ik tot mijn beschikking had, was met behulp van de illuminator eveneens een onderverdeling, zoals MURRAY die gemaakt had, mogelijk. Dank zij het feit echter, dat de tafel, waarop de PETRI-schalen gezet werden, hoger en lager geplaatst kon worden, kon ik constateren, dat bij de verschillende stammen het al of niet ontstaan van deze reflex alleen van de hoogte van het tafeltje afhankelijk was. Van principiëel belang is deze waarneming van MURRAY dan ook niet. Hoogstens heeft men hier te doen met kleine individuele verschillen tussen de onderzochte stammen. Soortgelijke waarnemingen deed ik ook bij enige mitis-cultures.

Zoals reeds is gezegd, was het hierdoor soms mogelijk de gelijke herkomst van enige stammen vast te stellen.

Een enkel woord moet nog gesproken worden over de mening van VON BORMANN (1937). Deze schrijver is van oordeel, dat juist het vinden van de zogenaamde „overgangsvormen”, dat zijn dus de reeds besproken gravis-stammen, die meer „smooth” groeien en in hun kolonievorm meer op het mitis-type kunnen gaan gelijken, er op wijst, dat de verdeling in mitis, gravis en intermedius, gewrongen is en

dat men hier met „von den äusseren Einwirkungen abhängige Para-variationen” te doen heeft. VON BORMANN vermeld echter niet de onderzoeken van de Engelse schrijvers, waaruit juist gebleken is, dat deze „overgangsvormen” eigen serologische kenmerken hebben, terwijl zij bovendien in hun verschijningsvormen in grote mate constant zijn.

Het feit, dat de typen gravis, mitis en intermedius, ieder weer in onderling verschillende groepen zijn te verdelen, doet mij tot een geheel andere slotsom dan VON BORMANN komen.

Waren namelijk alle gevonden gravis-mitis- en intermedius-stammen onderling geheel gelijk of bijna gelijk, dan zou men eerder geneigd zijn aan te nemen, dat deze typen in werkelijkheid aangepaste individuen, dus „pseudotypen” zijn. *Nu echter is gebleken, dat ieder van deze typen weer uit onderling verschillende elementen bestaat, kan dit eer een argument zijn voor de veronderstelling, dat de typen gravis, mitis en intermedius werkelijke rassen zijn.*

Immers binnen ieder ras verwacht men, als uitdrukking van fluctuerende variabiliteit, een aantal phaenotypische verschillen der isogene individuen, dat aan het ras (biotype of ondersoort) in zijn geheel een enigszins geschakeerd aanzien geeft.

HOOFDSTUK V.

ENKELE OPMERKINGEN OVER DE BETEKENIS VAN DE TYPEN VAN DE DIPHTHERIEBACIL VOOR DE EPIDEMIOLOGIE EN DE CLINIEK.

Het feit, dat de ontdekking van ANDERSON e.a. zo'n bijzondere belangstelling over de gehele wereld gewekt heeft, is zeker in de eerste plaats te danken aan het verband, dat zij gelegd hebben tussen de door hen gevonden bacteriologische typen en het verschillende klinische epidemiologische gedrag van de ziekte.

In 1931 opperden de Leedse onderzoekers de mogelijkheid, dat mitis de oorzaak zou kunnen zijn van de sporadische en endemische diphtherie, terwijl gravis de zeldzamer ernstige epidemische vorm zou veroorzaken.

De oplossing van dit vraagstuk is zeker niet gemakkelijk. De cijfers, die tot nu toe zijn verkregen, werden in het algemeen te weinig met het oog op de kennis van de epidemiologie bewerkt.

De wijze, waarop de vraag gesteld werd, kan bovendien tot misverstand aanleiding geven, daar in wezen ook de zogenaamde sporadische gevallen menigmaal als kleine epidemieën beschouwd kunnen worden. Daarbij lijkt het a priori onjuist aan te nemen, dat gravis alleen voor de epidemieën en mitis alleen voor de sporadische gevallen verantwoordelijk zou zijn. Het is beter zich af te vragen, of gravis zich in het algemeen makkelijker verspreidt dan mitis, en of dit type door zijn grotere aanvalskracht meer gevaar oplevert voor de volksgezondheid.

§ 1. Epidemiologische waarnemingen.

a. Letaliteit, mortaliteit en morbiditeit.

Het onderzoek van ANDERSON e.a. werd in sterke mate aangewakkerd door de verontrustend hoge *letaliteit* van diphtherie in Leeds.

Zij vroegen zich af, wat toch de reden kon zijn van het merkwaardige contrast tussen het aanvankelijke optimisme over de genezingskansen van de diphtherie en het, in de jaren vóór 1931, in verschillende plaatsen in Europa ontstane pessimisme ten aanzien van deze zelfde ziekte.

In hun eerste publicatie deelden zij mede, dat er een opvallend verschil was tussen het beloop van de door gravis en mitis veroorzaakte infecties. Zowel het percentage van de complicaties als van de sterfte was bij de gravis-gevallen aanzienlijk hoger dan bij de met mitis besmette patiënten.

Zij onderzochten 104 gevallen. Van de 63 door gravis geïnfecteerde patiënten stierven er 11; mitis daarentegen veroorzaakte in 35 gevallen geen enkele maal de dood. Ook de eerste zes door hen gevonden intermedius-infecties liepen alle goed af.

De Leedse onderzoekers mogen zeker van geluk spreken, dat zij ondanks het kleine aantal toch de sleutel in handen kregen.

In 1933 publiceerden zij de uitslag van een onderzoek over 562 gevallen van diphtherie. Van 425 gravis-patiënten stierven er 13.1%, van de 24 intermedius-patiënten 8.7% en van de 113 mitis-patiënten geen enkele.

Ten aanzien van de frequentie van de complicaties kregen zij overeenkomstige percentages.

Van talrijke zijden zijn, na de publicaties van de Leedse onderzoekers, gegevens binnengekomen. Zoals te verwachten was, vertoonde ieder onderzoek, dat over een betrekkelijk klein aantal gevallen ging, kleinere en grotere variaties in de letaliteit. Het spreekt van zelf, dat alleen zeer grote getallen van verschillende streken afkomstig ons kunnen inlichten over de gevaarlijkheid van de verschillende typen voor de mens. In een bepaalde landstreek of stad kunnen factoren werken, die een juiste beoordeling onmogelijk maken.

Daar de pathogeniteit van de diphtheriebacil een veranderlijke eigenschap is, bestaat de kans, dat een bepaalde individuele gravis-stam, die in een zeker gebied overheerst, in aanvalskracht vermindert, terwijl een mitis-stam daar ter plaatse in virulentie kan toenemen.

Beschouwt men de bacteriecloon als een individu¹⁾, dan kan men zich voorstellen, hoe een dergelijk individu van een bepaalde gemeenschap als het ware bezit kan nemen. Beoordeelt men dan alleen in die gemeenschap het epidemiologische gedrag van de ziekte, dan bestaat de mogelijkheid, dat men door een ietwat afwijkend gedrag van dat toevallig aanwezige bacterie-individu een foutieve voorstelling krijgt van de werkelijke eigenschappen van de soort, waartoe dat individu behoort.

Indien men het type als een afzonderlijk ras beschouwt (zie Hoofd-

¹⁾ Vgl. VAN LOGHEM (1920 enz.).

stuk IV) dan houdt dit tevens in, dat het ras is opgebouwd uit verschillende, op elkaar gelijkende en genotypisch identieke individuen. In hun verschijningsvorm kunnen deze individuen echter belangrijke verschillen vertonen.

Ik wees reeds op de waarschijnlijkheid, dat ieder van de drie diphtherie-typen een verzameling is van, weer onderling in serologisch en ander opzicht, verschillende individuen. Zou men in staat zijn een bepaald bacterieras, b.v. het gravis-type, in individuen te ontleden en aan de aanvalskracht van ieder individu een maat te geven, dan zouden deze maten naar alle waarschijnlijkheid een curve van QUETELET vormen.¹⁾ Men moet bij de beoordeling van dit vraagstuk uitsluitend rekening houden met het gemiddelde, dat in deze curve tot uitdrukking komt. Het is fout zich blind te staren op een toevallige variant, waarmee men in eigen kring te doen heeft.

Het is dus weinigzeggend, of onderzoeker A. 100 en onderzoeker B. 1000 stammen heeft onderzocht. Wanneer het materiaal van A. afkomstig is van een groot aantal verschillende bacterie-individuen, terwijl de stammen van B., zoals dat bij een plaatselijke epidemie mogelijk is, van slechts één bacterie-individu afkomstig zijn, dan zal onderzoeker A. met zijn veel geringer aantal stammen toch meer van de eigenschappen van het te onderzoeken ras afweten dan B. met zijn schijnbaar doorslag gevende grote cijfers.

In de beginne schenen PARISH e.a. (1932) en WRIGHT en RANKIN (1932) dan ook met recht te kunnen beweren, dat de te Leeds gevonden feiten op een lokaal verschijnsel berustten. Op dit onjuist gebleken oordeel zijn zij later teruggekomen. De Leedse onderzoekers hadden geluk gehad.

In 1936 publiceerde de school van MCLEOD (COOPER e.a.) een overzicht over wat met het type-onderzoek ten aanzien van het letaliteitsvraagstuk bereikt was. Ze verzamelden in het geheel 5794 gevallen, uit talrijke plaatsen in Engeland en Duitsland afkomstig. De uitkomsten werden door hen in de volgende tabel vastgelegd:

¹⁾ In verband hiermee is de mededeling van STUART (1938) interessant. Deze vond bij een bepaalde serologische „sub-groep” van het gravis-type een mortaliteit van 13%; bij een andere serologische „sub-groep” daarentegen 2%. Aldus zou statistisch het bewijs kunnen worden geleverd, dat verschillende individuele clonen, behorende tot hetzelfde type, zich verschillend kunnen gedragen. Men lette dus niet teveel op toevallige locale omstandigheden, daar het er alleen op aankomt of de gemiddelde aanvalskracht van een bepaald type al of niet hoger is.

TABEL II.

Type	Aantal gevallen	letaliteit
gravis	2313	13,3%
intermedius	1993	8,6%
mitis	1488	2,3%
Totaal	5794	

Wanneer men de uitslag van deze bijna zesduizend onderzoeken beschouwt, moet men tot de conclusie komen, dat de letaliteit van het gravis-type het hoogste en van het mitis-type het laagste is. *Intermedius staat tussen deze beide in.*

Bekijkt men de cijfers van de verschillende plaatsen en streken afzonderlijk, dat ziet men vaak aanzienlijke afwijkingen van het gemiddelde. Zo zijn de, in de tabel van COOPER e.a. opgenomen, getallen van CARTER uit Glasgow gedurende 1932—'33 als volgt:

TABEL III.

Type	Aantal gevallen	Letaliteit
gravis	14	7,1%
intermedius	396	4,9%
mitis	125	7,2%

Men beoordele dergelijke cijfers dus niet afzonderlijk, maar neme ze slechts op in de grote statistiek.

