

## PDF hosted at the Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen

The following full text is a publisher's version.

For additional information about this publication click this link.

<http://hdl.handle.net/2066/107531>

Please be advised that this information was generated on 2017-12-06 and may be subject to change.

127

ONDERZOEK NAAR DE INVLOED  
VAN MOEDERMELK  
OP DE ONTWIKKELING  
VAN IMMUNITEIT  
TEGEN STAPHYLOCOCCEN

R. C. A. SENGERS



ONDERZOEK NAAR DE INVLOED VAN MOEDERMELK  
OP DE ONTWIKKELING VAN IMMUNITEIT  
TEGEN STAPHYLOCOCCEN

PROMOTORES:

Prof. Dr. S.L. Bonting  
en  
Prof. Dr. J. van der Veen

**ONDERZOEK NAAR DE INVLOED  
VAN MOEDERMELK  
OP DE ONTWIKKELING  
VAN IMMUNITEIT  
TEGEN STAPHYLOCOCCEN**

(STUDIES ON THE EFFECT OF HUMAN MILK  
IN THE DEVELOPMENT OF ANTISTAPHYLOCOCCAL IMMUNITY)

**PROEFSCHRIFT**

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE  
AAN DE KATHOLIEKE UNIVERSITEIT TE NIJMEGEN  
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR. A.J.H. VENDRIK,  
HOGLERAAR IN DE FACULTEITEN DER GENEESKUNDE  
EN DER WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN,  
VOLGENS HET BESLUIT VAN DE SENAAT IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN  
OP VRIJDAG 17 FEBRUARI 1967 DES NAMIDDAGS TE 2 UUR  
DOOR  
**ROBERTUS CAROLUS ANTONIUS SENGERS**  
GEBOREN TE NIJMEGEN

1967

THOBEN OFFSET NIJMEGEN



Aan mijn Ouders  
Aan mijn Vrouw

5



Voor de steun en interesse van J.M.F. Trijbels (dipl.chem.), Mr J.M.M. van der Velden, N.J. de Vries, alsmede voor de hulp van Mej. M.G. Colaris, ben ik hen en voorts allen, die mij op enige wijze hebben gestimuleerd, oprechte en hartelijke dank schuldig.

# INHOUDSOPGAVE

	blz.
VOORWOORD . . . . .	9
Hoofdstuk I:	
HUIDIG INZICHT IN DE IMMUNITEITSONTWIKKELING TEGEN STAPHYLOCOCCEN . . . . .	11
1.1 Inleiding . . . . .	11
1.2 Antigene eigenschappen . . . . .	11
1.3 Extracellulaire produkten . . . . .	12
2 Antibacteriële immuniteit . . . . .	14
3 Antitoxische immuniteit . . . . .	19
Hoofdstuk II:	
MATERIALEN EN METHODEN . . . . .	25
Hoofdstuk III:	
DE INVLOED VAN MOEDERMELK OP DE ONTWIKKELING VAN IMMUNITEIT TEGEN STAPHYLOCOCCEN . . . . .	29
1 Inleiding . . . . .	29
2 Resultaten . . . . .	30
2.1 Bevestiging van de resultaten van György en standaardi- sering van de proefopstelling . . . . .	30
2.2 Reacties van muizen in de voorbehandelingsperiode . . . . .	31
2.3 Duur van bescherming . . . . .	33
2.4 Passieve immunisatie . . . . .	36
2.5 Invloed van verschillende doses staphylococcen . . . . .	38
2.6 Invloed van plaats en tijdstip van injectie van moedermelk . . . . .	41
2.7 Invloed van verschillende fracties van moedermelk . . . . .	43
3 Beschouwingen . . . . .	46
Samenvatting . . . . .	48

Hoofdstuk IV:

ONDERZOEK NAAR ADJUVANS-WERKING VAN MOEDERMELK	51
1 Inleiding . . . . .	51
2 Resultaten . . . . .	51
2.1 Vergelijking van effecten door endotoxines en moedermelk	51
2.2 Invloed van moedermelk op de antistoftiter tegen albumine	53
3 Beschouwingen . . . . .	54
Samenvatting . . . . .	55

Hoofdstuk V:

VORMING VAN TOXINE DOOR STAPHYLOCOCCEN . . . . .	57
1 Inleiding . . . . .	57
2 Resultaten . . . . .	57
2.1 Vorming van toxine in vitro . . . . .	57
2.2 Invloed van incubatieduur en zuurgraad op toxinevorming	59
2.3 Invloed van haemoglobine op toxinevorming . . . . .	62
2.4 Invloed van verschillende doses staphylococcen en moedermelk op toxinevorming . . . . .	65
2.5 Enkele eigenschappen van het toxine . . . . .	66
2.6 Onderzoek naar de invloed van moedermelk en haemoglobine op de virulentie van staphylococcen . . . . .	68
2.7 Invloed van bacteriën in het toxine . . . . .	69
3 Beschouwingen . . . . .	70
Samenvatting . . . . .	71

Hoofdstuk VI:

IMMUNOGENE EIGENSCHAPPEN VAN STAPHYLOCOCCEN-TOXINE . . . . .	73
1 Inleiding . . . . .	73
2 Resultaten . . . . .	73
2.1 Actieve immunisatie met toxine . . . . .	73
2.2 Passieve immunisatie met toxine . . . . .	74
2.3 Vergelijking van het toxine met $\alpha$ -haemolysine . . . . .	75
3 Beschouwingen . . . . .	78
Samenvatting . . . . .	80

BESCHOUWINGEN EN SAMENVATTING . . . . .	81
---	----

SUMMARY . . . . .	85
-------------------	----

LITERATUUR . . . . .	89
----------------------	----

## VOORWOORD

In 1962 deelden Györgyen medewerkers mede, dat muizen door een voorbehandeling met sublethale doses levende staphylococcen en moedermelk tegen een lethale dosis levende staphylococcen werden beschermd. Noch voorbehandeling met staphylococcen alleen, noch voorbehandeling met uitsluitend moedermelk resulteerde in een even grote bescherming. Wij achtten het nuttig om te onderzoeken of een of meer stoffen uit moedermelk verantwoordelijk kon (konden) worden gesteld voor dit effect. Daarom hebben wij muizen voorbehandeld met fracties van moedermelk en staphylococcen volgens de methode van György en medewerkers (1962). Wij hebben onderzocht, of fracties uit moedermelk eenzelfde effect uitoefenden als ongefractioneerde moedermelk. Het onderzoek werd voor het grootste deel verricht onder leiding van Prof. Dr F.W.Zilliken. Het gelukte ons niet de stof te isoleren, die verantwoordelijk was voor de beschermende werking.

Tijdens deze experimenten verkregen wij echter enige gegevens over de werkwijze van moedermelk. Bovendien verwierven wij een beter inzicht in het mechanisme van de bescherming tegen staphylococcen. Daarom besloten wij de pogingen om de verantwoordelijke stof uit moedermelk te isoleren voorlopig te staken. In dit proefschrift zullen de uitkomsten van het onderzoek naar het mechanisme van de beschermende werking van moedermelk bij muizen worden vermeld.



# HOOFDSTUK I

## HUIDIG INZICHT IN DE IMMUNITEITSONTWIKKELING TEGEN STAPHYLOCOCCEN

### § 1.1 Inleiding

*Staphylococcus aureus* wordt in Bergey's manual of determinative bacteriology gerekend tot het geslacht *Staphylococcus*, dat behoort tot de familie *Micrococcaceae* (Breed e.m., 1957). Dit micro-organisme is bolvormig met een diameter van 0,8-1,0  $\mu$  en komt afzonderlijk, in paren, in korte ketens en in onregelmatige klompjes voor. De bacterie groeit goed op gewone voedingsbodems en in bouillon. De optimale temperatuur voor de groei is 37°C. Ook onder anaërobe omstandigheden groeit het micro-organisme goed. Bij de bespreking van de eigenschappen van *Staphylococcus aureus* beperken wij ons tot een samenvatting van enkele gegevens uit de literatuur, die betrekking hebben op eigenschappen, die voor ons onderzoek van belang zijn.

