

# SAMENVATTENDE OVERZICHTEN.

(Uit het Laboratorium voor de Gezondheidsleer van de Universiteit van Amsterdam).

## OVER DEN BACTERIOPHAAG (D'HERELLE) 1),

DOOR

L. K. WOLFF, arts te Amsterdam.

Het onderzoek, dat D'HERELLE sinds een viertal jaren heeft verricht over een merkwaardige wijze van vernietiging van pathogene bacteriën, zoowel in als buiten het lichaam, biedt naar alle kanten zóóveel nieuwe gezichtspunten, stelt zóóveel vragen, dat ik niet aarzel te voorspellen, dat de geheele geneeskundige literatuur, vooral die, welke op de infectie-ziekten betrekking heeft, de eerste jaren door de ontdekking van D'HERELLE zal beheerscht worden. Afgezien van de zuiver geneeskundige betekenis is het verschijnsel ook bij uitstek belangrijk voor de biologie; het dwingt ons onze inzichten omtrent de grootte van levende wezens te herzien en ons in het algemeen beter rekenschap te geven van de eigenschappen, die het leven bepalen.

Laat ik vooropstellen, dat de feiten, door D'HERELLE ontdekt, ook door andere onderzoekers volkomen bevestigd zijn bevonden; daarover is slechts een communis opinio. D'HERELLE is uitgegaan van het reeds lang bekende feit, dat dysenterie-bacillen moeilijk of niet kunnen worden aangetoond in ontlasting, die eenigen tijd na de depositio had gestaan. Dit feit heeft vaak groote moeilijkheden opgeleverd voor de bacteriologische diagnose der dysenterie. In het begin van den oorlog werd bijv. door bacteriologen van naam betwijfeld, of er aan het oostelijke front bacteriële dysenterie voorkwam, omdat in de naar achter het front gelegen onderzoekingslaboratoria gezonden ontlasting van lijders aan klinische dysenterie geen dysenteriebacillen konden worden aangetoond. Eerst toen men de onderzoekingen onmiddellijk in de fronthospitalen verrichtte, kreeg men betere resultaten. Waaraan was nu die vernietiging van de bacillen toe te schrijven? Om dit na te gaan, filtreerde D'HERELLE de ontlasting van een genezend dysenterielijder na ze met bouillon verdund te hebben, door een porceleinen filter (kaars van CHAMBERLAND) en onderzocht de werking van het filtraat op een suspensie van levende dysenterie-bacillen. Deze suspensie bleek na betrekkelijk korten tijd helder te worden en na overenting bleek de vloeistof steriel.

1) Naar een lezing, gehouden in den Geneeskundigen Kring van Amsterdam op 29 December 1921.

Entte D'HERELLE van deze helder geworden vloeistof in een nieuw buisje met bouillon, waarin levende dysenteriebacillen waren gesuspendeerd, dan werd ook dit helder. Zoo kon hij ad infinitum doorgaan. De werkzame stof werd dus bij het oplossen vermeerderd en wel, zooals door verdunningen bleek, zeer sterk. Van een werkzame vloeistof was minder dan één millioenste  $\text{cM}^3$  noodig om een nieuw buisje of kolfje weer helder te maken, terwijl met dezelfde hoeveelheid van dit buisje de proef weer herhaald kon worden. D'HERELLE heeft nu de hypothese opgesteld, dat wij hier te doen hebben met een zeer klein „filtreerbaar” virus, dat de eigenschap heeft zich te vermenigvuldigen ten koste van levende dysenteriebacillen en tegelijkertijd deze bacillen op te lossen. Ik zal later de gegrondheid van deze hypothese bespreken en daarbij ook de andere hypothesen, die ter verklaring van het verschijnsel zijn gegeven, in den kring van onzen gezichtseinder brengen. Voorloopig gebruiken wij de hypothese van D'HERELLE als een hulpmiddel om de feiten gemakkelijker te beschrijven.