Ook een onevenredig groot aantal gevallen van een type met een abnormaal lage of hoge letaliteit, zoals bijvoorbeeld PREUNER vermeld heeft, neme men niet in de statistiek op, daar één toevallig waargenomen bacterie-individu op deze wijze het evenwicht zou kunnen verstoren. Hoogstens mag in een dergelijk geval van ieder type een ongeveer gelijk aantal worden opgenomen. Het betrouwbaarste is die statistiek, die uit vele, onderling zo gelijk mogelijke, eenheden is opgebouwd.

De cijfers van TIMMERMAN e.a., zouden doen vermoeden, dat in Nederland, de door gravis veroorzaakte diphtherie in het algemeen een goedaardig beloop heeft. Van 370 patiënten stierven er 12 of 3,2%.

Deze 12 sterfgevallen waren als volgt verdeeld. Gravis-type: 8 van 184 = 4,3%; intermedius-type: 1 van 94 = 1,1%; mitis-type: 3 van 81 = 3,7%. Zij zouden hieruit willen opmerken, dat er geen aanwijzing is, dat infecties met het gravis-type zoveel gevaarlijker zijn, dan die met het mitis-type. Verder onderzoek zal moeten uitmaken of dit inderdaad voor Nederland het geval is. In ieder geval zijn de cijfers voor ons land op dit oogenblik te klein om hieruit met zekerheid gevolgtrekkingen te kunnen maken.

COOPER e.a. hebben ook ten aanzien van de *mortaliteit* belangrijke gegevens verzameld. Hieruit bleek, dat in plaatsen als Nottingham (1931—'34), Kopenhagen (1931—'32), Staffordshire (1932—'34) en Newcastle (1933—'34), waar het aantal mitis-gevallen overheerste, de mortaliteit zeer laag was, n.l. 2 tot 5 per 100.000 zielen.

In plaatsen als Edinburg (1932—'34), Dundee (1932—'38), Glasgow (1932—'33), Hull (1935), Manchester (1932—'33), waar het meest intermedius-stammen gevonden werden, was de mortaliteit iets hoger, n.l. 5 tot 11 per 100.000 zielen.

In plaatsen als Berlijn (1934), Manchester (1934), Leeds (1931—'35), Cork (1932—'35), Dublin (1933) en Hull (1931—'33), waar het aantal gravis-gevallen overheerste, was de mortaliteit het hoogst, n.l. 11 tot 33 per 100.000 zielen.

Uit deze cijfers zou men de conclusie kunnen trekken, dat, wat te verwachten is, *tussen de mortaliteit en de diphtherietypen hetzelfde verband bestaat als met de letaliteit het geval is.*

Beziet men enige Nederlandse cijfers, die in Tabel IV zijn verzameld, dan moet men tot de conclusie komen, dat de mortaliteit en letaliteit niet geheel zuiver correleren. Hieruit blijkt echter nog geenszins, dat de mening van COOPER e.a. onjuist is. Immers aan de geringe verschillen, zoals die in tabel IV tot uitdrukking komen, hechten ook zij geen betekenis.

TABEL IV.

	1929	1930	1931	1932	1933
morbiditeit (per 100.000 inwoners)	61,1	93,1	71,2	66,9	53,3
mortaliteit (per 100.000 inwoners)	4,0	5,5	3,9	3,0	2,4
letaliteit (per 100 ziektegevallen)	6,5	5,9	5,5	4,4	4,5

VON BORMANN is van oordeel, dat indien gravis een hogere letaliteit veroorzaakt dan de beide andere typen, en bovendien meer voor de epidemische diphtherie verantwoordelijk zou zijn, hiervan het noodzakelijke gevolg moet wezen, dat de curven van de *morbiditeit* en de *letaliteit* parallel lopen. Dit nu is geenszins het geval. In Berlijn werd de laagste morbiditeit bereikt in 1933, de letaliteit bedroeg destijds 8,2%. Het daarop volgende jaar daalde de letaliteit tot 5,8%, terwijl het aantal ziektegevallen gelijktijdig toenam. In 1925/26 bleef de letaliteit in Berlijn, ondanks het voortdurend afnemen van de morbiditeit, voortdurend hoog.

Ook hier moet tegen worden ingebracht, dat de verschillen van 2,4% in de letaliteit nog niet zo groot zijn, dat hieruit verstrekkende gevolgen kunnen worden gemaakt. Men bedenke, dat volgens de gegevens van COOPER e.a. het verschil in de letaliteit tussen mitis en gravis 11% bedraagt. Plaatselijke invloeden kunnen zich laten gelden en daarbij schommelt, zoals reeds eenige malen is gezegd, de letaliteit van de verschillende typen om een zeker gemiddelde. Verder is het zeer gevaarlijk uit niet geanalyseerde cijfers reeds van te voren een conclusie te trekken.

COOPER e.a. hechten zeer weinig waarde aan de morbiditeitscijfers, omdat in streek A slechts klinisch zekere gevallen van diphtherie in de statistiek worden opgenomen en de lichte gevallen niet, terwijl deze „bacterial cases” in streek B. wel als echte diphtherie worden beschouwd.

Trouwens in de moderne maatschappij zijn er talrijke redenen, waardoor morbiditeits-, letaliteits- en mortaliteits-curven uit elkaar kunnen lopen, zonder dat men hieruit vergaande conclusies mag trekken. Immers geen enkele epidemie, hoe klein ook, wordt aan zich zelf overgelaten. Men kan zich voorstellen, dat een hoge letaliteit de waakzaamheid van de medische ambtenaren doet verscherpen, waardoor het aantal herkende gevallen (de morbiditeit) stijgt. Ook zullen onder dergelijke omstandigheden meer maatregelen worden genomen en de behandelende medici sneller en meer serum inspuiten, terwijl de ouders eerder tot immunisatie van hun kinderen zullen zijn te bewegen.

Vrijwel nimmer laat men een epidemie tegenwoordig haar gang gaan. Veelal wordt kunstmatig ingegrepen.

Een ander punt van belang is gegeven door de schommelingen in de diphtherie tengevolge van verschijnselen van massale immuniteit. De onderzoekingen in ons land van TERBURGH zijn in dit verband met nadruk te noemen.

b. Het ontstaan van kleine epidemieën.

Het is in grote gemeenschappen zeer moeilijk een bepaald bacterie-individu te volgen, in het bijzonder omdat iedere cloon op zich zelf weer aan physiologische en pathologische veranderingen onderhevig is. Daarbij is men slechts zelden in de gelegenheid het bacterie-individu in zijn verspreiding van mens tot mens na te gaan.

Slechts een enkele maal is bij het type-onderzoek van de diphtherie-bacil een onderzoeker in staat geweest de verspreiding van een bacterie-individu gedurende korte tijd te kunnen volgen. Dit zijn de gevallen, waarbij plotseling een kleine epidemie in een kleine gemeenschap uitbrak. DUDLEY, MAY en O.FLYNN (1934) namen een gravis-epidemie van 146 gevallen waar in de Greenwich Hospital School. ANDERSON e.a. en ROBINSON en MARSHALL delen mee, dat in de meeste gevallen, waar kleine epidemietjes uitbraken, het gravis-type hiervoor verantwoordelijk was. GUNDEL (1936) beschrijft een gravis-epidemie in de stad Brandenburg. De eerste 290 gevallen van deze epidemie in deze kleine stad waren alle gravis-infecties. Pas nadat de epidemie ongeveer een jaar geduurd had, werden twee intermedius-gevallen gevonden. In 13 van de 17 kleine gemeenten in de Mark Brandenburg vond GUNDEL alleen gravis. In één uitsluitend mitis en in ander uitsluitend intermedius. De twee andere dorpen vertoonden een gemengd beeld. PIASECKA-ZEYLAND (1933) vond in Posen alleen het gravis-type (300 cultures). SCHIFF en WERBER ontdekten na afloop van hun onderzoek te Berlijn, dat de intermedius-stammen allen uit een bepaald stadsgedeelte afkomstig waren. HORNUNG (1936) vond 190 gravis-gevallen in een plaatsje van 991 inwoners. CHRISTISON (1934) kwam tot de conclusie, dat in streken, waar de diphtherie in ernstige epidemische vorm voorkwam, het gravis-type predomineerde. TIETZ beschrijft een epidemie in een klein dorp van uitsluitend gravis-gevallen die allen uit één infectiebron afkomstig waren.

Inderdaad krijgt men uit vrijwel de gehele literatuur de indruk, dat gravis meer verantwoordelijk is voor de ernstige epidemische vorm van de diphtherie. Het lijkt echter zeer gevaarlijk de conclusie te maken, dat mitis zo weinig pathogeen zou zijn, dat tegen de dragers van dit bacterie-type geen maatregelen zouden behoeven te worden genomen (CLAUBERG). Er zijn reeds belangrijke waarnemingen, die tot grote voorzichtigheid aansporen. PERRY e.a. kwamen na hun onderzoek in MARYLAND U.S.A. juist tot de slotsom, dat in het door hen bestudeerde gebied mitis het besmettelijkst van al zou zijn.

Bekijkt men de cijfers van tabel VI dan blijkt hieruit, dat het

mitis-type in bepaalde gemeenten toch een groot aantal ziekte-gevallen heeft veroorzaakt.

Ook al zou men, uit de voor de beoordeling van deze zaken nog geringe en vaak onvolledige cijfers, de indruk krijgen, dat gravis voor de volksgezondheid het gevaarlijkst is, dan is er nog geen enkele reden om het gevaar van mitis te onderschatten.

Anders is het, wanneer men in een gemeenschap, waar gedurende geruime tijd slechts enkele lichte mitis gevallen voorkomen, plotseling een zeer pathogene gravis- of intermedius-stam zich gaat verspreiden. Hiertegen moeten zeker bijzondere maatregelen worden genomen.

Zo opent het type-onderzoek voor den epidemioloog-bacterioloog een nieuw arbeidsveld. Hij zal, indien hij zich geregeld met de bepaling der typen bezighoudt, in sommige gevallen het begin van de verspreiding van een gevaarlijk bacterie-individu kunnen constateren en in de gelegenheid zijn de Geneeskundige Dienst tot bijzondere waakzaamheid aan te sporen.

c. Het vermogen der typen, bij personen met een negatieve reactie van SCHICK, diphtherie te verwekken.

ROBINSON en MARSHALL, DUDLEY e.a., UNDERWOOD en COOPER e.a. hebben gevallen gepubliceerd van diphtherie bij personen, waarvan bekend was, dat zij tevoren een negatieve reactie van SCHICK hadden. Het bleek, dat hierbij in hoofdzaak gravis en intermedius een rol speelden. Het aantal onderzochte gevallen is nog te gering om tot een oordeel te kunnen komen. De waarnemingen steunen echter de opvatting, dat het gravis- en intermedius-type een grotere aanvalskracht voor de mens bezitten dan het mitis-type.

d. Verschillen der waarnemingen te Amsterdam en Rotterdam.

Met het voorgaande laat zich het verschillende epidemiologische gedrag van de diphtherie te Amsterdam en Rotterdam, zoals dit in de laatste jaren is opgemerkt, in verband brengen.

BRENKMAN, DE JONG, NEURDENBERG, PEETERS en HOESSEN (1934) hebben een studie gemaakt over de mogelijke oorzaken van het zoveel ernstiger beloop van de diphtherie te Rotterdam.

De cijfers in tabel V geven de morbiditeit, mortaliteit en letaliteit der beide steden gedurende de laatste jaren weer.