### § 1.2 Antigene eigenschappen

Uit serologische onderzoeken van Oeding (1960) is gebleken, dat het oppervlak van staphylococci bestaat uit een mozaïek van antigenen. Een classificatie van de antigenen op grond van localisatie, functie en chemische opbouw is nog niet mogelijk. De onderzoeken van Oeding zijn gebaseerd op antigeen-antilichaamreacties. Hij maakt onderscheid tussen groep- en typespecifieke antigenen.

Enige groepspecifieke antigenen zijn nader geïdentificeerd. De celwanden kunnen, nadat de cellen op mechanische wijze kapot gemaakt zijn, eenvoudig door middel van gefractioneerde centrifugatie worden geïsoleerd. Uit de celwanden is door Löfkvist en Sjöquist (1962) een eiwit geïsoleerd, dat identiek bleek te zijn met 'proteïne antigen' van Verwey (1940) en het 'antigen A' van Jensen (1958). Dit antigeen kan door middel van agglutinatie- en precipitatiereacties worden aangetoond (Oeding, 1965). Door de laatstgenoemde auteur is nog een ander groepspecifiek eiwitantigeen beschreven, dat in staat is met tannine behandel-

de schapeerythrocyten zodanig te modificeren, dat zij met immuunserum agglutineren (Oeding, 1965).

Na behandeling van de celwanden met proteolytische enzymen blijft er een mucopeptide-teichoïnezuurcomplex over (Strominger, 1965). Teichoïnezuur is een polymeer van ribitolfosfaat. Aan het C-4 atoom van de ribitoleenheden is N-acetylglucosamine gekoppeld in  $\alpha$ - of  $\beta$ -glycosidische binding. Aan het C-2 of C-3 atoom is alanine gebonden door een labiele esterbinding (Baddiley e.m., 1962). Het teichoïnezuur met N-acetylglucosamine in  $\beta$ -glycosidische binding is identiek aan polysacharide A, een groepspecifiek antigeen, dat door middel van precipitatie-acties aantoonbaar is. Het teichoïnezuur met N-acetylglucosamine in  $\alpha$ -glycosidische binding is identiek aan polysacharide 263, ook beschreven als polysacharide B (Davison e.m., 1964). Het is eveneens een groepspecifiek antigeen, dat door middel van precipitatie-acties aantoonbaar is.

Er bestaan een groot aantal typespecifieke antigenen, waarvan er tenminste 30 bekend zijn (Haukenes, 1963, 1964; Hofstad, 1964). De chemische opbouw is onbekend, maar Oeding (1965) veronderstelt, dat de meeste eiwitten zijn en enige polysachariden. Omdat de meeste stammen twee of meer typespecifieke antigenen bezitten en het antigenenpatroon ingewikkeld is, is Oeding er niet in geslaagd *Staphylococcus aureus* in te delen in duidelijk omschreven serologische typen.

### § 1.3 Extracellulaire produkten

Staphylococcen vormen vele extracellulaire produkten. Bernheimer en Schwartz (1961) onderscheidden na zetmeelgelectrophorese van een kiemvrij gemaakt groeimedium 14 eiwitbandjes. Enige van deze produkten zijn uitgebreid onderzocht.

Coagulase is een eiwit met een moleculair gewicht van ongeveer 44000. Samen met 'coagulase reacting factor' (C.R.F.) zet coagulase fibrinogeen om in fibrine op een wijze, die niet te onderscheiden is van de omzetting van fibrinogeen onder invloed van prothrombine (Tager en Drummond, 1965). C.R.F. is een niet geïdentificeerde stof, die in serum en ook in verschillende weefsels voorkomt en zeker niet hetzelfde is als prothrombine.

Bovendien inactiveert coagulase een factor in het serum, die verantwoordelijk is voor de lethale werking van serum op *Staphylococcus epidermis* (Elek, 1959). De rol, die door coagulase gespeeld wordt bij het ziekmakende vermogen van staphylococcen, is niet bekend. Mis-

schien wordt onder invloed van coagulase een fibrinemantel om staphylococcen gevormd, waardoor de phagocytose wordt belemmerd. Op serologische gronden is vastgesteld, dat de antigene structuur van coagulases van verschillende stammen niet identiek is.

Sommige stammen vormen een stof, de zogenaamde 'clumping factor', waardoor de bacteriën samenklonteren in de aanwezigheid van fibrinogeen. Deze factor werd door Duthie (1954) beschreven als 'gebonden coagulase'. Het verschilt echter, onder andere in antigeen opzicht, van het bovengenoemde 'vrije coagulase', waarvan het ook geen precursor is (Tager en Drummond, 1965).

Staphylococcen kunnen verschillende haemolysines vormen.  $\alpha$ -haemolysine is een eiwit met een moleculair gewicht van ongeveer 44000. De stof is lethaal voor muizen, konijnen en andere dieren, veroorzaakt necrose van de huid na intracutane inspuiting bij verschillende species, met name bij het Guinees biggetje en veroorzaakt lysis van de erythrocyten van verschillende species, vooral van die van het konijn. Het is een enzym, dat waarschijnlijk inwerkt op celmembranen, maar waarvan het werkelijke substraat nog onbekend is (Bernheimer, 1965). Er bestaat geen verschil in antigene eigenschappen tussen het  $\alpha$ -haemolysine van de ene stam en  $\alpha$ -haemolysine van andere stammen.

$\beta$ -haemolysine lyseert erythrocyten van konijnen niet, maar wel die van andere diersoorten, onder andere van schapen. Het mist de dermonecrotische en lethale eigenschappen van het  $\alpha$ -haemolysine en is daarvan serologisch te onderscheiden. Door afkoelen van 37°C tot 4°C neemt de lyserende werking van  $\beta$ -haemolysine op erythrocyten van schapen toe: het zogenaamde 'hot-cold-lytic effect'.

$\delta$ -haemolysine lyseert onder meer de erythrocyten van de mens, in tegenstelling tot  $\alpha$ - en  $\beta$ -haemolysine. Het zou volgens Gladstone en Van Heyningen (1957) identiek zijn aan een leucocidine, dat leucocyten van verschillende diersoorten aantast, echter niet die van het schaap. Dit leucocidine zou inwerken op de kern van de cel.

Naast het leucocidine, dat waarschijnlijk identiek is aan  $\delta$ -haemolysine, bestaat er nog een ander leucocidine. Dit leucocidine werkt op polymorphonucleaire leucocyten en macrophagen van mens en konijn (Woodin en Wieneke, 1966). De cellen lyseren niet, maar er treedt wel een destructie van granulae op onder invloed van het leucocidine. Verder neemt de doorlaatbaarheid van de cel voor kationen en water toe en tredende cytoplasmatische granulae naar buiten. Bovendien heeft men een verandering in het fosformetabolisme geconstateerd (Wooding, 1965). Door Woodin zijn twee leucocidines onderscheiden, die F(fast) en S(slow) leucocidine werden genoemd op grond van hun verschillende



elutiesnelheid bij chromatografie op een ionenwisselaar. Gecombineerd is hun activiteit tien maal zo groot als afzonderlijk. De beide leucocidines tonen een antigene werking.

Fibrinolysine en hyaluronidase zijn enzymen, die eventuele barrières van de gastheer (fibrine en hyaluronzuur) kunnen afbreken. Daarnaast onderscheidt men nog andere extracellulaire producten zoals proteases, lipases, ribonucleases, waarvan men aanneemt, dat zij geen of een onbeduidende rol spelen bij het ziekmakende vermogen (Elek, 1959).

Tenslotte moge vermeld worden, dat staphylococce enterotoxines kunnen vormen. Ze kunnen in het voedsel worden gevormd, maar komen ook wel in het lichaam vrij bij langdurige behandeling met antibiotica (Dearing, 1956). Casman (1958, 1960) heeft aangetoond, dat er warmte-resistente en warmte-labiele enterotoxines voorkomen. Op serologische gronden kunnen enterotoxine A, B, C en D worden onderscheiden (Casman e.m., 1963).