D'HERELLE noemt zijn virus *bacteriophaga*. Wij hebben dus als eerste eigenschap van dezen bacteriophaga, dat hij levende dysenteriebacillen kan oplossen en hun groei kan verhinderen; doode bacillen worden niet aangetast. Bij die oplossing neemt de bacteriophaga in aantal toe. Ook op vaste voedingsbodems, de gewone voedingsagar, kon D'HERELLE den bacteriophaga aantoonen. Streek hij een paar druppels bouillon, die licht troebelwas, doordat dysenteriebacillen erin waren gesuspendeerd en waaraan zeer kleine hoeveelheden van den bacteriophaga waren toegevoegd, op agar uit, dan kreeg hij den volgenden dag een vlies van de bacillen op de agar, dat doorzaaid was met ronde plekjes, waarin geen bacillen waren gegroeid: negatieve kolonies. Inderdaad kon hij door afenten van zoo'n steriel plekje aantoonen, dat de bacteriophaga zich daar wel had vermeerderd. Door telling van deze eilandjes kon D'HERELLE bewijzen, dat in het algemeen één kiem van zijn bacteriophaga de vorming van zoo'n eilandje veroorzaakte. Gaf hij bij een bacteriesuspensie gelijke hoeveelheden bacteriophaga, dan kreeg hij hetzelfde aantal eilandjes.

De verklaring, waarom de bacteriophaga zulke eilandjes maakt (bij voldoende sterke verdunning, want geeft men veel bacteriophaga bij het bacteriemengsel, dan krijgt men geen afzonderlijke eilandjes, maar onregelmatige cultuurvliesen, of zelfs heelemaal geen cultuur), is betrekkelijk eenvoudig: de bacteriophaga is een parasiet van de bacterie, gelijk later nog zal blijken, en kan bovendien alleen jonge, levende bacillen vernietigen; slechts een aantal uren kan hij in de om hem heen groeiende bacillen dringen en ze oplossen; daarna zijn de bacteriën te oud geworden en kan het eilandje zich niet meer uitbreiden. Ent men nu eenige dagen uit de bacteriemassa (dus niet uit de eilandjes) over de agar, dan blijkt ook daar de bacteriophaga wel aanwezig te zijn geweest; men krijgt weer nieuwe eilandjes.

Niet alleen dat de bacteriophaga levende bacillen tot zijn beschikking moet hebben om zich te vermeerderen, zij moeten bovendien jong zijn en zich nog kunnen vermeerderen. Natrium-fluoride

in 1 pCt.-oplossing verhindert de werking van den bacteriophagaag, hoewel deze stof noch de bacterie, noch den bacteriophagaag in deze concentratie doodt.

De reactie van het milieu is van zeer veel belang voor een goede werking van den bacteriophagaag. Alleen binnen enge grenzen, die om de neutraliteit schommelen ( $\text{Ph} = 7$ ), is er goede werking: de bacteriophagaag wordt echter niet snel gedood. Allerlei anti-septica hebben een slechten invloed op de bacteriolyse; de bacteriophagaag is echter zeer weerstandkrachtig tegen sommige, bijv. aceton. Daaruit de gevolgtrekking te maken, dat men niet met een levend virus te maken heeft (KABESHIMA), lijkt mij onjuist; het gaat niet aan, vooruit te bepalen, aan welke eischen een levend organisme moet voldoen, wil het blijven leven.

Met de methode van kolonies tellen, d. w. z. de eilandjes op de met dysenteriebacillen bezaaide agarplaat, heeft D'HERELLE nagegaan, dat de bacteriophagaag geabsorbeerd wordt door de bacteriën. Brengt men den bacteriophagaag bij een suspensie van levende dysenteriebacillen en centrifugeert men na eenige minuten, dan blijkt de bacteriophagaag met de bacteriën uit de vloeistof verdwenen (centrifugeeren van den bacteriophagaag alleen doet deze niet uit de vloeistof precipiteeren). Doet men dezelfde proef na  $1\frac{1}{2}$  uur, dan blijkt er in plaats van een vermindering een vermeerdering van den bacteriophagaag te zijn opgetreden. D'HERELLE verklaart dit door aan te nemen, dat de bacteriophagaag zich binnen de bacterie vermeerdert, deze daarna oplost en nu weer vrij komt. Doet men dezelfde proef met een ander soort bacillen, die niet door den bacteriophagaag worden opgelost, dan blijft ook de absorptie van den bacteriophagaag uit.