TABEL V. 1)

Jaar	Morbiditeit		Mortaliteit		Letaliteit	
	A'dam	R'dam	A'dam	R'dam	A'dam	R'dam
1926	111.79	45.16	1.92	3.00	1.7	6.6
1927	69.61	63.33	0.89	7.33	1.3	11.6
1928	62.30	92.16	3.07	10.83	4.9	11.8
1929	57.05	135.00	2.56	12.16	4.5	9.0
1930	80.38	220.66	1.66	12.83	2.0	5.8
1931	61.28	136.33	2.05	7.33	3.6	5.4
1932	80.00	116.50	2.43	5.00	3.0	4.3
1933	74.87	103.83	1.66	3.33	2.2	3.2
1934	44.48	94.33	1.41	3.33	3.1	3.5
1935	15.89	38.50	0.64	2.16	4.0	5.6

Het lijkt geen twijfel, dat tot dieper indringen in dit vraagstuk de typen van de diphtheriebacil door onderzoekingen op grote schaal mede in aanmerking zullen moeten worden genomen.

Mijn eigen onderzoekingen kunnen hiertoe nog weinig bijdragen. Ik heb slechts gedurende korte tijd enige steekproeven kunnen nemen. Hoewel ik dus aan mijn cijfers niet veel betekenis kan hechten, veroorloof ik mij op enige merkwaardigheden te wijzen.

Van 1 November 1935 tot 1 Mei 1936 kwamen in Amsterdam 47 gevallen van diphtherie voor. Het aantal doden bedroeg 5.

In Rotterdam was in dezelfde periode het aantal ziektegevallen 236; het aantal doden 17.

Wederom dus een hogere mortaliteit en morbiditeit te Rotterdam.

Van 1 November tot ongeveer de maand April vond ik bij de door mij te Amsterdam onderzochte personen, 46 met mitis-stammen²⁾ en slechts twee met een stam van het gravis-type. Eén daarvan was de reeds enige malen genoemde gravis-stam „Amsterdam XXXI”, die in de maand April een klein epidemietje verwekte. In Amsterdam

werd slechts één gravis-stam geïsoleerd van het classieke „daisy-head”-type.

In Rotterdam werden daarentegen 50 personen met gravis-stammen van het „daisy-head”-type gevonden, tegen slechts 6 personen met een mitis-infectie. Geen enkele stam droeg het karakter van de stam „Amsterdam XXXI”.

Wanneer men denkt aan het drukke verkeer tussen de beide steden, kan men zich erover verwonderen, dat een bepaald bacterie-type aldus tot één gemeente beperkt blijft. Dit komt overeen met talrijke waarnemingen, die in Engeland, Duitsland en Amerika gedaan zijn.

§ 2. Clinische waarnemingen.

a. Het verband tussen de typen en de ernst van de ziekte.

Hoewel het sterftecijfer gewoonlijk het meest exacte gegeven is voor een oordeel over de aanvalskracht van een bacterie ten aanzien van de mens, hebben de Leedse onderzoekers ook een onderscheid trachten te maken tussen de frequentie van lichte, middelmatige en ernstige gevallen bij welke de drie typen van de diphtheriebacil worden gevonden.

Het bezwaar van een dergelijke indeling is gelegen in de subjectiviteit bij de beoordeling van het ziektegeval.

LEETE, McLEOD en MORRISON (1933) gaven hiervoor de volgende criteria:

Lichte gevallen: Lichte laesies op één of twee tonsillen, geen toxaemie of adenitis. Benodigde antitoxinedosis: 4000 tot 8000 E.H.

Middelmatige gevallen: Uitgebreide membraanvorming op één of twee tonsillen met misschien lichte adenitis maar geen duidelijke toxaemie. Benodigde antitoxinedosis: ongeveer 16000 E.H.

Ernstige gevallen: Membraanvorming over de fauces, palatum molle en uvula met duidelijke adenitis en toxaemie. Antitoxinedosis 24000—88000 E.H.

Hoewel deze criteria, die practisch geheel overeenkomen met de gegevens van DE BIE, hier en daar aan scherpte te wensen overlaten, geven zij toch een zekere mate van houvast bij de classificering der ziektegevallen.

In tabel VI heb ik een aantal gegevens van verschillende publicaties verzameld. Niet alle schrijvers geven aan, dat zij zich aan de genoemde criteria gehouden hebben. Vele lieten dit waarschijnlijk aan de subjectieve beoordeling van den clinicus over.

¹⁾ Deze cijfers zijn ontleend en berekend uit de gegevens van BRENKMAN e.a. en de jaarverslagen van den Hoofdinspecteur van de Volksgezondheid.

²⁾ Hierbij 34 bacillendragers.

TABEL VI ¹⁾.

Schrijver	Plaats	GRAVIS				INTERMEDIUS				MITIS				Totaal	Hiervan overleden
		Licht	Middelmatig	Ernstig	Hiervan overleden	Licht	Middelmatig	Ernstig	Hiervan overleden	Licht	Middelmatig	Ernstig	Hiervan overleden		
ANDERSON e.a.	Leeds	13	21	18	11	2	3	1	—	20	11	1	—	90	11
ANDERSON e.a.	Leeds	144	151	85	50	10	10	3	2	63	31	8	—	505	52
ARTER	Glasgow	5	4	1	—	18	19	20	3	27	8	11	1	113	4
BETE e.a.	Hull	56	58	70	35	20	41	29	5	14	9	4	1	301	41
CHRISTISON	Berlijn	25	51	21	6	5	6	2	1	3	2	1	—	116	7
ROBINSON e.a.	Manchester	25	38	46	15	92	87	102	44	50	22	4	2	466	61
ROBINSON e.a.	Manchester	75	158	210	67	47	78	43	14	136	61	1	1	809	82
MURRAY	Dundee	8	—	—	—	68	3	18	10	49	5	2	2	152	12
MURRY e.a.	Maryland	4	7	3	2	18	56	26	2	41	52	41	11	248	15
ANNAHIL	Romford	116	72	68	24	44	9	31	12	21	6	7	2	374	38
WRIGHT en															
CHRISTISON	Edinburg	7	1	3	3	138	41	29	12	45	8	3	—	275	15
MUNDEL en															
REBETRUTH	Duitsland	40	45	28	12	5	6	0	1	13	7	7	1	151	14
TIMMERMANS e.a.	Nederland	96	59	29	8	56	29	9	1	47	22	12	3	359	12
	Totaal	614	665	582	233	523	388	313	107	528	244	102	24	3959	364
	Percentages	(33,0 %)	(35,7 %)	(31,3 %)	(12,5 %)	(42,7 %)	(31,7 %)	(25,3 %)	(8,7 %)	(60,4 %)	(27,9 %)	(11,6 %)	(2,7 %)		

Ook uit deze groep van cijfers volgt, dat het *gravis*-type een *grotere letaliteit en meer ernstige gevallen veroorzaakt dan mitis, terwijl intermedius er tussen in staat.*

Het is onjuist, om als VON BORMANN, op grond van enkele toevallige plaatselijke afwijkingen met een klein aantal gevallen, de stelling

¹⁾ De cijfers van sommige schrijvers moesten worden herleid of bijeengevoegd.

te verkondigen, dat er geen samenhang tussen het ziektebeeld en het type mag worden aangenomen ¹⁾.

De samenhang echter blijkt alleen uit de statistische gegevens. Voor de individuele prognose is de typering van de diphtheriebacil van ondergeschikte betekenis. Hier geeft, evenals voor de diagnose van de ziekte, het klinische beeld de doorslag.

Wanneer schrijvers zoals HILGERS en THOENES verklaren, dat het type van de diphtheriebacil van geen betekenis is voor de prognose en dat „mitis ebenso wie die anderen Typen als ein höchst virulenter Erreger in Erscheinung treten kann“, dan kan dit als een slag in de lucht worden opgevat. Iets van die aard is nimmer door de Leedse onderzoekers beweerd.

SCHLOSSBERGER (1935) vestigt er terecht de aandacht op, dat bij het ontstaan van een geval van diphtherie, evenals bij iedere infectieziekte, de specifieke verwekker slechts één van de factoren uitmaakt en dat dienovereenkomstig het ziektebeloop van een bepaald geval niet alleen afhankelijk kan zijn van het type, waartoe de verwekker behoort.

b. De typen en de complicaties bij diphtherie.

Uit de publicatie van COOPER e.a. overgenomen tabel VII blijkt, dat de werking van *gravis* en *intermedius* meer van toxische aard is. Het *mitis*-type geeft daarentegen meer plaatselijke verwikkelingen. Het aantal gevallen van larynxdiphtherie door dit type veroorzaakt is opvallend hoog.

TABEL VII.

Aard van de complicaties

Type	Aantal gevallen	haemorrhagisch	paralytisch	laryngeaal
gravis	2313	3.5%	17.0%	2.3%
intermedius	1993	3.7%	9.9%	1.3%
mitis	1488	0.4%	4.5%	7.5%
Totaal	5794			

De Nederlandse cijfers van TIMMERMAN e.a. komen hiermee in principe overeen.

¹⁾ Zo hebben ook OTTO en MITTAG (73 gevallen), HILGERS en THOENES (200 gevallen) en BECKER (137 gevallen) ten onrechte uit hun „statistieken“ conclusies getrokken.

c. De betekenis van de typen voor de serumtherapie:

Dadelijk na de ontdekking van de drie typen van de diphtheriebacil stelde men zich de vraag, of het toxine van de verschillende typen op gelijke wijze door het gewone antitoxine, dat meestal gemaakt wordt met behulp van de bekende stam „Park Williams 8”, werd geneutraliseerd.

PARISH e.a. (1932) waren de eersten, die dit onderzochten. Het bleek hun, dat het antitoxine „P. W. 8” de cavia op gelijke wijze, zowel tegen het gravis- als tegen het mitis-type beschermt. Door een ieder, die zich later hiermee bezighield, o.a. POVITSKY e.a., ANDERSON e.a., ETRIS e.a., GUNDEL e.a., is dit bevestigd.

Men mag dus aannemen, dat de drie typen niet verschillen in de aard van het door hen geproduceerde antitoxine.

Ook bij mijn eigen onderzoek kon ik dit steeds bevestigen.

ETRIS echter vond een kwantitatief verschil. Hij onderzocht hiertoe een aantal, uit geheel verschillende streken afkomstige gravis-stammen. Bij alle cavia's behoefde van het gravis-antitoxine minder ingespoten te worden dan van het „P. W. 8”-antitoxine.

Het is dus de vraag, in hoeverre men hiermee in de toekomst bij de bereiding van het antitoxine rekening zal moeten houden.

ANDERSON e.a. (1933) berichtten, dat de gravis-gevallen in het algemeen meer antitoxine nodig hadden dan mitis. Hoewel hierover verder weinig exacte gegevens bekend zijn, zal men, gezien de hogere mortaliteit, ook elders wel soortgelijke ervaringen hebben opgedaan.

ANDERSON e.a. (1933) zijn van oordeel, dat bij de typen een groot verschil in pathogeniteit bestaat voor de mens en het dier. Sommige mitis-stammen waren veel pathogener voor de cavia dan gravis. Zij vragen zich af, of men uit de resultaten, die men met het antiserum bij dieren krijgt, gevolgtrekkingen mag maken voor de mens. Verder opperen zij de mogelijkheid, dat het gravis-type juist bij de mens een endotoxine zou kunnen afscheiden, dat niet antigeen zou werken.