## § 2 Antibacteriële immuniteit

Smith en medewerkers (1960) hebben het verloop van een fatale infectie met staphylococce bij muizen beschreven. Deze auteurs merkten op, dat de dieren aanvankelijk dicht bij elkaar gingen liggen. Na enige tijd ontstond er een dyspnoe. Vervolgens ontstond er een hyperactiviteit en tenslotte stierven de dieren na enige convulsies in een ernstige cyanose. Het klinisch verloop was niet afhankelijk van de weg van besmetting. De proefdieren stierven in het algemeen 6 - 12 uren na het toedienen van de staphylococce. Smith en medewerkers hebben, evenals Gorrill en McNeil (1963) muizen langs intraveneuze, intraperitoneale en intracerebrale weg besmet. De laatstgenoemde auteurs bepaalden op verschillende tijdstippen na de besmetting het totale aantal in het lichaam aanwezige staphylococce. Er werd vastgesteld, dat de dosis, die lethaal was voor 50% van de dieren, voor verschillende wegen van besmetting aanzienlijk verschilde. Het aantal bacteriën, dat op het moment van sterven in het lichaam van de muizen aanwezig was, verschilde echter veel minder. De auteurs meenden, dat de uiteindelijke bacteriënconcentratie een bepalende factor was voor de dood van proefdieren. Door muizen te besmetten met zeer veel bacteriën konden Smith en medewerkers (1960) de periode tussen toediening van bacteriën en de dood van de proefdieren reduceren tot 60 minuten. Laatstgenoemde auteurs menen derhalve, dat de dood van proefdieren onafhankelijk is van het al of niet gevormd worden van abscessen; vooral

het aantal in het lichaam aanwezige bacteriën zou van belang zijn. Op grond hiervan en van het klinisch verloop veronderstelden deze onderzoekers, dat de dood veroorzaakt werd door een of meer toxische stoffen. De produktie ervan zou vooral afhankelijk zijn van het aantal bacteriën.

Morse (1962) en Kapral (1965) menen, dat  $\alpha$ -haemolysine uiteindelijk verantwoordelijk kan zijn voor de dood van proefdieren na besmetting met een lethale dosis levende staphylococcen, omdat het in vitro geproduceerde  $\alpha$ -haemolysine lethale eigenschappen heeft. Na toediening van voldoende bacteriën zou er voldoende  $\alpha$ -haemolysine in het lichaam van proefdieren gevormd worden om de dood te kunnen veroorzaken.

In deze paragraaf zullen verder enige gegevens uit de literatuur worden genoemd, over immunisatie van proefdieren met staphylococcen of produkten ervan. Wij hebben ons beperkt tot gegevens, die betrekking hebben op onderzoekingen naar bescherming tegen een lethale dosis levende staphylococcen of staphylococcentoxines. Onderzoekingen over immunisatie tegen een niet lethale dosis blijven buiten beschouwing, omdat een dergelijke dosis door ons niet werd gebruikt.

Het blijkt, dat proefdieren door immunisatie met levende staphylococcen een lethale dosis levende staphylococcen kunnen overleven. Na toediening van een immuniserende dosis staphylococcen vermenigvuldigen de bacteriën zich in het lichaam van de gastheer en komen bacteriële produkten vrij. Zowel de bacteriecellen als de bacteriële produkten kunnen in antigeen opzicht actief zijn. Het is zeer moeilijk uit te maken, welke antilichamen verantwoordelijk zijn voor de immuniteit tegen een lethale dosis staphylococcen. Dit is minder moeilijk vast te stellen, indien proefdieren gevaccineerd worden met dode bacteriecellen of fracties daarvan, of met bacteriële produkten. Daarom hebben wij hieronder meer gedetailleerd gegevens over laatstgenoemde onderzoekingen vermeld.

Forssman (1937, 1938) meende, dat de immuniteit tegen staphylococcen gericht was tegen de bacteriecellen en berustte op de aanwezigheid van antilichamen. Na immunisatie door 6 intraveneuze injecties van staphylococcen, die door formol waren gedood, overleefden 13 van 14 onderzochte konijnen een lethale dosis van de homologe stam; deze werd 84-98 dagen na de laatste injectie van het vaccin toegediend. Deze auteur kon de immuniteit met behulp van serum van geïmmuniseerde dieren op controledieren overdragen. De titer van antilichamen tegen lysines bleek van geen betekenis te zijn. Cowan (1939) vaccineerde konijnen langs intraveneuze weg met door warmte gedode bacteriën. Acht van 17 gevaccineerde proefdieren overleefden een lethale dosis

van de homologe stam.

Na toediening van 6 intraveneuze injecties van door formol gedode staphylococcen aan konijnen konden Kitching en Farrell (1936) bij deze dieren geen immuniteit waarnemen. Geen van 6 onderzochte proefdieren overleefde een lethale dosis van de homologe stam. Subcutane toediening van vaccin aan konijnen en muizen veroorzaakte evenmin immuniteit. Wel overleefden alle van 6 onderzochte konijnen en 42 van 50 onderzochte muizen een lethale dosis met de homologe stam na vaccinatie met kiemvrij gemaakt medium, waarin staphylococcen waren gegroeid en dat met formaline was behandeld. Bij deze onderzoeken werd gebruik gemaakt van een stam, die grote hoeveelheden  $\alpha$ -haemolysine produceerde.

Een mogelijke verklaring voor deze tegenstrijdige uitkomsten werd door Stamp (1961, 1964) gegeven. Deze auteur vaccineerde konijnen door 7 subcutane injecties van bacteriën, die door formol waren gedood. Tien van 12 onderzochte proefdieren overleefden een lethale dosis bacteriën, indien voor vaccinbereiding en 'challenge' een stam werd gebruikt, die weinig  $\alpha$ -haemolysine produceerde. Werd evenwel een stam gebruikt, die veel  $\alpha$ -haemolysine produceerde, dan leidde vaccinatie daarmee niet tot bescherming tegen een lethale dosis. Aangezien de vaccinbereiding en vaccinatie in beide gevallen identiek geschiedde, meende deze auteur, dat de immuniteit minder was, naarmate de stam meer  $\alpha$ -haemolysine vormde. De immuniteit bleek evenwel ook af te hangen van de virulentie van de staphylococcestam. Indien een zeer virulente stam werd gebruikt, kon Stamp een immuniteit opwekken, ondanks het feit, dat de stam veel  $\alpha$ -haemolysine produceerde. In het laatste geval werden vanzelfsprekend minder bacteriën in het lichaam van het proefdier gebracht bij de 'challenge' dan bij gebruik van een minder virulente stam. Bij zeer hoge virulentie van de bacteriën zou volgens Stamp de gevormde hoeveelheid  $\alpha$ -haemolysine een minder belangrijke rol spelen bij het bepalen van de sterfte van proefdieren na een lethale dosis staphylococcen. Deze auteur meende derhalve, dat bij immuniteit tegen staphylococcen immuniteit tegen de bacteriecellen in eerste instantie de belangrijkste rol speelde, maar dat deze immuniteit door toxineproductie kon worden doorbroken.

Behalve met door formol gedode bacteriën kon Stamp eveneens met succes immuniseren met een oplosbare fractie van cellen, die ultrasoon gedesintegreerd waren. De immuniteit was alleen aantoonbaar, indien voor de 'challenge' gebruik werd gemaakt van een zeer virulente stam óf van een minder virulente stam, die niet veel  $\alpha$ -haemolysine produceerde. Geen immuniteit kon worden opgewekt tegen een stam,

die niet zeer virulent was, maar veel  $\alpha$ -haemolysine produceerde. Door de pH van de fractie in stappen te verlagen en door extractie met trichloorazijnzuur volgens de methode van Verwey (1940) ontstonden 3 onderscheiden fracties: A, B en C. Fractie B was het neerslag, dat ontstond na extractie met trichloorazijnzuur. Na vaccinatie met fractie B overleefden 14 van 28 onderzochte konijnen een lethale dosis met de homologe stam (Stamp en Edwards, 1964).