Isoleert men een bacteriophagaag uit het menschelijk of dierlijk lichaam (d. w. z. de ontlasting), dan heeft deze meestal niet de volle virulentie tegenover de bacterie. Meestal lukt het door voortgezette cultuur in vitro en filtratie door een porceleinen kaars de virulentie te versterken. Ook blijkt, dat een bacteriophagaag een werking kan hebben op zeer uiteenlopende bacteriesoorten, al is deze werking meestal zwakker dan tegen de eigen bacterie. D'HERELLE deelt mede, dat hij onder de vele honderden bacteriophagaagstammen, die hij heeft geïsoleerd, er geen twee volkomen gelijke heeft aangetroffen.

Is een suspensie van bacteriën door bijvoeging van den bacteriophagaag helder geworden, dan kan in enkele bijzondere gevallen de vloeistof werkelijk steriel zijn geworden, d. w. z. geen levende bacteriën meer bevatten. Maar in de meeste gevallen wordt de heldere vloeistof na eenige dagen weer troebel en ent men uit deze vloeistof, dan krijgt men bacteriën terug, die in hun uiterlijk (kolonievorm) wat verschillen met den uitgangsstam; dit zijn de zogenaamde weerstandskrachtige vormen, die niet meer vatbaar zijn voor werking van den bacteriophagaag. In vivo blijken deze bacillen vaak virulenter. Zij zijn dikwijls moeilijk te agglutineeren door immuunserum. In verband hiermede moet een feit vermeld worden, o. a. door BAIL meegedeeld, dat af en toe dysenterieculturen in bouillon den eenen dag troebel waren, dan op-

helderden, dan weer troebel werden enz.. Het is hoogstwaarschijnlijk, dat wij hier te doen hebben met een mengsel van dysenteriebacil en bacteriophag, die ongeveer in evenwicht met elkaar zijn; dan weer wint de bacil het, dan het invisibele virus.

Iedere bacteriophag heeft een multipele virulentie, d. w. z. hij werkt niet alleen tegen de bacterie, die de veroorzaker der ziekte is, maar ook tegen andere bacteriën. Tegen welke is niet vooruit te zeggen; daarin heeft D'HERELLE nog geen regelmaat kunnen ontdekken. Filtreert men ontlasting van een gezonden mensch of een gezond dier, dan bevat het filtraat een bacteriophag tegen de colibacillen, die in den darm aanwezig waren. De bacteriophag is dus een normale darmbewoner. Wat de morphologie betreft, hiervan is alleen bekend, dat de bacteriophag buitengewoon klein is, vermoedelijk van de grootte van eenige eiwit-moleculen. Door alle membranen, waardoor eiwit gaat, gaat ook de bacteriophag; omgekeerd wordt hij tegengehouden door membranen, die ook eiwit tegenhouden. Met centrifugeeren gelukte het D'HERELLE wel een verschil in aantal van den bacteriophag in de boven- en benedenlaag der gecentrifugeerde vloeistof aan te toonen. Daartoe was het echter noodig een uur lang te centrifugeeren met 12000 omwentelingen per minuut.

Boven heb ik reeds medegedeeld, hoe de bacteriophag geabsorbeerd wordt door de bacterie; 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> uur na de menging van bacteriesuspensie en bacteriophag treedt er plotseling een zeer sterke vermeerdering op van den laatste; na drie uur weer een sterke vermeerdering enz.. D'HERELLE heeft hiervan ook iets onder het ultramikroskoop kunnen zien; hij zag een bacterie plotseling verdwijnen en kleine bolletjes eruit schieten.