Belangrijk voor de practijk is de waarneming van PARISH en WRIGHT (1935), dat de hoeveelheid antitoxine, om veilig te zijn tegen gravis en intermedius, hoger is dan aangegeven wordt door de reactie van SCHICK. Op blz. 89 werd hierover reeds een opmerking gemaakt.

Voor den behandelenden arts blijft de oude regel gelden, dat, nadat de diagnose diphtherie klinisch gesteld is, niet op de uitslag van het laboratorium mag worden gewacht en onverwijld serum

moet worden ingespoten. Afwachten, totdat het type van de stam bekend is, is te allen tijde ongeoorloofd.

Te weten met welk type men te doen heeft, is voor de behandeling van het zieke individu van geen belang. Immers mitis kan de dood veroorzaken en een gravis-besmetting kan licht verlopen.

Het behoeft verder geen betoog, dat ook overigens slechts de toestand van de zieke voor de wijze van behandeling beslissend is.

d. Menginfecties bij dezelfde patiënt en de betekenis hiervan voor de verpleging in ziekenhuizen.

In het algemeen is het aantal beschreven gevallen waar bij dezelfde patiënt twee typen of een verandering van het type gevonden werd, opvallend gering. ANDERSON e.a. (1931 en '33) kunnen geen enkel geval vermelden. CARTER, MENTON e.a., PERRY e.a., TANNAHIL CHRISTISON e.a., ROBINSON e.a., konden ieder slechts hoogst enkele malen dubbele infecties vinden.

ROBINSON en MARSHALL, CHRISTISON, CLAUBERG, TIETZ, PREUNER en GUNDEL zijn allen van mening, dat indien twee typen of een verandering van het type bij dezelfde patiënt gevonden wordt, het zeer waarschijnlijk is, dat in het ziekenhuis een super-infectie heeft plaats gehad. Het bleek namelijk, dat bij patiënten, die thuis bleven, zich dergelijke veranderingen niet voordeden. PASCHLAU weet twee gevallen te vermelden, waarbij een verandering van het type plaats vond, zonder dat super-infectie mogelijk geweest zou zijn. Wanneer men echter bedenkt, dat het hier ging om geïsoleerde gevallen in een quarantaineinrichting, rijst de vraag of mogelijk zusters of behandelende artsen bacillendrager geweest zijn.

KEMKES en STEIGLER (1937) vonden bij 33 van de 104 in ziekenhuizen opgenomen kinderen een „verandering” van het type. Bij 39 thuis verpleegden konden zij in slechts 4 gevallen een wisseling vaststellen. Hun uitkomsten zijn echter niet geheel betrouwbaar, daar zij de kolonievorm op de leverextract-agar nagingen en gravis en mitis menigmaal met moeite konden onderscheiden. Ook onderzochten zij de omzetting van stijfsel niet.

Het uitvoerigste onderzoek over dit vraagstuk is door de onderzoekers te Leeds verricht. Ook hier had men de ervaring opgedaan, dat patiënten, die later een gemengde infectie kregen, meestal in barakken waren opgenomen, waar lijders aan diphtherie van verschillend type door elkaar lagen. COOPER e.a. lieten daarom voor hun verder onderzoek „single type wards” inrichten. De patiënten

werden eerst dan tot een dergelijke afdeling toegelaten, wanneer het type van hun infectie was bepaald. Het verplegend personeel stond onder voortdurende contrôle. Van de 30 gevallen, die in de „open” barak waren opgenomen, was bij herhaald onderzoek bij 12 een menging of verandering van de typen te constateren. De 57 gevallen echter, die in de „single type wards” gelegen hadden, vertoonden bij latere onderzoeken geen van allen een ander type dan bij binnenkomst.

COOPER e.a. maken uit deze gegevens de gevolgtrekking, dat de gemengde infecties of typeveranderingen te wijten zijn aan super-infecties in de ziekenhuizen. Zij achten het een punt van groot praktisch belang, dat men een patiënt, die met een betrekkelijk onschuldige mitis-infectie op de afdeling komt, niet als een bacillendrager met een gevaarlijke intermedius- of gravis-stam weer naar huis zend.¹⁾ Bovendien zal men moeten onderzoeken, of dergelijke super-infecties met stammen, waarvan wij nu met zeer grote zekerheid weten, dat zij meestal gevaarlijker zijn, ook nadelige gevolgen voor het ziektebeloop van de betrokken patiënt kunnen hebben.

Volgens GLASS en WRIGHT (1938) zou een super-infectie van weinig invloed zijn op het ziektebeloop van de patiënt. Zij onderzochten een serie van 246 patiënten. Bij ongeveer een derde vonden zij een „verandering” van het type. Het aantal patiënten, dat langer dan twee maanden in het ziekenhuis verbleef, bedroeg een derde van het totaal. Hiervan moest drie vierde geïsoleerd blijven, alleen omdat er nog diphtheriebacillen bij hen werden gevonden. Van deze „bacillendragers” had 80% zijn langdurige opname te danken aan super-infectie. De beweringen van GLASS en WRIGHT zijn mijns inziens nog niet bewijzend. Men zal natuurlijk eerst op grote schaal de uitkomsten van de „open” barakken met die van „single type wards” moeten vergelijken.

Een factor, waarmee zeker rekening moet worden gehouden, is hoelang men bacillendrager blijft na het herstel van de ziekte. Tot heden zijn de enige systematische onderzoeken hierover door CLAUBERG en PLATZ (1936) verricht. Deze onderzoekers hebben 700 bacillendragers in het bijzonder met het oog op de duur onderzocht. Hierbij bleek, dat van de personen met gravis 80% langer dan een maand en 30% langer dan 3 maanden bacillendrager bleef, met intermedius 50% langer dan een maand en 22% langer dan 3 maanden, met mitis 30% langer dan een maand en 4% langer dan drie maanden.

¹⁾ Zij twijfelen er namelijk bovendien aan of de gebruikelijke twee of drie negatieve LOEFFLER-cultures wel voldoende zijn om een patiënt veilig te ontslaan.

Al deze gegevens pleiten voor het instellen van „single type wards”. Men zal zich hierbij naar de plaatselijke omstandigheden moeten richten. Wanneer men vaststelt, dat ergens in een bepaalde gemeenschap, waar slechts lichte mitis-gevallen voorkomen, een foudryoante gravis- of intermediusinfectie zich gaat verbreiden of reeds verbreid heeft, dan zal zowel in belang van de gemeenschap als van de patiënten, het oprichten van „single type wards” als een eis moeten worden beschouwd.

HOOFDSTUK VI.

SAMENVATTING EN SLOTBESCHOUWING.

De onderzoekingen in de vorige bladzijden beschreven, werden verricht naar aanleiding van het werk van de Leedse onderzoekers ANDERSON, HAPPOLD, McLEOD en THOMSON, die in 1931 drie typen van de diphtheriebacil hebben onderscheiden. Tussen deze typen, *gravis*, *mitis* en *intermedius* genaamd en het klinische beloop van de diphtherie zou een verband bestaan.

Nadat in Hoofdstuk I een korte beschrijving is gegeven van de belangrijkste kenmerken van de soort *Corynebacterium diphtheriae*, worden in Hoofdstuk II de kenmerkende eigenschappen van de drie typen besproken, alsmede de bereidingswijze en het principe van de kweekgrond van McLEOD, die voorts met die van GUNDEL en TIETZ (1935) wordt vergeleken.

De illuminator van MURRAY (fig. 1, bldz. 21) wordt voor de beoordeling van kolonievormen onmisbaar geacht.

Voor de vervaardiging van preparaten bleek de fixatiemethode volgens KAPSENBERG (1935) in 10% formaline een grote verbetering.

Het verschil in celvorm kan als hulpmiddel bij het bepalen der typen dienst doen, doorslaande betekenis mag er niet aan worden gehecht.

Mede op grond van eigen onderzoek wordt Hiss'-serumwater met pepton van Parke, Davis & Co. voor het onderzoek van de vergisting van koolhydraten ongeschikt geacht. Aanbevolen wordt de hier te lande gebruikelijke kweekgrond, bestaande uit water met 1% pepton „Witte”, ½% NaCl, 4% lakmoes en 1% koolhydraat.

De omzetting van stijfsel door het *gravis*-type wordt als een zeer belangrijk kenmerk beschouwd.

Voor het onderzoek van het haemolytische vermogen wordt de zogenaamde HAMMERSCHMIDT-methode (die juist door HAMMERSCHMIDT ongeschikt werd geacht), aan critiek onderworpen. Indien het buisje bouillon aanstonds, nadat er twee druppels konijnen- of geitebloed aan zijn toegevoegd, wordt geënt, veroorzaakt *intermedius* ook haemolyse, echter 1 of 2 maal 24 uur later dan de vertegenwoordigers van de andere typen gewoonlijk doen.

Mede op grond van eigen bevindingen worden de groeiwijze in bouillon en de verandering van de waterstof-ionenconcentratie als onzekere kenmerken beschouwd.

Voor het onderzoeken van de pathogeniteit van de diphtheriestammen wordt voor de intracutane methode het gebruik van een 1 maal 24 uur oude bloed-bouilloncultuur of eventueel een suspensie in gewone bouillon aanbevolen. Zoutsolutie oefent een nadelige werking op de pathogeniteit uit.

Bij het bepalen van een aantal Nederlandse stammen naar hun type (Hoofdstuk III), werd een stam („Amsterdam XXXI”) gevonden, die duidelijke *mitis*-kolonies vormde, doch de biochemische eigenschappen van het *gravis*-type bezat (fig. 5). Door een „superisolatie” van de kolonies kwam een kolonievorm voor de dag, die evenzeer aan het *gravis*-type deed denken (fig. 6 en 7).

Een kolonie mag eerst dan „supergeïsoleerd” heten, indien niet meer dan vijf, hoogstens tien kolonies op één plaat voorkomen en indien om de kolonie heen, in een straal van anderhalve centimeter, geen andere kolonies zijn gegroeid. Verschillende stammen van het *mitis*-type werden gevonden, waarbij dank zij de illuminator kleine verschillen in de kolonievorm te zien waren (fig. 8). Bij „superisolatie” vielen deze verschillen weg. Bij het onderzoek naar de veranderlijkheid van de typen bleek de methodiek van de „superisolatie” enige malen onmisbaar voor een juiste interpretatie.

Een poging werd gedaan iets naders te onderzoeken over de invloed, die de kolonies onderling op elkaar uitoefenen. Hiertoe werden 1 maal 24 uur oude *gravis*-kolonies met een stukje voedingsbodem uitgesneden en overgebracht op een kweekgrond, die in tweeën was verdeeld en van welke de éne helft reeds met een brede *gravis*-cultuur was begroeid. Het volgende bleek: hoe groter het uitgesneden voedingsbodempje, des te sterker de kolonie zich ontwikkelde (fig. 11 en 12); indien het voedingsbodempje echter in contact werd gebracht met de omgevende agar, dan werd de groei van de kolonie temidden van de *gravis*-cultuur vrijwel geheel belemmerd; daarentegen groeide de kolonie in contact met maagdelijke agar goed uit (fig. 13). Behalve een tekort aan voedingsstoffen, oefenen dus ook de dissimilatie-producten een nadelige invloed uit.