Koenig en medewerkers (1962, 1962a) vaccineerden muizen langs intraveneuze weg met door warmte gedode bacteriën van een stam, die een kapsel bezat. Vier en twintig van 32 gevaccineerde proefdieren overleefden een lethale dosis van de homologe stam. De dieren waren ook immuun tegen 4 heterologe stammen, die eveneens een kapsel bezaten. Indien voor vaccinbereiding een stam zonder kapsel werd gebruikt, was er geen immuniteit tegen stammen met kapsel aantoonbaar. Deze auteurs meenden, dat de proefdieren na vaccinatie met gekapselde bacteriën waren beschermd, omdat de bacteriën, die als 'challenge' werden toegediend, efficiënt werden gefagocyteerd, dank zij de aanwezigheid van antilichamen tegen een kapselantigeen, dat de phagocytose remde.

Ook andere auteurs hebben op het belang van de phagocytose gewezen voor het verloop van de infectie na het toedienen van een lethale dosis levende staphylococcen. Cohn (1963) toonde aan, dat de phagocytose van staphylococcen bij dieren, die waren geïmmuniseerd, was toegenomen.

Uit het kapsel van een staphylococcestam is door Morse (1962) een phagocytose remmend antigeen geïsoleerd. Het bestaat voor 70% uit suikers, waarvan 30-35% glucosamine. Het bevat geen muraminezuur. Bovendien komen er enige aminozuren in voor. Het antigeen is bekend als 'Staphylococcal Surface Antigen' (S.S.A.). Na toediening van een dosis antigeen overleefden 18 van 20 onderzochte muizen 50-100 LD<sub>50</sub> van de homologe stam, indien deze was gesuspenderd in mucine. (Volgens grove schatting werden per muis 10<sup>7</sup> bacteriën toegediend). Geen immuniteit bestond voor 5-10 LD<sub>50</sub> van in fysiologisch zout gesuspenderde bacteriën. (Volgens grove schatting werden per muis 10<sup>9</sup> bacteriën toegediend). In 1 LD<sub>100</sub> zijn ongeveer 1000 keer zo weinig staphylococcen aanwezig, als de bacteriën zijn gesuspenderd in mucine, als in 1 LD<sub>100</sub>, indien de bacteriën zijn gesuspenderd in fysiologisch zout. Volgens Morse kon het grotere aantal bacteriën, dat in fysiologisch zout was gesuspenderd, niet efficiënt worden gefagocyteerd. De phagocytose zou wel voldoende bacteriën kunnen elimineren, als de bacteriën in mucine waren gesuspenderd.

Morse isoleerde het phagocytose remmende antigeen (S.S.A.) uit het

groeimedium. Naar de mening van deze en ook andere auteurs (Oeding, 1965) verschijnen verschillende cellulaire antigenen in het groeimedium. Morse toonde door absorptieproeven aan, dat het antigeen inderdaad van de bacteriecellen afkomstig was. Er ontstond een overgevoeligheidsreactie bij konijnen, die waren geïmmuniseerd met door warmte gedode bacteriecellen, na intradermale injectie van geringe hoeveelheden van S.S.A.

Door Fisher en medewerkers (1963) is uit de cellen van een kapsel bezittende stam, een stof geïsoleerd, die 'Staphylococcal Polysaccharide Antigen' (S.P.A.) werd genoemd. Het antigeen is waarschijnlijk identiek aan het antigeen van Morse (S.S.A.). Ook dit antigeen was in staat immuniteit op te wekken tegen in mucine gesuspendeerde staphylococcen.

Fisher (1962) immuniseerde muizen met kiemvrij gemaakt medium, waarin staphylococcen waren gegroeid. De dieren waren immuun tegen ongeveer 100 LD<sub>50</sub>, als de 'challenge' bacteriën waren gesuspendeerd in mucine; ze waren niet immuun tegen 20 LD<sub>50</sub>, als de 'challenge' bacteriën in fysiologisch zout waren gesuspendeerd. Misschien heeft Fisher niet met het cellulaire 'S.S.A.'-antigeen geïmmuniseerd, maar met een extracellulair produkt. De auteur merkte echter zelf op, dat het verantwoordelijke antigeen mogelijk identiek was aan dat van Morse (S.S.A.).

Na immunisatie met een phagocytose remmend antigeen waren proefdieren alleen beschermd tegen een lethale dosis staphylococcen, indien de bacteriën gesuspendeerd waren in mucine. Na immunisatie met gedode bacteriën overleefden proefdieren ook een lethale dosis staphylococcen, die gesuspendeerd waren in fysiologisch zout. Dat het phagocytose remmende antigeen niet alléén van belang was bij het opwekken van immuniteit door gedode bacteriën, werd door Ekstedt (1963 a, b, c) duidelijk aangetoond. Deze auteur bevestigde, dat proefdieren door vaccinatie met door warmte gedode bacteriën beschermd konden worden tegen een lethale dosis van de homologe stam, zowel tegen bacteriën, die in mucine waren gesuspendeerd, als tegen bacteriën, die in fysiologisch zout waren gesuspendeerd. Werd het vaccin echter met trypsine behandeld, dan was nog slechts immuniteit tegen staphylococcen in mucine aantoonbaar. De auteur heeft getracht het antigeen, dat verantwoordelijk was voor de immuniteit tegen staphylococcen in fysiologisch zout, te isoleren. Met het oog hierop werden de cellen op mechanische wijze gedesintegreerd en werd uit de oplosbare fractie met ammoniumsulfaat een eiwit geprecipiteerd. Door vaccinatie met dit antigeen werden muizen immuun tegen staphylococcen in mucine en tegen staphylococcen in fysiologisch zout. Werd het antigeen echter

gekookt of met trypsine behandeld, dan was geen immuniteit tegen staphylococcen in fysiologisch zout meer aanwezig, maar wel tegen staphylococcen in mucine. De auteur concludeerde, dat tenminste twee antigenen immuniteit konden opwekken en wel: een polysacharide antigeen tegen bacteriën, die in mucine zijn gesuspenseerd, en een eiwit antigeen tegen bacteriën, die in fysiologisch zout of in mucine zijn gesuspenseerd. Ook antilichamen tegen celwanden verleenden muizen bescherming tegen staphylococcen, die in mucine waren gesuspenseerd (Ekstedt, 1965). Zowel teichoïnezuur als het antigeen van Morse (S.S.A.) konden de beschermende antilichamen uit het serum wegvangen. De eiwitantigenen van Jensen en Verwey bleken hiertoe niet in staat. Uit immunodiffusie- en immunoëlectrophoreseproeven bleek, dat teichoïnezuur en S.S.A. in antigeen opzicht identiek waren.

Tenslotte moge nog het onderzoek van György en medewerkers (1962) worden vermeld. Deze onderzoekers konden muizen beschermen tegen een lethale dosis staphylococcen door vaccinatie met staphylococcen en moedermelk. Hierop komen wij later terug.

### § 3 Antitoxische immuniteit

Omdat  $\alpha$ -haemolysine misschien een belangrijke rol speelt bij het ziekmakende vermogen van staphylococcen, hebben verschillende auteurs getracht proefdieren met  $\alpha$ -haemolysine te immuniseren tegen een lethale dosis staphylococcen. Zoals reeds is vermeld, heeft Forssman (1938) gevonden, dat antilichamen tegen lysines geen rol speelden bij de immuniteit tegen een lethale dosis staphylococcen. Kapral (1965) toonde aan, dat antilichamen tegen  $\alpha$ -haemolysine slechts partiële bescherming verlenen tegen een lethale dosis staphylococcen; de overlevingstijd was verlengd, maar de dieren stierven uiteindelijk toch.