De vitaliteit van den bacteriophag is bijzonder groot, ongeveer te vergelijken met sporen van bacteriën. In een overigens steriele vloeistof blijft hij jarenlang aanwezig. Ook tegen uitdrogen is hij zeer bestand. Hij kan tegen verhitting gedurende een half uur van 60° (de bacteriën der typhus-coligroep verdragen slechts verhitting tot 53°—55°). D'HERELLE neemt aan, dat er slechts één bacteriophag is; het organisme is alleen zeer veranderlijk en kan zich instellen tegen verschillende bacteriën. Als bewijs hiervoor haalt D'HERELLE aan, dat het gelukt een antiserum tegen den bacteriophag te maken (door inspuiting bij het konijn van een hoeveelheid bacteriophag in de bloedbaan), dat gelijkelijk tegen alle andere bacteriophagen werkt. Zulk een antiserum bevat dan echter tegelijk antistoffen tegen den bacil, die, opgelost, mede was ingespoten: een zuiver serum antibacteriophagum kon niet gemaakt worden, vanwege de onmogelijkheid den bacteriophag te scheiden van de opgeloste bacteriesubstanties.

Een bijzonder merkwaardige werking vertoont de bacteriophag nog bij opsonische proeven: voegt men bij elkaar leucocyten, bacteriën en bacteriophag, dan verkrijgt men een zeer veel grootere phagocytose dan zonder den bacteriophag; natuurlijk moet deze laatste ingesteld zijn op de bacterie, die bij de proef gebruikt werd.

Het is D'HERELLE ook gelukt uit den bacteriophagaag een ferment af te zonderen, dat de oplossing van de bacteriën teweegbrenkt; met alcohol kon hij het precipiteeren uit de vloeistof. De oplossende werking was echter alleen in het eerste buisje aanwezig en nu niet in serie voort te brengen. Evenmin gelukte het met deze vloeistof eilandjes op de agarplaat te verkrijgen.

Wij kunnen nu met vrucht bespreken, aan welke hypothese wij de voorkeur moeten geven ter verklaring van deze verschijnselen. Die van KABESHIMA, dat wij met een ferment zouden te doen hebben, kunnen wij gemakkelijk voorbijgaan. Een ferment, dat zich aanpast en zich vermeerdert, bezit juist de twee typische levensverschijnselen en is dus een levend wezen.

Anders is het met de onderstelling van BORDET. Deze heeft bij een cavia colibacillen in de buikholte gespoten en uit het exsudaat een bacteriophagaag tegenover colibacillen kunnen afzonderen. Hij meent, dat de bacteriophagaag uit de leucocyten is ontstaan, dus een ferment is, dat twee eigenschappen heeft en wel: 1<sup>o</sup>. de desbetreffende bacillen te kunnen oplossen, en 2<sup>o</sup>. enkele bacillen zóó te kunnen veranderen, dat zij de oplossende werking van het ferment kunnen weerstaan, maar nu zelf weer opnieuw dit ferment kunnen afzonderen. In de eerste plaats is dit een eenigszins gekunstelde verklaring, daar een oorspronkelijk uit de leucocyten afkomstig ferment nu door de bacillen zou worden afgezonderd. Maar bovendien blijkt, dat er bacteriophagen zijn, die werkelijke steriliteit geven, waarbij dus van resistente vormen, die het ferment weer afzonderen, niets blijkt, en dan heeft D'HERELLE aangetoond, dat het aantal eilandjes, dat gevormd wordt, wanneer men een mengsel van bacteriophagaag en bacteriesuspensie uitstrikt op agar, uitsluitend bepaald wordt door de hoeveelheid bacteriophagaag en niet door het aantal bacillen; dit laatste moest volgens de onderstelling van BORDET het geval zijn, daar twee keer meer bacillen ook twee keer meer resistente vormen moeten bevatten. Daarbij komt, dat de proef van BORDET slechts bij uitzondering gelukt en dan vermoedelijk moet worden toegeschreven aan een indringen in de buikholte uit den darm van den bacteriophagaag.