Bij proeven op Liebig-bouillon-agar bleek, dat alle typen, behalve de voor hen karakteristieke vormen, zeer kleine kristalvormige kolonies te zien gaven, die als een involutievorm moeten worden beschouwd (fig. 14). HAMMERSCHMIDT heeft deze involutievorm ten onrechte voor het *intermedius*-type aangezien.

Een vergelijking van de kweekgronden van McLEOD en GUNDEL viel in het nadeel van de laatste uit, in het bijzonder, omdat op deze intermedius vaak met moeite van mitis te onderscheiden was (fig. 9 en 10). Voor het onderzoek van de veranderlijkheid van de typen was de voedingsbodem van GUNDEL enige malen onbruikbaar.

Prof. J. W. McLEOD stelde 6 stammen ter beschikking, die tot vergelijkingsmateriaal voor het verdere onderzoek dienden.

In het tijdvak van 1 November 1935 tot Mei 1936 zijn 90 Amsterdamse stammen onderzocht; 17 stammen, afkomstig van 7 patiënten en 5 bacillendragers behoorden tot het gravis-type; 73 stammen afkomstig van 12 patiënten en 34 bacillendragers behoorden tot het mitis-type. Intermedius werd niet gevonden. De eerste gravis-stam geleek volkomen op het Engelse gravis-type; de anderen waren identiek met de reeds besproken stam „Amsterdam XXXI”. Hiervan werd tot April slechts één vertegenwoordiger gevonden, daarna verwekte dit bacterie-individu een klein epidemietje.

Herhaalde onderzoeken bij denzelfden patiënt leverden steeds weer stammen van hetzelfde type op.

Uit Rotterdam werden 63 stammen ontvangen afkomstig van 56 patiënten, waarvan 50 met gravis en 6 met mitis besmet bleken. Deze gravis-stammen geleken allen op de Engelse. Intermedius werd niet gevonden.

Van 5 stammen, afkomstig uit Groningen, waar diphtherie in die tijd zeer sporadisch voorkwam, behoorden 3 tot het intermedius- en 2 tot het mitis-type.

De biochemische reacties vertoonden geen afwijkingen van de door de Leedse onderzoekers gegeven normen. Atypische stammen werden niet gevonden.

In Hoofdstuk IV worden de typen van de diphtheriebacil uit genetisch oogpunt beschouwd. Zijn de „typen” op te vatten als *rassen*, d.w.z. van verschillende genotypische constitutie, of zijn zij verschillende *verschijningsvormen* van één soort?

Schrijver sluit zich aan bij de voorstelling van hen, die ook voor de microben de standvastigheid van de soort aanvaarden. De *genotypische constitutie* omvat de erfelijke aanleg van alle eigenschappen; de *phaenotypus* is het resultaat van de ontwikkeling van de aanleg onder invloed van het milieu. Aanvaardt men als bacterie-individu de voortgroeïende cloon, dan zijn de meeste groeiwijzen, waaronder wij een uit één cel voortgekweekte „bacteriestam” ontmoeten, als adaptatietoestanden van dat individu, kortweg als *adaptaten*, te beschouwen. De phaenotypus van een bacterie is de totaliteit van zijn adaptaten (VAN LOGHEM).

Hebben de „typen” van de diphtheriebacil een verschillende genotypische constitutie, of zijn zij gefixeerde adaptatietoestanden (*fixaten*)?

Gewaarschuwd wordt tegen een foutieve interpretatie van schijnbare veranderlijkheid. De stam dient op agar zuiver gekweekt; superisolatie moet in sommige gevallen worden toegepast. (fig. 20 en 21).

Het is gebleken, dat de drie typen wel zeer standvastig zijn. Hoewel sommige stammen experimentele veranderingen hebben ondergaan, acht schrijver het bewijs nog niet geleverd, dat de „typen” adaptaten zijn.

Door herhaalde overentingen in bouillon en door het brengen van collodiumzakjes met cultuur in de buikholte van cavia's, werden „varianten” verkregen van dezelfde aard als door CHRISTISON (1933) zijn beschreven. De biochemische eigenschappen bleven onveranderd. Het gelukte aan een „mitis-variant”, afkomstig van een gravis-stam, zijn oorspronkelijke vorm terug te geven. De CHRISTISON-varianten moeten dus als gefixeerde adaptaten van één type worden opgevat, niet als overgangen naar een ander type.

Vervolgens worden enkele atypische stammen uit de literatuur besproken. Het wordt onjuist beschouwd als WRIGHT, CHRISTISON en MURRAY, nieuwe „typen” of „sub-groepen” in te voeren, op grond van het feit, dat zich in een bepaalde plaats een afwijkend of beschadigd bacterie-individu verspreid heeft.

De betekenis van de serologische onderverdeling der typen, met de daarmee vaak verbonden grotere of kleinere verschillen in kolonievorm, wordt besproken. Men beschouwe deze stammen niet als „overgangsvormen” tussen de typen, doch als uitdrukking van de veranderlijkheid als functie (aanpassing). Binnen ieder ras ontmoet men als gevolg van de fluctuerende variabiliteit, een aantal verschillende adaptatietoestanden (= phaenotypus) der isogene individuen, dat aan het ras in zijn geheel een enigszins geschakeerd aanzien kan geven.

Tenslotte worden in Hoofdstuk V enkele opmerkingen gemaakt over de betekenis van de typen voor de epidemiologie en de kliniek. Op grond van een statistiek van COOPER e.a. over bijna 6000 uit de literatuur verzamelde gevallen, wordt als zeker aanvaard, dat gravis een belangrijk hogere *letaliteit* veroorzaakt dan mitis, terwijl intermedius tussen beide instaat. Gewaarschuwd wordt tegen zuiver plaatselijke statistieken en tegen het maken van conclusies uit een klein aantal cijfers. Het gravis-type veroorzaakt eveneens een belangrijk hogere *mortaliteit*.

Gewezen wordt op het in de laatste jaren zo verschillende epidemiologische gedrag van de diphtherie te Amsterdam en Rotterdam. Van November 1935 tot April 1936 werden door den schrijver in Amsterdam overwegend mitis-, in Rotterdam overwegend gravis-stammen gevonden. Hoewel deze steekproef geenszins als een oplossing van dit epidemiologische vraagstuk wordt beschouwd, is het feit op zich zelf merkwaardig genoeg om op een typering op zo groot mogelijke schaal aan te dringen.

Uit een statistiek over bijna 4000 uit de literatuur verzamelde gevallen blijkt, dat gravis in het algemeen een veel ernstiger ziektebeeld geeft dan mitis, terwijl intermedius ook hier weer tussen beide instaat.

Uit de statistiek van COOPER e.a. blijkt, dat gravis en intermedius meer verantwoordelijk zijn voor de toxische complicaties, terwijl mitis meer verwikkelingen in de larynx veroorzaakt.

Op grond van verschillende mededelingen over gemengde infecties in diphtherie-barakken, wordt de instelling van „single type wards” bepleit, indien zich in een gemeenschap een gravis- of intermedius-infectie gaat verbreiden of reeds verbreid heeft.

SUMMARY.

The researches described in the preceding pages were suggested by the work of the Leeds investigators, ANDERSON, HAPPOLD, McLEOD and THOMSON who, in 1931, described three types of *Corynebacterium diphtheriae*. Between these types, named *gravis*, *mitis* and *intermedius*, and the clinical course of diphtheria there was supposed to be some connection.

After a short description in Chapter I of the chief characteristics of the species *Corynebacterium diphtheriae*, the typical characteristics of the three types are discussed in Chapter II, as also the method of preparation and the principle of the culture medium of McLEOD, and then a comparison made between this latter and that of GUNDEL and TIETZ (1935).

MURRAY's illuminator (fig. 1 page 21) is judged to be indispensable in determining the colony form.

For making the preparations the fixation method according to KAPSENBERG (1935), in 10% of formaline, proved to be a great improvement.

The difference in cell form may assist in determining the types, although no decisive significance is to be attached to it.

An investigation of my own contributed in part to the conclusion that HISS' serum-water, with peptone of Parke, Davis & Co., is unsuitable for examining the fermentation of carbohydrates, and the usual culture medium employed in this country, consisting of water with 1% of peptone "Witte", $\frac{1}{2}$ % NaCl, 4% litmus and 1% carbohydrate is recommended.

The transposition of starch by the *gravis* type is held to be a characteristic of great importance.

For the examination of the haemolytic property, the so-called HAMMERSCHMIDT-method (which was deemed unsuitable by HAMMERSCHMIDT himself) is subjected to criticism. If the tube of broth, directly after the addition of two drops of rabbit- or goatblood, be inoculated, *intermedius* will also cause haemolysis, 24 or 48 hours later, however, than the representatives of the other types usually do.

On account of my own experiences too, the manner of cultivation in broth and the change in the hydrogen-ion concentration are considered doubtful characters.

For investigating the pathogenicity of the diphtheria strains, by the intracutaneous method, blood-broth culture, of 24 hours old, or perhaps a suspension in ordinary broth, is recommended. Salt solution has a inhibitory effect upon the pathogenicity.

In the determination of a number of Netherlands strains according to their type (Chapter III.), one strain ("Amsterdam XXXI") was found which formed distinct mitis colonies, but with the biochemical characters of the gravis type (fig. 5). A "superisolation" of the colonies produced a colony form likewise suggestive of the gravis type. (figs. 6 and 7). A colony may not be termed "superisolated" unless no more than five, or at the most ten, colonies can be seen on one plate, and if round about the colony there are no other colonies growing within a radius of $1\frac{1}{2}$ cM. Various strains of the mitis type were found in which, with the help of the illuminator, slight differences could be observed in the form of the colony (fig. 8.) When "superisolated" these differences were not present. In the investigation as to the variability of the types, the method of "superisolation" more than once proved to be indispensable for a correct interpretation.

An attempt was made to investigate further the influence exercised by the colonies upon each other. For this purpose gravis colonies, 24 hours old, were excised with a piece of the medium, and transplanted on to a medium which was divided into two, and one half of which was already overgrown with a wide gravis culture. The result showed that the larger the excised portion of medium is, the greater was the development of the colony (figs. 11 and 12); if, however, the medium was brought into contact with the surrounding agar-agar, the growth of the colony amid the gravis culture was almost completely impeded; on the other hand, in contact with virgin agar-agar (fig. 13) the colony developed well. Hence, besides a lack of nutriment, the dissimilation products also have a inhibitory effect.

In experiments with Liebig-broth-agar, it appeared that all types, besides exhibiting the characteristic forms, showed tiny crystal-shaped colonies, which must be regarded as an involution-form (fig. 14). HAMMERSCHMIDT has mistakenly held this involution form to be the intermedius type.

A comparison between the mediums of McLEOD and of GUNDEL was to the disadvantage of the latter, in particular because in the latter case intermedius was often only with difficulty to be distinguished from mitis. (figs. 9 and 10). For an examination into the variability of the types, GUNDEL's medium could not always be utilized.

Professor J. W. McLEOD put six strains at our disposal, which served as material for comparison in further research.