Koenig en medewerkers (1962b) waren in staat proefdieren te immuniseren tegen een lethale dosis  $\alpha$ -haemolysine door toediening van toxoid. Het toxoid werd bereid door medium, waarin  $\alpha$ -haemolysine aanwezig was, kiemvrij te maken en daarna te behandelen met formaline. De door toxoid tegen  $\alpha$ -haemolysine opgewekte immuniteit beschermde proefdieren evenwel niet tegen een lethale dosis staphylococcen. Na vaccinatie met bacteriecellen waren proefdieren wel beschermd tegen een lethale dosis staphylococcen maar niet tegen een lethale dosis  $\alpha$ -haemolysine. Het bleek, dat antilichamen tegen bacteriecellen in tegenstelling tot antilichamen tegen  $\alpha$ -haemolysine de fagocytose van bacteriën bevorderden. Versterkte fagocytose ging ge-

paard met bescherming tegen een lethale dosis staphylococcen. Deze auteurs concludeerden, dat antilichamen tegen  $\alpha$ -haemolysine van ondergeschikte betekenis zijn en dat phagocytose van meer belang is.

Andere auteurs menen, dat antilichamen tegen  $\alpha$ -haemolysine proef-dieren onder bepaalde omstandigheden wel kunnen beschermen tegen een lethale dosis staphylococcen. North (1959) diende aan muizen serum tegen  $\alpha$ -haemolysine toe. Het serum was bereid bij een paard. De proef-dieren overleefden hierna 4 LD<sub>50</sub> staphylococcen, die in 1% menselijk fibrinogeen en 1% menselijk plasma (het z.g. 'clotting mixture' van Boake, 1956) waren gesuspendeerd. De dieren waren beschermd, indien het serum 24 uren voor de toediening van staphylococcen was ingespo-ten. Er was geen immuniteit aantoonbaar, als het interval 2 uren be-droeg. Werden de bacteriën evenwel gesuspendeerd in fysiologisch zout, dan waren de proefdieren zowel 2 als 24 uren na toediening van serum beschermd. Deze auteur merkte op, dat het niet zeker was, dat de im-muniteit uitsluitend te danken was aan antilichamen tegen  $\alpha$ -haemoly-sine, want serum tegen diphtherie-toxine, waarin geen antilichamen tegen  $\alpha$ -haemolysine aantoonbaar waren, verleende ook bescherming tegen een lethale dosis staphylococcen. Ook Kitching en Farrell (1936) konden met 'antilynsines' van een paard muizen beschermen tegen een lethale dosis staphylococcen, doch niet met antilynsines, die waren op-gewekt bij konijnen of muizen.

Frapplier en Sonea (1956) dienden aan muizen antilichamen tegen  $\alpha$ -haemolysine toe. Er werd niet aangegeven bij welk dier de antilicha-men waren opgewekt. De dieren waren hierna beschermd tegen een lethale dosis staphylococcen, die intracerebraal werd ingespoten. De onderzoekers telden het aantal staphylococcen bij de injectieplaats en in het perifere bloed op verschillende tijdstippen na de toediening van de bacteriën. De vermenigvuldiging van de bacteriën werd door de serumprophylaxe niet beïnvloed. De auteurs meenden, dat de mortali-teit bij de niet geïmmuniseerde dieren veroorzaakt werd door toxine(s), dat (die) in vivo werd(en) geproduceerd. Passief geïmmuniseerde dieren zouden de lethale dosis overleven door neutralisatie van toxine(s) door antilichamen. De auteurs merkten echter op, dat het antiserum naast antilichamen tegen  $\alpha$ -haemolysine ook andere antilichamen bevatte.

Fisher (1957) vaccineerde muizen met kiemvrij gemaakt medium, waarin staphylococcen waren gegroeid en waarin  $\alpha$ -haemolysine aan-wezige was. De dieren waren beschermd tegen een lethale dosis levende staphylococcen. Uit het medium isoleerden Robson en Fisher (1965) twee fracties. De ene fractie was niet toxisch, warmtestabiel en niet identiek met  $\alpha$ -haemolysine, coagulase, leucocidine, dermonecrotoxine,

lecithinase, fibrinolysine, staphylokinase, protease en ribonuclease. Na immunisatie met deze fractie overleefden 35 van 71 behandelde muizen een lethale dosis levende staphylococcen, die gesuspenseerd waren in het 'clotting mixture' van Boake. De andere fractie was een gedeeltelijk gezuiverd  $\alpha$ -haemolysinepreparaat. Hoge, reeds toxische doses hiervan waren noodzakelijk om immuniteit op te wekken. De auteurs wezen er op, dat in de laatste fractie misschien ook niet toxisch antigeen aanwezig was.

Ook coagulase, een ander staphylococconproduct, kan onder speciale omstandigheden immuniteit tegen staphylococcen opwekken. Konijnen, die geïmmuniseerd waren met een gedeeltelijk gezuiverd coagulasepreparaat, bleven gemiddeld 9,3 dagen na toediening van een lethale dosis coagulase positieve staphylococcen in leven. Controledieren, waaraan eenzelfde dosis staphylococcen was toegediend, stierven reeds na gemiddeld 1,5 dag. Het preparaat wekte geen immuniteit op tegen een coagulase negatieve stam (Boake, 1956).

Lominski en medewerkers (1962) immuniseerden konijnen met kiemvrijgemaakt medium, waarin staphylococcen waren gegroeid en waarin coagulase en andere antigenen aanwezig waren. Zij gebruikten staphylococcenstammen, die behoorden tot phaaggroep I, en een stam, die behoorde tot phaaggroep III. Na immunisatie werden de dieren geïnfecteerd met stammen van de phaaggroep I en met stammen van de phaaggroep III. Vaccinatie met antigenen van groep I staphylococcen verleende geen bescherming tegen staphylococcen van de groepen I en III. Vaccinatie met antigenen van groep III staphylococcen wekte alleen immuniteit op tegen staphylococcen van phaaggroep III, niet tegen staphylococcen van groep I. Coagulase was waarschijnlijk verantwoordelijk voor de beschermende werking. De konijnen werden tenminste twee maanden na het toedienen van de lethale dosis geobserveerd.

Harrison (1964) kon bevestigen, dat coagulase van staphylococcen van phaaggroep III immuniteit opwekte tegen staphylococcen van phaaggroep III. Hierbij werd echter opgemerkt, dat er wel immuniteit werd waargenomen na 4 dagen, maar niet meer na 21 dagen.

Phagocytose is een belangrijk mechanisme, waardoor een gastheer zich kan verdedigen tegen staphylococcen. Zoals boven reeds is vermeld, kunnen sommige bacteriën zich aan phagocytose onttrekken door een kapselantigeen, dat de phagocytose remt. Bovendien beschikken sommige stammen over leucocidine, waardoor zij phagocyterende cellen kunnen elimineren.

Součková-Štěpánová en medewerkers (1965) hebben onderzocht, of antilichamen tegen leucocidine konijnen kunnen beschermen tegen sta-



phylococcen. Konijnen werden gevaccineerd met een toxoid, waarvan de belangrijkste antigene bestanddelen de F en S componenten van leucocidine waren. Als 'challenge' werd een stam gebruikt, die weinig  $\alpha$ -haemolysine produceerde. De concentratie van de suspensie werd zodanig gekozen, dat controledieren niet voor de derde dag na een intraveneuze injectie stierven. Tien dagen na de 'challenge' werden alle dieren gedood. De auteurs merkten op, dat in geen enkel geval een volledige bescherming werd verkregen. Bij alle dieren werden laesies in de nieren gevonden, waaruit staphylococcen werden gekweekt. Niettemin gingen na vaccinatie minder dieren dood, werden micro-organismen uit het bloed sneller geëlimineerd en was er een geringer gewichtsverlies dan bij niet gevaccineerde dieren. In dit verband moge bij wijze van uitzondering een onderzoek bij mensen worden genoemd. Bänffer (1961) vond, dat bij kraamvrouwen, die in een ziekenhuis waren bevallen, de frequentie van mastitis puerperalis kleiner was, naarmate de initiale anti-leucocidine titer hoger was.