Herhalen wij nog even de voornaamste gronden, die ons nopen den bacteriophagaag als een levend wezen te beschouwen, dan zijn dit:

- 1<sup>o</sup>. de vermeerdering in serie;
- 2<sup>o</sup>. de kolonievorming op agar, waarbij het aantal kolonies strikt afhankelijk is van de hoeveelheid ingebrachten bacteriophagaag;
- 3<sup>o</sup>. de afscheiding van het lytische ferment uit den bacteriophagaag;
- 4<sup>o</sup>. de groote variabiliteit en het groote aanpassingsvermogen.

Wij hebben vroeger reeds besproken, dat wij een serum antibacteriophagum verkrijgen kunnen, wanneer wij den bacteriophagaag parenteraal bij een dier inbrengen. Zulk een serum, bij andere dieren ingespoten, bevordert een bepaalde ziekte; om een dier met dysenteriebacillen te doden is veel minder noodig, wanneer tegelijkertijd het serum antibacteriophagum wordt ingebracht.

Geeft men dier of mensch per os den bacteriophagaag, dan is deze zeer spoedig weer in de ontlasting aan te toonen; spuit men hem onderhuids in, dan komt hij in alle organen, maar gaat toch ten slotte weer naar den darm en blijft daar langer dan elders.

D'HERELLE heeft ook klinisch uitvoerig bestudeerd, hoe de bacteriophagaag zich gedroeg in het verloop van ziekten. In de eerste plaats dan bij de dysenterie, de ziekte waar het verschijnsel het eerst werd waargenomen. Zoolang de patiënt nog ernstig ziek was en geen verbetering vertoonde, was de werking van den bacteriophagaag op de dysenteriebacillen, zoowel op eigen als op andere, gering of afwezig; met het klinische herstel vertoonde zich ook de werking van den bacteriophagaag op de dysenteriebacillen, bleef een tijdlang op één hoogte om daarna weer te zakken. Anders echter, wanneer de ziekte slecht gaat; bij doodelijke gevallen is de werking van den bacteriophagaag nul ten opzichte van de pathogene bacterie. Men moet deze proef echter steeds nemen met de bacterie, die men uit het geval zelf geïsoleerd heeft; tegenover andere stammen kan de bacteriophagaag vaak geheel anders werken.

Ik weersta met moeite het verlangen om D'HERELLE op den voet te volgen bij het onderzoek van andere ziekten: colibacillose (pyelonephritis), typhus en paratyphus, vogeltyphus, pest, pasteurellose van den buffel, ziekte der zijde-wormen. Wie hiervan meer wil weten, raad ik aan het boek van D'HERELLE te lezen. Slechts enkele zaken wil ik aanstippen. Bij de pyelonephritis vindt D'HERELLE in de urine zoowel den bacteriophagaag als resistente colibacillen; daar is dus een heen en weer gaan der ziekte, totdat ten slotte een van de beide het wint. Bij een typhusrecidief vindt D'HERELLE een tijdelijken teruggang van virulentie van den bacteriophagaag; bij sterfgevallen aan typhus vertoonde zich geen typhusbacteriophagaag in de ontlasting. Overigens worden bij deze ziekten overeenkomstige vondsten gedaan.

D'HERELLE stelde ook voor de epidemiologie zeer belangrijke feiten vast. In een gebied, waar geen rattenpest voorkwam, vond hij geen bacteriophagaag tegen pestbacillen in rattenontlasting. Daarentegen kon hij uit de ontlasting van gezonde ratten uit een pestgebied een zeer sterken anti-pest-bacteriophagaag afzonderen. Ditzelfde vond hij bij vogeltyphus en bij buffelsepsis; in besmette gebieden een bacteriophagaag bij de gezonde dieren. De ziekte wordt door den bacil overgebracht, de onvatbaarheid door den bacteriophagaag. Zoo komen allerlei epidemiologische gegevens in een gansch ander licht.