In the period between 1st November 1935, and May 1936, 90 Amsterdam strains were examined; 17 strains derived from 7 patients and 5 carriers belonged to the gravis type; 73 strains from 12 patients and 34 carriers belonged to the mitis type. Intermedius was not found. The first gravis strain was exactly similar to the English gravis type; the others were identical with the strain already mentioned, viz. "Amsterdam XXXI". Up till April only one representative of this type had been found; later this individual strain gave rise to a small epidemic. Repeated examinations of the same patient yielded invariably strains of the same type.

From Rotterdam 63 strains were received, derived from 56 patients, 50 of whom proved to be infected with gravis and 6 with mitis. These gravis strains all resembled the English type. Intermedius was not found.

Of 5 strains from Groningen where, at that time, sporadic cases of diphtheria were occurring, 3 belonged to the intermedius and 2 to the mitis type.

The biochemical reactions showed no deviations from norms given by the Leeds workers. A-typical strains were not found.

In Chapter IV the types of the diphtheria bacillus are considered from a genetic point of view. Are the "types" to be regarded as "races", i.e. of different genotypical constitution, or are they *different aspects* in form of *one* species?

The writer agrees with those who assume the constancy of the species for microbes too. The *genotypical constitution* embraces the hereditary substrata of all characteristics; the *phaenotypus* is the result of the development of the hereditary factors under the influence of the environment. If we accept the growing clone as a bacterial individuality cultivated from *one* cell, then most modes of growth, must be considered as adaptive forms of that individual, in short, as "*adaptates*". The phaenotypus of a bacterium is the totality of its adaptates (VAN LOGHEM).

Have the "types" of the diphtheria bacillus a different genotypical constitution, or are they fixed adaptations ("fixates")?

A word of warning will not be misplaced against an erroneous interpretation of a seeming variability. The strain should be cultivated on pure agar-agar; superisolation will sometimes have to be employed (figs. 20 and 21).

It has appeared that the three types are extremely constant. Al-

though some strains have undergone experimental changes the writer maintains that no proof has yet been furnished that the "types" are "adaptates".

By repeated inoculation in broth and by introducing tiny collodium capsules with culture into the abdominal cavity of guinea-pigs, "variants" were obtained of the same nature as those described by CHRISTISON (figs. 15, 16, 17, 18 and 19). The biochemical characteristics remained unchanged. It was found possible to give a "mitis-variant", derived from a gravis-strain, its original form again. The CHRISTISON-variants must thus be interpreted as fixed "adaptates" of one type, and not as transitions to another type.

Further some atypical strains from the literature are discussed. It is held to be incorrect to introduce new "types", or "sub-groups", as was done by WRIGHT and CHRISTISON and MURRAY, on the grounds of the fact that a modified or defective bacterium-individual may have spread at a certain place.

The importance of the serological sub-divisions of the types is discussed, with their frequent accompaniment of greater or lesser differences in colony form. These strains are not to be regarded as "transition forms" between the types, but as an expression of the variability as a function (adaptation). Within each "race" one meets, as a result of the fluctuating variability, a number of different adaptates (phaenotypus) of the isogene individuals, which may impart to the "race" as a whole some shades of difference in appearance.

Finally, in Chapter V, some remarks are made respecting the significance of the types for epidemiology and pathology. On the strength of the statistics of COOPER, and others, of nearly 6000 cases culled from the literature, it may be assumed to be certain that gravis has a considerably higher lethal potentiality than mitis, while intermedius lies between them. One must guard against drawing conclusions from a small number of figures. The gravis type causes likewise a considerably higher mortality.

Attention is drawn to the great difference of late years in the epidemiological behaviour of diphtheria in Amsterdam and in Rotterdam. From November 1935, till April 1936, the writer found a preponderance of mitis in Amsterdam, in Rotterdam a preponderance of gravis strains. Although this test is by no means to be taken as a solution of this epidemiological problem, the fact is remarkable enough in itself to emphasize the need of differentiating the types as extensively as possible.

It appears from the statistics of nearly 4000 cases culled from the

literature, that gravis in general yields a far more serious clinical aspect than mitis, while here, too, intermedius lies between.

From the statistics of COOPER, and others, it appears that gravis and intermedius lead more often to toxic complications, whereas mitis causes more frequently complications in the larynx.

On the grounds of various communications respecting mixed infections in diphtheria hospitals, the institution of "single type wards" is recommended, when in any community a gravis or intermedius infection is spreading, or has already spread.

GERAADPLEEGDE LITERATUUR.

- ALLOWAY, J. L. The transformation in vitro of R pneumococci into S forms of different specific types by the use of filtered pneumococcus extracts. *Jour. Exp. Med.* **55**. 91. (1932) en **57**. 265. (1933).
- ANDERSON, J. S., HAPPOLD, F. C., MCLEOD, J. W. en THOMSON, J. G. On the existence of two forms of diphtheria bacillus — b. diphtheriae gravis and b. diphtheriae mitis — and a new medium for their differentiation and for the bacteriological diagnosis of diphtheria. *Jour. Path. and Bact.* **34** 667. (1931).
- COOPER, K. E., HAPPOLD, F. C. en MCLEOD, J. W. Incidence and correlation with clinical severity of gravis, mitis and intermediate types of diphtheria bacillus in a series of 500 cases at Leeds. *Jour. Path. and Bact.* **36**. 168. (1933).
- COOPER, K. E., HAPPOLD, F. C. en MCLEOD, J. W. Starch fermentation by the „gravis” type of diphtheria. *Lancet*. (1933) I. 293.
- ANDREWES, BULLOCH, DOUGLAS, DREYER, FILDES, LEDINGHAM en WOLF. Diphtheria. *Med. Res. Council*. London. (1923).
- ARKWRIGHT, J. A. Variations in the virulence of different strains of bacillus diphtheriae. *Jour. of Hyg.* **11**. 409. (1911).
- BAERTHELEIN. Über Mutation bei Diphtherie. *Zbl. Bakter.* I Ref. **57**. Beih. 89. (1913).
- BARRAT, M. M. Aberrant Corynebacterium. *Jour. Path. and Bact.* **36**. 369 (1933).
- BECKER, W. Bazillentypen und Krankheitsbild bei Diphtherie. *Msschr. Kinderheilk.* **69**. 95 (1937).
- BEKKER, J. H. Asporogene klonen van Bacillus anthracis. Dissertatie. Amsterdam. (1938).
- VON BORMANN, F. Der gegenwärtige Stand des Typenproblems bei Diphtheriebacillen. *Erg. inn. Med.* **53**. 211. (1937).
- BOTMAN, TH. P. J. Onderzoekingen over de veranderlijkheid van vibrionen, mede in verband met het El Tor-vraagstuk. Dissertatie. Amsterdam. (1936).
- BRENNMAN, C. J., DE JONG, G. H., NEURDENBURG, G., PEETERS, H. en HOESEN, H. W. Diphtherie en actieve immunisatie met T. A. U. te Amsterdam en Rotterdam. *Ned. T. v. Gen.* **78**. 5691. (1934).
- BULL, C. G. en MC. KEE, C. M. The whole-culture method of testing the virulence of diphtheria bacilli. *Amer. Jour. of Hyg.* **3**. 103. (1923).
- CARTER, H. S. An analysis of 510 strains of Corynebacterium diphtheriae. *Jour. of Hyg.* **33**. 542. (1933).
- A further analysis of the types of Corynebacterium diphtheriae common to the Glasgow area. *Jour. of Hyg.* **36**. 147. (1936).
- CHRISTISON, M. H. The stability of the mitis, intermediate and gravis types of b. diphtheriae. *Jour. Path. and Bact.* **37**. 243. (1933).
- Untersuchungen über das Vorkommen der 3 Typen (Typus gravis, intermedius und mitis) des Diphtheriebazillus in Berlin und deren Bedeutung. *Zbl. Bakter.* I Orig. **133**. 59. (1934/1935).
- WRIGHT, HELEN A., en SHEARER, BARBARA J. A note on diphtheria carriers with reference to types of C. diphtheriae. *Jour. Path. and Bact.* **42**. 345. (1936).
- CLAUBERG, K. W. Die epidemiologische Bewertung der Diphtheriebazillenträger vom Standpunkt der Typenlehre aus. *Münch. med. Wschr.* (1935). I. 944.
- HELMREICH, W. en VIERTHALER, R. W. Zur Frage der Typenkonstanz bei den Diphtheriebazillen. *Klin. Wschr.* (1936). I. 231.
- en PLATZ, C. Untersuchungen über Diphtheriebazillenträger und ihre seuchenpolizeiliche Auswertung. *Klin. Wschr.* (1936). II. 1673.
- en PLENGE R. Untersuchungen zur Pathogenese der Diphtherie. *Klin. Wschr.* (1937). I. 223.
- COOPER, K. E., HAPPOLD, F. C., MCLEOD, J. W., WOODCOCK, H. E., DE C. e.a. Review of the observations which have accumulated with regard to the significance of diphtheria types in the last four years (1931—1935). *Proc. of the Royal Soc. of Med.* **29**. 1029. (1936).
- CRUCKSCHANK, J. Study of a luminous organism in relation to nutrition agar. *Jour. Path. and Bact.* **39**. 14. (1934).
- DAWSON, M. H. The transformation of pneumococcal types. *Jour. Exp. Med.* **51**. 99 en 123. (1930).
- en SIA, R. H. P. In vitro transformation of pneumococcal types. **54**. 680 en 701. (1931).
- DIMITRYEVIC — SPETH en ARSENYEVIC. Pathogenitätsunterschiede der Diphtherietypen bei Zieselmäusen. *Zbl. f. Bakter.* I Orig. **139**. 283. (1937).
- DUDLEY, S. F., MAY, P. M. en O'FLYNN, J. A. Active immunization against diphtheria. *Med. Res. Council*. London. (1934).
- DURAND, P. Classification des bacilles diphthériques par l'agglutination. *Compt. rend. Soc. de biol.* **81**. 1011. (1918).
- EAGLETON, A. J. en BAXTER E. M. The virulence of diphtheria-like organisms. *Brit. Med. Jour.* (1921). I. 775.
- en BAXTER, E. M. The virulence of diphtheria-like organisms. *Brit. Med. Jour.* (1922). I. 139.
- en BAXTER, E. M. The serological classification of bacillus diphtheriae. *Jour. of Hyg.* **22**. 107. (1923).
- ERZIN, NYAZI. Untersuchungen über die Variabilität der Typen des Diphtheriebacillus. *Zbl. Bakter.* I. Orig. **137**. 97. (1936).
- ETRIS, S. Antigenic relation of gravis strains of diphtheria bacilli as compared with Park 8 strain. *Jour. inf. Dis.* **55**. 220. (1934).
- EWING, J. O. The serological grouping of the starch fermenting strains of C. diphtheriae. *Jour. Path. and Bact.* **37**. 345. (1933).
- GLASS, V. en WRIGHT, H. D. Cross infection in diphtheria wards. *Jour. of Hyg.* **38**. 248 (1938).
- GLENNY, A. T. en LLEWELLYN-JONES, M. The intracutaneous method of testing diphtheria toxin and antitoxin. *Jour. Path. and Bact.* **34**. 141. (1931).
- GOLDIE, H. Caractères hémolytiques des cultures de bacille diphthérique. *Comptes rend. Soc. de biol.* **85**. 1210. (1933).
- GREGORY, T. S. Some observations on the types of Corynebacterium diphtheriae found in Victoria, Australia. *Jour. Path. and Bact.* **45**. 333. (1937).
- GRIFFITH, F. The significance of pneumococcal types. *Jour. of Hyg.* **27**. 113. (1928).
- GUNDEL, M. en TIETZ, C. J. Die Diphtheriebazillen I. Züchtung und Erscheinungsformen. *Zschr. f. Hyg.* **116**. 439. (1935).
- en LIEBETRUTH, E. Diphtheriebazillen. II. Diagnose und Typendifferenzierung. *Zschr. f. Hyg.* **117**. 66. (1936).