Tenslotte willen wij nog wijzen op enkele onderzoeken over de beschermende werking van menselijk serum tegen staphylococcen. Sonea en medewerkers (1956) toonden aan, dat muizen na een intraperitoneale injectie van menselijk serum een lethale dosis staphylococcen, die langs intracerebrale weg werd toegediend, overleefden. Dit werd bevestigd door Fisher (1959) en Fisher (1960a, 1961). De laatstgenoemde auteur toonde aan, dat er geen relatie bestond tussen bactericide eigenschappen van menselijk serum in vitro en de beschermende werking in vivo. De beschermende factor was waarschijnlijk aanwezig in de  $\gamma$ -globulinefractie van menselijk serum, doch niet in het serum van niet geïmmuniseerde muizen, konijnen, Guinese biggetjes en geiten.

Samenvattend kan gezegd worden, dat staphylococcen immuniteit kunnen opwekken bij proefdieren. De bescherming berust op een complex mechanisme. De immuniteit blijkt op de eerste plaats af te hangen van de hoeveelheid toxine(s), die bacteriën, die als 'challenge' worden gebruikt, produceren. Als maat voor toxineproductie wordt door vele onderzoekers (al of niet terecht) de hoeveelheid geproduceerde  $\alpha$ -haemolysine gehanteerd.

Op de tweede plaats blijkt de immuniteit af te hangen van het aantal bacteriën, dat als 'challenge' wordt toegediend, en van de samenstelling van de vloeistof (fysiologisch zout, mucine), waarin de bacteriën gesuspendeerd zijn.

Op de derde plaats blijkt immuniteit niet alleen door bacteriecellen te kunnen worden opgewekt, maar ook door extracellulaire produkten. Men kan evenwel niet met zekerheid zeggen, dat in het laatste geval

immuniteit steeds door één extracellulair produkt werd opgewekt, omdat bijmenging van andere stoffen niet kon worden uitgesloten.

Indien men aanneemt, dat proefdieren na toediening van een lethale dosis staphylococcen sterven tengevolge van de werking van een of meer toxines, waarvan de produktie afhankelijk is van het aantal staphylococcen, dat in het lichaam aanwezig is, dan volgt hieruit, dat immuniteit tegen staphylococcen kan berusten op anticellulaire antistoffen, antitoxines of op beide soorten antistoffen. Een optimale immuniteit is aanwezig, indien antilichamen in voldoende hoge concentratie aanwezig zijn zowel tegen bacteriecellen als ook tegen extracellulaire produkten van het micro-organisme. Het lijkt erop, dat voor de ontwikkeling van een optimale immuniteit toediening van levende staphylococcen noodzakelijk is. Toediening van dode cellen of van afzonderlijke extracellulaire produkten resulteert waarschijnlijk slechts in een partiële immuniteit, die onder bepaalde omstandigheden weliswaar effectief kan zijn, maar onder andere omstandigheden kan worden doorbroken.

In dit proefschrift zullen resultaten van immunisatie met levende staphylococcen worden vermeld en gegevens over de invloed, die hierop wordt uitgeoefend door moedermelk. Om de invloed van moedermelk te verklaren zijn enige hypothesen opgesteld, die aan een kritisch onderzoek zijn onderworpen.



## HOOFDSTUK II

### MATERIALEN EN METHODEN

Micro-organisme: *Staphylococcus aureus*, Fritchie stam, geïsoleerd uit een granuloom (Bass en Higgingsbotham, 1960). De stam behoort tot phaag type 44 A. Hij produceerde  $\alpha$ - en  $\delta$ -haemolysine, coagulase, fibrinolysine, gelatinase en DNA-se. Hij vormde een gelige kleur op glycerol-mono-acetaat agar en veroorzaakte een troebeling in een plaat met menselijk serum. Hij vormde geen penicillinase en was gevoelig voor penicilline, streptomycine, chlooramphenicol, erythromycine en tetracycline. De stam werd ons door Professor P. György ter beschikking gesteld.

Groeimedia: Voor het bereiden van een vloeibaar medium werd 37 gram gedehydrerd 'brain-heart-infusion' opgelost in 1000 ml gedestilleerd water volgens het voorschrift van de fabrikant (Difco). Voor het bereiden van een vaste bodem werd aan bovengenoemde bouillon 15 gram 'nutrient agar' (Difco) toegevoegd. Daarna werd het geheel verwarmd tot een goede menging was opgetreden. Beide groeimedia werden op de gebruikelijke wijze gesteriliseerd en na 24 uren incubatie bij 37°C gecontroleerd op steriliteit. De groeimedia werden tenminste een keer per maand opnieuw bereid.

Kweken en oogsten: De staphylococceenstam werd bij 4°C op een vaste bodem in leven gehouden, waarbij hij iedere maand werd overgeënt op een nieuwe bodem, die na 14-16 uren incubatie bij 37°C opnieuw in een ijskast werd bewaard. Voor gebruik werd een subcultuur van de vaste bodem in bouillon gemaakt, die gedurende 14 uren werd geïncubeerd bij 37°C in een broedstoof. Daarna werd een nieuwe subcultuur gemaakt in verse bouillon (1 druppel bacteriesuspensie in 1 ml bouillon). Vervolgens werden deze bacteriën in een waterbad bij 37°C geïncubeerd, totdat de optische dichtheid bij 640 m $\mu$  gelijk was aan 0,70 (Coleman spectrofotometer). De inwendige diameter van de buis was 16,8 mm. In het algemeen werd dit bereikt na 3¼ uur. Daarna werden de bacteriën gedurende 30 minuten gecentrifugeerd bij 2700 omwentelingen per minuut (ongeveer 1200 x g), vervolgens gewassen met fysiologisch zout en gesuspenseerd in fysiologisch zout.

Bepaling van de concentratie van de bacteriesuspensie: Als maat werd de minimale dosis gebruikt, die lethaal was voor 100% der proefdieren binnen 24 uren na intraperitoneale injectie. Deze dosis wordt aangeduid met 1 LD<sub>100</sub> en werd bepaald met behulp van een virulentietest. Bacteriën, die waren gegroeid in 8 ml bouillon, werden na wassen gesuspendeerd in 6, 8, 10, 12, 14, 16 en 18 ml fysiologisch zout. Drie bacteriesuspensies met opeenvolgende concentraties werden intraperitoneaal bij muizen ingespoten. Voor iedere suspensie werden 10 muizen gebruikt. Het volume van het inoculum was steeds 0,3 ml. Indien de meest verdunde bacteriesuspensie binnen 24 uur de dood van minder dan 8 van de 10 proefdieren veroorzaakte en indien de beide andere suspensies de dood van tenminste 8 van de 10 proefdieren ten gevolge hadden, werd de minst geconcentreerde suspensie van de 2 laatstgenoemde beschouwd als de suspensie, die per 0,3 ml (de dosis, die aan ieder proefdier werd toegediend) 1 LD<sub>100</sub> bevatte.

Werd aan de gestelde voorwaarde niet voldaan, dan werd de virulentietest herhaald met suspensies met andere concentraties. Voor de bereiding van 1 LD<sub>100</sub> was in het algemeen het benodigde volume fysiologisch zout  $3/2$  x het volume bouillon, waarin de bacteriën waren gegroeid. Bij incidentele telling bleek het aantal bacteriën per 1 LD<sub>100</sub> ongeveer  $10^8$  te zijn.

Voor de bereiding van andere concentraties werd het volume fysiologisch zout, waarin de bacteriën uiteindelijk werden gesuspendeerd, gevarieerd. Onder  $1/100$  LD<sub>100</sub> werd een dosis verstaan, die 100 maal zo weinig bacteriën bevatte als een dosis van 1 LD<sub>100</sub>. Als 'challenge'-dosis is steeds 1 LD<sub>100</sub> gebruikt.