De bacteriophagaag is evenals de ziektekiemen van individu op individu over te brengen en dit gebeurt ook geregeld in de natuur. Zoo komen wij dan van zelf op de therapeutische beteekenis van den bacteriophagaag. Een zieke met een tegen de ziektekiemen gericht bacteriophagaag behandelen moet hem genezing brengen. Dat heeft D'HERELLE inderdaad gezien bij dysenterie en vogeltyphus. Vooraf had hij aangetoond, door proeven op zich zelf en zijn familie, dat innemen per os van den bacteriophagaag geheel en al zonder schade was en dat de bacteriophagaag zeer poedig

daarna in de ontlasting verschijnt. Bij de bacillaire dysenterie is hem deze genezingswijze dan ook volkomen gelukt. Behalve per os is hier ook onderhuidsche inspuiting van kleine hoeveelheden mogelijk; daarbij blijken de opgeloste bacillen, indien de opgeloste cultuur maar eenige weken oud is, hun giftigheid te hebben verloren. Groote hoeveelheden onderhuids in te spuiten lijkt niet raadzaam vanwege de mogelijkheid, dat een serum antibacteriophagum ontstaat. Ook als voorbehoedmiddel werkt een inspuiting van den bacteriophag voortreffelijk. Ook hier moet men weinig inspuiten. D'HERELLE heeft zoo buffels onvatbaar kunnen maken voor de zoo gevreesde buffelsepticaemie. Deze inspuiting heeft dan twee soorten immuniteit ten gevolge: 1<sup>o</sup>. Een plotselinge immuniteit, veroorzaakt door den bacteriophag in kwestie. Deze is in het algemeen voorbijgaand, daar de bacteriophag spoedig uit de ontlasting verdwijnt, wanneer hij niet de hem passende bacillen tot zijn beschikking heeft. In een besmette omgeving echter blijft de bacteriophag veel langer aanwezig door de herhaalde besmettingen. 2<sup>o</sup>. Een langzaam optredende organische immuniteit, door tegenstoffen tegen de opgeloste bacteriën, die juist door deze oplossing gemakkelijk zonder schade verwerkt worden, terwijl slechts uiterst weinig ervan behoeft te worden aangewend.

Men ziet, wij zijn hier aangeland in het gebied der onbegrensde mogelijkheden. Toch is de toepassing van deze geneeswijze niet zoo eenvoudig. Men moet buitengewoon sterk werkende, virulente bacteriophagen bezitten, die alle bacillen aantasten. En deze zijn niet zoo gemakkelijk te verkrijgen. Maar heeft men een dergelijken stam, dan moet het volgens D'HERELLE zelfs mogelijk zijn een geheele stadsbevolking tegen een ziekte te beveiligen door den bacteriophag in de waterleiding te brengen; slechts weinige liters bacteriophagcultuur zijn voldoende om een geheele stedelijke bevolking te voorzien van bacteriophagen.

Onvolledig als dit overzicht is — met opzet liet ik allerlei bijzonderheden onvermeld — hoop ik toch, dat bij ons Nederlandsch artsenpubliek de belangstelling gewekt is voor dit uiterst oorspronkelijke en merkwaardige onderzoek, dat in belangrijkheid het werk van PASTEUR, ROUX, KOCH, BEHRING, METSCHNIKOFF en EHRLICH evenaardt.

Januari 1922.

---

Voor de literatuur zie men: F. D'HERELLE, *Le bactériophage, son rôle dans l'immunité* (Monographie de l'Institut PASTEUR). MASSON et Cie 1921. Daarin ook de literatuur tot Juni 1921. Verder mededeelingen in *C. R. Soc. de biologie* van 1921 van Belgische schrijvers (BORDET, CINCA, GRATIA, DE NECKER, APPELMANS, BRUYNOGHE, MAISIN) en van D'HERELLE zelf met zijn medewerkers. A. GRATIA. Studies on the D'HERELLE phenomene. *Journ. of experim. Med.* Juli 1921. M. WOLSTEIN. Phenomenon of D'HERELLE. *Journ. of exp. Med.* Nov. 1921. BAIL. *Wien. klin. Woch.* 1921, No. 20 en 37. OTTO und MÜNTER. Zum D'HERELLESchen Phänomen. *Deutsche med. Wochenschr.* 1921, No. 52.

---