- Die klinische und epidemiologische Bedeutung der Typen des Diphtheriebacillus. *Klin. Wschr.* (1936). II. 1871.
- en ERZIN, N. Die spezifische Therapie der Diphtherie und die Typendifferenzierung der Diphtheriebacillen. *Dtsch. med. Wschr.* (1936). II. 1292.
- en ERZIN, N. Untersuchungen zur Pathogenese der Diphtherie unter besonderer Berücksichtigung der „Virulenz“ der Diphtheriebazillentypen. *Zbl. Bakter. I Orig.* **136**. 24. (1936).
- HAMMERSCHMIDT, J. Über Gruppenbildung bei den Diphtheriebazillen. *Zbl. Bakter. I Orig.* **93**. 443. (1924).
- Gruppenbildung der Diphtheriebacillen. *Klin. Wschr.* (1935). I. 964.
- HENNEBERG, G. en PELS LEUSDEN, F. Beitrag zur Lehre der Diphtheriebakterien. *Zbl. Bakter. I Orig.* **139**. 39. (1937).
- HETTICHE, H. O. Die Abwandlung der Diphtheriebazillen. *Zbl. Bakter. I Orig.* **134**. 421. (1935).
- Die Typen der Diphtheriebakterien. *Zschr. f. Hyg.* **117**. 33. (1936).
- HILGERS, W. en THOENES, F. Die Bedeutung der Diphtheriebazillentypen für die Klinik der Diphtherie. *Jb. Kinderheilk.* **147**. 339. (1936).
- HOBBY, GLADYS L. A study of variation in *C. diphtheriae*. *Jour. inf. Dis.* **57**. (1935).
- HORGAN, E. S. en MARSHALL, A. A simple blood tellurite medium for the isolation of *C. diphtheriae*. *Jour. of Hyg.* **32**. 544. (1932).
- HORNUNG, H. Eine Diphtherie-Epidemie in Südbaden und ihre Lehren. *Arch. f. Hyg.* **115**. 187. (1936).
- JOHANNSEN, W. Elemente der exakten Erblchkeitslehre, derde druk. (1926).
- KAPSENBERG, G. Over de techniek van de bacteriologische diagnose der diphtherie. *Ant. v. Leeuwenhoek.* **2**. 142. (1935).
- KEMKES, B. en STEIGLER, A. Hämolysinbildungsvermögen und Typendifferenzierung der Diphtheriebazillen. *Zschr. f. Hyg.* **119**. 296. (1937).
- en STEIGLER, A. Zur Typenverteilung der Diphtheriebacillen und zur Frage der Superinfektion in Krankenanstalten. *Klin. Wschr.* (1937). II. 1648.
- KING, C. G. en MENTEN, M. L. The influence of Vitamin C. level upon resistance to diphtheria toxin. *Jour. Nutrition.* **10**. 129. (1935).
- KOBLMUELLER, L. O. Beitrag zur Kenntnis der Wechselbeziehungen zwischen Bakterienvermehrung und Umwelt sowie Bemerkungen über die sog. „Raumtheorie“ Bails. *Zschr. f. Hyg.* **118**. 687. (1936).
- KORTHOFF, G. Proeven over de veranderlijkheid van atoxische dysenterie-bacillen. Dissertatie. Amsterdam (1918).
- LEETE, H. M., McLEOD, J. W. en MORRISON, A. C. Diphtheria in Hull and its relation to bacteriological type. *Lancet.* (1933). II. 1141.
- VAN LOGHEM, J. J. Veranderingen van bacteriën in verband met het individuele in den bacterie-kloon beschouwd. *Ned. T. v. Gen.* **65**. 2981. (1921).
- Aenderungen bei Bakteriën, aufgefasst als adaptive und regressive Aenderungen während der individuellen Existenz. *Zbl. f. Bakter. I. Orig.* **88**. 257. (1922).
- Antigenic structure and specificity. *Kon. Acad. v. Wetensch. Proc.* **31**. 993 (1928).
- Bacteriële typen en pseudo typen. *Ned. T. v. Gen.* **74**. 4402. (1930).
- Terminology of bacterial variability. *Kon. Acad. v. Wetensch. Proc.* **34**. 309 (1931).
- Het begrip regressie in de bacteriologie. *Ned. T. v. Hyg. Microbiologie en Serologie.* **8**. 27. (1933).

- Les microbes commensaux. *Ann. de l' Inst. Pasteur.* **58**. 609. (1937).
- Over bacterie-verandering als normale en ziekelijke functie. *Ant. v. Leeuwenhoek.* **4**. 113. (1937).
- MAIR, W. The different forms of *C. diphtheriae* and their significance. *Jour. Path. and Bact.* **42**. 635. (1936).
- MAYER, H. D. Das „Tibi“-Konsortium. Dissertatie. Delft. (1938).
- O' MEARA, R. A. Q. en PARISH, H. J. Horgan and Marshall's blood tellurite medium for isolation of *C. diphtheriae*. *Jour. Path. and Bact.* **37**. 165. (1933).
- MENTON, J. The different forms of *Corynebacterium diphtheriae*. *Jour. Path. and Bact.* **35**. 651. (1932).
- COOPER, T. V., DUKE, F. W. en FUSSELL, W. H. The different types of *Corynebacterium diphtheriae*. *Jour. of Hyg.* **33**. 414. (1933).
- en FUSSELL, W. H. Complement-fixation experiments on 200 strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *Lancet* (1933). II. 180.
- MURRAY, J. F. 166 cases of diphtheria correlated with the type of *B. diphtheriae* concerned. *Jour. Path. and Bact.* **41**. 97. (1935).
- The serological relationships of 250 strains of *B. diphtheriae*. *Jour. Path. and Bact.* **41**. 439. (1935).
- The relative pathogenicity for the rabbit of gravis, mitis and intermediate strains of *C. diphtheriae*. *Brit. Jour. Exp. Path.* **16**. 384. (1935).
- A note on the stability of the gravis, mitis and intermediate types. *Brit. Jour. Exper. Path.* **16**. 532. (1935).
- NEISSER, M. Bakteriologie der Diphtherie. *Zbl. f. Bakter. I. Ref.* **57**. Beiheft, 1.
- NISHIMOTO, G. Immunisatorische Einteilung der Diphtherie bacillen. *Zschr. f. Immun.forsch.* **87**. (1936).
- NEUFELD, F. en LEVINTHAL, W. Beiträge zur Variabilität der Pneumokokken. *Zschr. f. Immun.forsch.* **55**. 234. (1928).
- OTTO, HANS en MITTAG, GEORG. Erscheinungsformen d. Diphtheriebacillus und klinisches Bild d. Diphtherie. *Klin. Wschr.* I. (1937).
- PARISH, H. J., WATHLEY, E. E. en O'BRIEN, R. A. *B. diphtheriae* and mitis. *Jour. Path. and Bact.* **35**. 653. (1932). *Brit. med. Jour.* (1932). II. 915. *The Lancet.* (1934). I. 1192.
- en WRIGHT, J. The Schick test and active immunisation in relation to epidemic diphtheria. *Lancet* (1935). I. 600.
- PARKER, H. B. Rough and smooth strains of *Corynebacterium diphtheriae* on trypsin-serum-agar. *Brit. Jour. exper. Path.* **9**. 207. (1928).
- PASCHLAU, G. Zur Frage der pathogenetische Bewerking der Diphtheriebacillentypen. *Klin. Wschr.* (1937). I. 994.
- PERRY, C. A., WHITLEY, ONA R. en PETRAN, E. Types of *C. diphtheriae* in Maryland. *Amer. Jour. of Hyg.* **23**. (1936).
- PESCH, K. L. Vorkommen, Unterscheidung und experimentelle Umwandlung der 3 Diphtherie-Bakterien-Typen. *Klin. Wschr.* (1936). II. 1202.
- PIASECKA-ZEYLAND, E. Contribution a l'étude du diagnostic bactériologique de la diphthérie. *Ann. Inst. Pasteur.* **50**. 754. (1933).
- POORTEN, F. H. TER. Over variabiliteit in de zoogenaamde typhus-coligroep. Dissertatie. Amsterdam. (1920).
- POVITZKY, O. R., EISNER, H. en JACKSON, E. Effectiveness of standard diphtheria antitoxin against all types of diphtheria infection. *Jour. inf. Dis.* **52**. 246. (1933).

- PREUNER, R. Diphtheriestudien. I. Mitt. *Zbl. Bakter. I Orig.* **136**. (1936); II. Mitt. *Zbl. Bakter. I Orig.* **137**. 112. (1936); III. Mitt. *Zbl. Bakter. I Orig.* **138**. 431 (1937).
- PUSCHEL, J. Zur Technik der Diphtherietypenbestimmung. Eine einfache Schnellmethode. *Zbl. Bakter. I. Orig.* **138**. 68. (1936).
- REIMANN, H. A. The reversion of R to S pneumococci. *Jour. Exp. Med.* **49**. 237. (1929).
- RIEMSDIJK, M. VAN. Über die bakteriologische Diphtheriediagnose und die grosse Rolle, welche Bacillus Hofmanni dabei spielt. *Zbl. Bakter. I. Orig.* **75**. 229. (1915).
- ROBINSON, D. T. en MARSHALL, F. N. Investigations on the gravis, mitis and intermediate types of C. diphtheriae and their clinical significance. *Jour. Path. and Bact.* **38**. 73. (1934).
- Further investigations on the gravis, mitis and intermediate type of C. diphtheriae. Type stability. *Jour. Path. and Bact.* **39**. (1934).
- en MARSHALL, F. N. Alteration in the incidence of the gravis, mitis and intermediate types of C. diphtheriae in Manchester. *Lancet*. (1935). II. 441.
- en PEENEY, A. L. P. The serological types amongst gravis strains of C. diphtheriae and their distribution. *Jour. Path. and Bact.* **43**. 403. (1936).
- RÖMER, P. H. Ueber den Nachweis sehr kleiner Mengen des Diphtheriegiftes. *Zschr. f. Immun.forsch.* **1**. 171. (1909).
- ROSENBERGER, F. Weitere Untersuchungen über Inosit. *Zschr. f. physiol. Chemie.* **57**. 464. (1908).
- RUYS, A. CH. Veranderlijkheid van tuberkelbacillen van het bovine type. *Ant. v. Leeuwenhoek.* **4**. 1791. (1937).
- SCHÄFER, W. Ueber die Bakterizidie menschlichen Speichels und insbesondere ueber seinen Einfluss auf die Natur der Diphtheriebazillen. *Zbl. f. Bakter. I. Orig.* **135**. 458. (1936).
- SCHLOSSBERGER, H. Die Typen des Diphtheriebazillus. *Zbl. Bakter. I. Orig.* **135**. 6. (1935).
- SCHIFF, F. en WEBER, M. Über die drei Typen des Diphtheriebazillus. Derzeitiges Vorherrschen des sogenannten Typus gravis in Berlin. *Dtsch. med. Wschr.* (1935). I. 259.
- SCHWONER, J. Über die hämolytische Wirkung des Loefflerschen Bazillus. *Zbl. Bakter. Orig.* **35**. 608. (1904).
- STEIGLER, A. Eine einfache Methode zur Typendifferenzierung der Diphtheriebazillen auf einer Leberextrakt-Agarplatte. *Munch. med. Wschr.* (1936). II. 1682.
- Zur Typendifferenzierung der Diphtheriebazillen. *Zbl. Bakt. I. Orig.* **138**. 424. (1937).
- STUART, R. D. Starch-fermenting strains of C. diphtheriae in New castle-on-Tyne: A serological and clinical investigation. *Jour. Path. and Bact.* **46**. 175. (1938).
- TANNAHIL, R. W. The incidence and clinical correlation of types of Corynebacterium diphtheriae at Romford, Essex. *Jour. of Hyg.* **36**. 140. (1936).
- TASMAN, A. en BRANDWIJK, A. C. Stofwisselingsproeven met C. Diphtheriae. *Ant. v. Leeuwenhoek.* **3**. 134 (1936) en **4**. 186. (1937).
- TERBURGH, J. TH. De generatiekrommen van diphtherie in Nederland. *Ned. T. v. Gen.* **82**. I. 499. (1938).
- THETZ, C. J. *Zbl. Bakter. I. Orig.* **135**. 90. (1935).