Moedermelk: Amerikaanse moedermelk werd ons toegezonden door bemiddeling van Professor P. György en Nederlandse moedermelk werd ons gratister beschikking gesteld door de Moedermelkcentrale van het Nederlandse Rode Kruis (hoofd: Dr G. A. A. Mastenbroek). De melk, die wij ontvingen, was gecontroleerd op bederf en bevroren. Na ontdooien werd de melk geautoclaveerd en subcutaan of intraperitoneaal bij muizen ingespoten in een volume van 0,3 ml. Indien moedermelk en staphylococci tezamen werden ingespoten, werden de staphylococci in een zodanige verdunning aan de moedermelk toegevoegd, dat uiteindelijk de gewenste concentratie staphylococci werd verkregen. Door toevoeging van bacteriesuspensie werd de moedermelk in geringe mate verdund. Inocula van moedermelk alleen werden in dezelfde mate verdund met fysiologisch zout.

De wijze van fractioneringen wordt in hoofdstuk III beschreven. Hier-

bij werd onder meer gebruik gemaakt van een Stock centrifuge en een Beckman model L preparatieve ultracentrifuge. Kolomchromatografie werd uitgevoerd met kiezelgel (Mallinckrodt), 100 mesh.

Proefdieren: Er werd gebruik gemaakt van mannelijke Swiss-muizen met een gewicht van 18-20 gram. De dieren waren gehuisvest in het centrale dierenlaboratorium van de Medische Faculteit van de Katholieke Universiteit (hoofd: Dr M.J. Dobbelaar), waar zij op de gebruikelijke wijze werden gevoederd (RMH-voeder (Hope Farms) en water, ad lib.). Bloed werd afgenomen volgens de methode van Sorg en Buckner (1964). Voor algemene verbloeding werd ook enucleatie toegepast. Bovendien werd gebruik gemaakt van Witte Nieuw Zeelander konijnen. Deze dieren waren eveneens gehuisvest in het centrale dierenlaboratorium en werden volgens de daar gebruikelijke methode gevoederd (LKK<sub>20</sub>-voeder (Hope Farms) en water, ad lib.). Bloed werd afgenomen door middel van punctie van een oorvene. Voor algehele verbloeding werden de arteriae carotides gekatetheriseerd.

Chemicaliën: Behalve van eenvoudige chemicaliën werd gebruik gemaakt van runderserumalbumine (Behringwerke), Na-penicilline G (Mycofarm), thiomersal, Staphylococcus  $\alpha$ -haemolysin (Wellcome Research Laboratories) en endotoxine van Escherichia Coli 0<sub>26</sub> : B<sub>6</sub> bereid volgens Westphal (Difco).

Eiwit werd bepaald volgens de methode van Lowry en medewerkers (1951).

Statistische analyses: Deze werden uitgevoerd in het instituut voor wiskundige dienstverlening van de Katholieke Universiteit (hoofd: Drs P. van Elteren). Hierbij is gebruik gemaakt van de volgende methoden:

1. De  $X^2$ -toets voor onafhankelijkheid in een  $k \times r$  tabel, d.w.z. in een tabel met twee ingangen met respectievelijk  $k$  en  $r$  klassen. Voor deze toets zij verwezen naar De Jonge (1958) en wel voor de gevallen, waarin  $k=2$  en/of  $r=2$  naar p. 193-208. Als toetsresultaat is de overschrijdingskans  $P$  opgegeven, met vermelding of deze significant was ( $P \leq 5\%$ ) of niet ( $P > 5\%$ ), eventueel met extra nadruk ('zeer significant') als  $P$  zeer klein was. Indien deze toets een significant resultaat oplevert, wijst dit erop, dat de twee indelingen zeer waarschijnlijk niet onafhankelijk zijn.

De toets is in de tekst kortweg aangeduid met ' $X^2$ -toets'.

2. De exacte toets voor  $2 \times 2$  tabel. Voor deze toets zij verwezen naar Rümke en Van Eeden (1961) p. 74-78. Bij de toepassing werden de tabellen van Lieberman en Owen (1961) geraadpleegd. Overigens is

de interpretatie hetzelfde als van de vorige toets. Bij toepassing van de exacte toets werd tweezijdig getoetst.

3. De toets tegen verloop van een aantal kansen van Van Eeden, kortweg de 'trendtoets van Van Eeden' genoemd. Voor deze toets zij verwezen naar Rümke en Van Eeden (1961), p. 87-89. Deze toets kan alleen worden toegepast op een  $2 \times k$  tabel, waarin de indeling in  $k$  klassen betrekking heeft op een kwantitatieve grootte en de andere op een ja/nee criterium. Als deze toets tot een significant resultaat leidt, kan men concluderen, dat het percentage der volgens het criterium met 'ja' beoordeelde gevallen een systematisch (stijgend of dalend) verloop vertoont met de beschouwde kwantitatieve grootte. De verdeling van de toetsingsgrootte werd benaderd door middel van de normale verdeling.
4. De toets van Wilcoxon voor twee steekproeven. Voor deze toets zij verwezen naar Rümke en Van Eeden (1961), p. 60-66. Deze toets kan worden gebruikt, indien men wil onderzoeken of twee steekproeven afkomstig zijn uit eenzelfde populatie. Indien deze toets een significant resultaat oplevert, wijst dit erop, dat de twee steekproeven zeer waarschijnlijk uit verschillende populaties afkomstig zijn. Met deze toets werd tweezijdig getoetst. Bij gebruik van deze toets werden de tabellen van Wabeke en Van Eeden (1955) geraadpleegd.

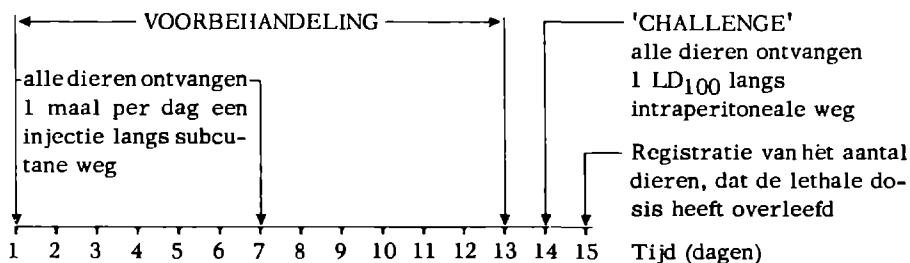
Bij de toetsen, genoemd onder 3. en 4., werden voor 'significant' dezelfde criteria gebruikt als genoemd onder 1.

# HOOFDSTUK III

## DE INVLOED VAN MOEDERMELK OP DE ONTWIKKELING VAN IMMUNITEIT TEGEN STAPHYLOCOCCEN

### § 1 Inleiding

In dit hoofdstuk zullen gegevens worden vermeld van onderzoeken, die werden uitgevoerd om de resultaten van György en medewerkers (1962) te bevestigen en waar mogelijk uit te breiden. Zoals reeds eerder is vermeld, waren de laatstgenoemde auteurs erin geslaagd muizen te beschermen tegen een lethale dosis levende staphylococceen door voorbehandeling met sublethale doses levende staphylococceen en moedermelk. Muizen werden een keer per dag gedurende 7 achtereenvolgende dagen subcutaan ingespoten met 1/100 LD<sub>100</sub> staphylococceen en moedermelk. Na zeven dagen rust ontvingen de proefdieren een intraperitoneale injectie van 1 LD<sub>100</sub>. Na 24 uren werd het aantal proefdieren, die de lethale dosis hadden overleefd, geregistreerd. Wij hebben bij onze experimenten dezelfde werkwijze aangehouden volgens de technische instructies ons alhier verstrekt door Mejjuffrouw S. Dhanamitta M.D., medewerkster van Prof. P. György. Schematisch is de methode weergegeven in figuur 1. Indien hiervan werd afgeweken, wordt dit in de tekst vermeld.