- TIMMERMAN, W., BRANDWIJK, A. C. en PEL, E. A. J. De verschillende types van diphtheriebacillen en de clinic van diphtherie in Nederland. **80**. 3546. (1936).
- UNDERWOOD, E. A. Schick immunity and diphtheria infection. *Lancet*. (1935). I. 364.
- VEDDER, A. Bijdrage tot de kennis van het kweken en de verspreiding van den diphtheriebacil. *Ned. T. v. Gen.* **77**. 2209. (1933).
- WEIGMANN, F. en KOEHN, A. Weitere Untersuchungen über die Wirkung des menschlichen Speichels auf Diphtheriebacillen. *Zschr. f. Hyg.* **118**. 506 en 516. (1936).
- WESTBROOK, F. F., WILSON, L. B., MC. DANIEL, O. en ADAIR, H. J. A preliminary communication on bacillus diphtheriae and its variant in a school in which diphtheria was epidemic. *Brit. Med. Jour.* (1898). I. 1008.
- WESTBROOK, F. F., WILSON, L. B. en MC. DANIEL, O. Studies upon the distribution of certain varieties of the diphtheria bacillus. *Jour. Boston. Soc. Med. Sc.* **4**. 75. (1899—1900).
- WOLFF, H. H. DE. Biochemische eigenschappen van de diphtherie- en van de pseudo-diphtheriebacterie. Dissertatie, Utrecht. (1927).
- WRIGHT, H. A. en RANKIN, A. L. K. Biological types of diphtheria bacillus. *Lancet* (1932). II. 884.
- WRIGHT, H. A. en CHRISTISON, H. Further observations on the types of C. diphtheriae. *Jour. Path. and Bact.* **41**. 447. (1935).
- WRIGHT, H. D. The effect of certain factors upon the growth of the pneumococcus. *Jour. Path. and Bact.* **32**. 203. (1929).
- ZINGHER, A. en SOLETSKY, D. An economical intracutaneous method for testing the virulence of diphtheria bacilli. *Jour. Infect. Dis.* **17**. 454. (1915).
- ZUPNIK, L. Ueber Variabilität der Diphtheriebacillen. *Berl. klin. Wschr.* **34**. 1085. (1897).

Fig. 2.
Supergeïsoleerde
gravis-kolonie

Fig. 3.
Supergeïsoleerde
mitis-kolonie.

Fig. 4.
Supergeïsoleerde
intermedius-kolonie.

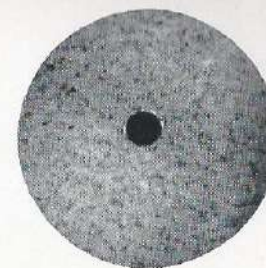
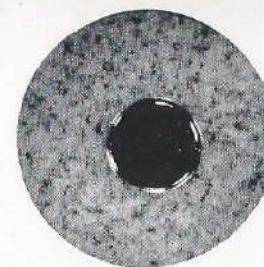
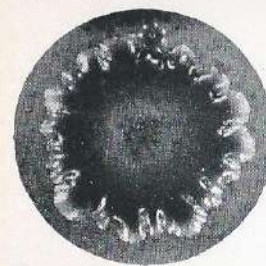


Fig. 5.
Op de mitis-vorm ge-
lijkende kolonies van de
gravis-stam
„Amsterdam XXXI”.

Fig. 6.
Kolonie van de stam
„Amsterdam XXXI” bij
iets sterkere isolatie.

Fig. 7.
Supergeïsoleerde kolonie
van de stam
„Amsterdam XXXI”.

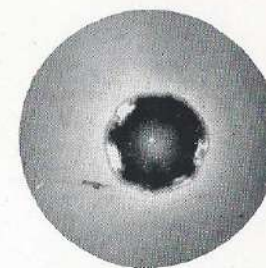
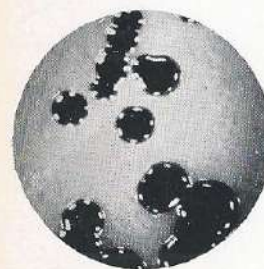


Fig. 8.
Kolonia met een kleine
korreling in het midden,
afkomstig van de mitis-
stam „Amsterdam I”.

Fig. 9.
Kolonia van de
intermedius-stam
„Mary Hines” (Leeds) op
GUNDEL-agar.

Fig. 10.
Supergeïsoleerde kolonie
van de intermedius-stam
„Mary Hines” op
GUNDEL-agar.

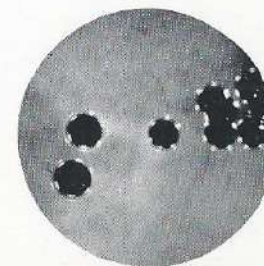
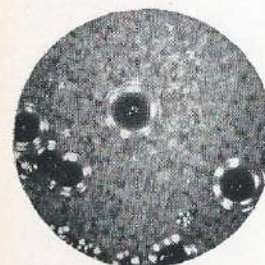


Fig. 11.

De kleine voedingsbodempjes, ieder met een gravis-kolonie, zijn 1 maal 24 uur tevoren overgebracht. (Op de rechter helft van de agar-plaat is een brede gravis-cultuur geënt). De beide kolonies zijn slechts weinig uitgegroeid.

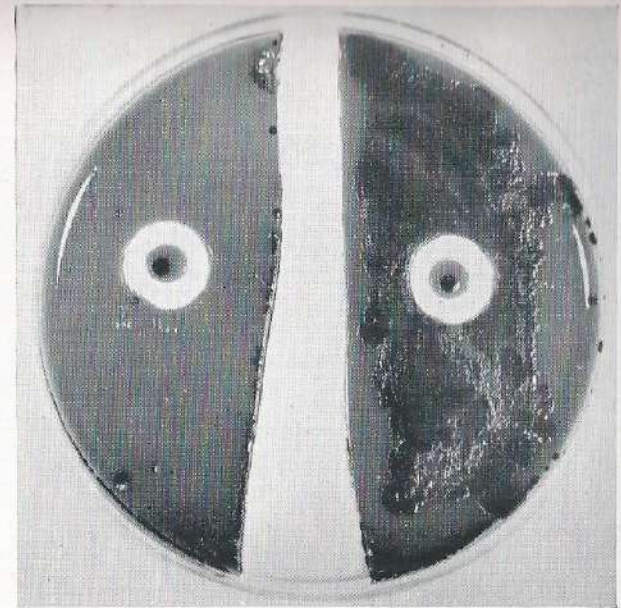
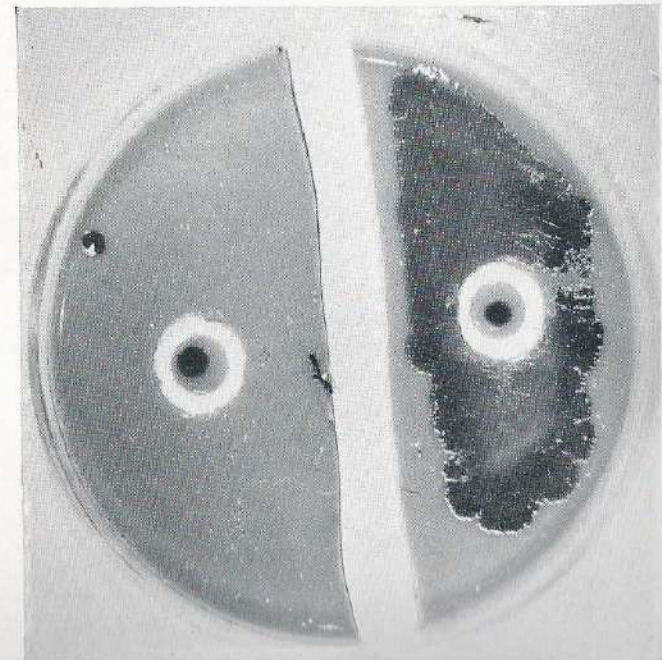


Fig. 12.

Een groter voedingsbodempje is overgebracht. De beide kolonies groeien meer uit.



STELLINGEN.

I.

Wanneer in een gemeenschap een gravis- of intermedius-infectie zich gaat verspreiden of reeds verspreid heeft, dienen de patiënten in „single type wards” te worden opgenomen.

II.

De processus mastoideus is, zowel wat vorm als functie betreft, niet kenmerkend voor de mens.

III.

Bij patiënten lijdende aan etterige meningitis, in het bijzonder indien deze door staphylococcen, streptococcen of pneumococcen wordt veroorzaakt, dient ook „forced drainage” te worden toegepast.

IV.

Zogenaamde reflectoire long-atelectase kan op de gewone mechanische wijze door bronchus-afsluiting *en* slechte respiratie worden verklaard.

V.

De zogenaamde basophile degeneratie van de hartspiervezels is een verschijnsel dat na de dood ontstaat.

VI.

Indien men verhoogde druk binnen de schedel vermoedt en een stuwingspapil ontbreekt, mete men de druk van de vena centralis retinae.

VII.

Het keratoma senile wordt terecht als een praecarcinomateuze aandoening beschouwd.

VIII.

Bij peritonsillair absces verrichte men tonsillectomie „à tiède”.

IX.

Als palliatieve behandeling van het oesophagus-carcinoom verdient, indien mogelijk, dilatatie en diathermie per oesohagoscoop de voorkeur boven het aanleggen van een maagfistel.

X.

De instelling van een leerstoel voor de geschiedenis van de geneeskunde is gewenst.