Figuur 1  
Schematische weergave van de methode  
toegepast ter vaststelling van de invloed van moedermelk  
op de ontwikkeling van immuniteit tegen staphylococceen

Gaarna wil ik de Heer J. Reitsma en zijn medewerkers bedanken voor hun steeds bereidwillig verleende medewerking.



## § 2 Resultaten

### 2.1 Bevestiging van de resultaten van György en standaardisering van de proefopstelling

Zoals reeds in het voorwoord is vermeld, hebben wij aanvankelijk getracht een stof uit moedermelk te isoleren, die verantwoordelijk zou kunnen zijn voor de beschermende werking van moedermelk. Met het oog hierop hebben wij de experimenten van György en medewerkers (1962) herhaald met fracties van moedermelk. Als controles bij deze en andere experimenten werden steeds drie groepen proefdieren, elk van 10 muizen, voorbehandeld met respectievelijk a) moedermelk, b) staphylococcon en c) staphylococcon en moedermelk. Een experiment werd alleen dan als geslaagd beschouwd, indien minder dan 30% der proefdieren, die waren voorbehandeld met staphylococcon alleen of met moedermelk alleen en meer dan 70% der dieren, die waren voorbehandeld met staphylococcon en moedermelk, de lethale dosis staphylococcon overleefden. De lethale dosis staphylococcon werd steeds door middel van een virulentietest bepaald en was gelijk aan die dosis, die 24 uren na toediening de dood veroorzaakt had van tenminste 8 van 10 proefdieren. Slechts zeer weinig experimenten moesten worden herhaald, omdat niet aan de gestelde voorwaarde was voldaan. De gegevens van deze experimenten zijn dus verkregen na enige voorafgaande ijking. De uitkomsten van de proeven zijn weergegeven in tabel 1. De tabel laat zien dat 240 van 282 proefdieren een lethale dosis staphylococcon overleefden na voorbehandeling met staphylococcon en moedermelk. Na voorbehandeling met staphylococcon alleen of moedermelk alleen overleefden respectievelijk 52 van 223 en 40 van 266 proefdieren de lethale dosis.

Het bleek, dat het percentage der dieren, die een lethale dosis overleefden na voorbehandeling met staphylococcon en moedermelk, zeer significant hoger was dan het overlevingspercentage van proefdieren, die waren voorbehandeld met staphylococcon alleen ( $P < 10^{-6}$ ). Bovendien was het percentage van dieren, die een lethale dosis staphylococcon overleefden na voorbehandeling met staphylococcon alleen significant hoger dan het overlevingspercentage van dieren, die waren voorbehandeld met moedermelk alleen ( $P = 0,02$ ). Voor de berekeningen is de  $\chi^2$ -toets voor een  $2 \times 2$  tabel toegepast.

Men mag dus concluderen, dat muizen, die waren voorbehandeld met staphylococcon (7 doses, ieder van  $1/100$  LD<sub>100</sub>) en moedermelk, in tegenstelling tot muizen die met moedermelk alleen of staphylococcon

T a b e l 1

Invloed van toediening van moedermelk op het immuniserende vermogen van sublethale doses levende staphylococcen bij muizen

Groep	Voorbehandeling	$n_1$	$n_{14-n_1}$	$n_{14}$	$n_{15}$	$n_{15}/n_{14} \cdot 100$
A	Moedermelk	270	4	266	40	17
B	Staphylococcen	225	2	223	52	23
C	Moedermelk en Staphylococcen	307	25	282	240	85

$n_1$  aantal proefdieren bij de aanvang van de voorbehandeling

$n_{14-n_1}$  aantal proefdieren, dat gestorven is tijdens de voorbehandeling

$n_{14}$  aantal proefdieren, dat een lethale dosis staphylococcen ontving, 14 dagen na de aanvang van de voorbehandeling

$n_{15}$  aantal proefdieren, dat een lethale dosis staphylococcen overleefde

Overschrijdingskansen bij vergelijking van telkens twee groepen wat betreft de aantallen proefdieren in de onderscheiden kolommen

Groepen	Kolommen	P
C en B	$n_{15}$ met $n_{14}$	$< 10^{-6}$
B en A	$n_{15}$ met $n_{14}$	0,02
C en B	$n_{14-n_1}$ met $n_1$	$2 \cdot 10^{-4}$
C en A	$n_{14-n_1}$ met $n_1$	$3 \cdot 10^{-4}$
B en A	$n_{14-n_1}$ met $n_1$	0,70 *)

\*) De verdeling van de toetsingsgrootte werd in dit geval benaderd met behulp van de binominale verdeling.

Voor de berekeningen werd gebruik gemaakt van de  $\chi^2$ -toets (2 x 2 tabel).

alleen waren voorbehandeld, beschermd waren tegen een lethale dosis levende staphylococcen van de homologe stam.

## 2.2 Reacties van muizen in de voorbehandelingsperiode

In tabel 1 is weergegeven, dat 25 van de 307 proefdieren, die werden voorbehandeld met staphylococcen en moedermelk, stierven in de voorbehandelingsperiode. In dezelfde periode stierven 4 van de 270 en 2 van de 225 proefdieren, die werden voorbehandeld met respectievelijk moedermelk alleen en staphylococcen alleen. Het percentage der proefdieren, die werden voorbehandeld met staphylococcen en moedermelk

en die stierven in de voorbehandelingsperiode, was zeer significant hoger dan het overeenkomstige percentage der dieren, die werden voorbehandeld met staphylococcen alleen ( $P = 2,10^{-4}$ ). Tussen de percentages van de dieren, die tijdens de voorbehandelingen met respectievelijk moedermelk alleen en met staphylococcen alleen stierven, was geen verschil aantoonbaar ( $P = 0,70$ ). Bij de berekening werd gebruik gemaakt van de  $\chi^2$ -toets voor een  $2 \times 2$  tabel.

De ontwikkeling van bescherming tegen staphylococcen door moedermelk en staphylococcen ging dus gepaard met verhoogde sterfte onder de proefdieren.

Naast sterftcijfers werden ook andere criteria toegepast ter vergelijking van de verschillende groepen muizen. Bij iedere muis werd op de 3e, 6e, 9e en 13e dag door punctie van de retro-orbitale plexus een druppel bloed afgenomen. Het bloed werd per groep muizen samengevoegd. Van ieder monster 'gepooled' bloed werd het aantal leucocyten per  $\text{mm}^3$  bepaald. Het gemiddelde aantal leucocyten per  $\text{mm}^3$  bloed was bij de proefdieren, die werden voorbehandeld met staphylococcen en moedermelk, op de genoemde dagen respectievelijk: 6800, 10600, 10900 en 15500. Het aantal leucocyten per  $\text{mm}^3$  bloed was op de 3e dag bij de muizen, die werden voorbehandeld met staphylococcen, significant hoger dan bij de dieren, die werden voorbehandeld met staphylococcen en moedermelk, respectievelijk 8100 en 6800 ( $P = 0,03$ ). Op de 6e en 9e dag was er geen verschil aantoonbaar. Op de 13e dag was het gemiddelde aantal leucocyten per  $\text{mm}^3$  bloed bij de dieren, die werden voorbehandeld met staphylococcen, significant lager dan bij de dieren, die werden voorbehandeld met staphylococcen en moedermelk, respectievelijk 8800 en 15500 ( $P = 0,03$ ). Overigens was er op geen der tijdstippen een verschil aantoonbaar tussen de aantallen leucocyten per  $\text{mm}^3$  bloed bij vergelijking van de drie groepen muizen, die op verschillende wijze waren voorbehandeld. Hiervoor werd de toets van Wilcoxon voor twee steekproeven toegepast.

Door de muizen bij de aanvang en bij het einde van de voorbehandelingsperiode te wegen, kon voor iedere groep de gemiddelde gewichtstoename per muis worden bepaald. Er was statistisch geen verschil aantoonbaar tussen de gewichtstoename van de dieren, die waren voorbehandeld met a) moedermelk (6,9 g), b) staphylococcen (6,5 g) en c) staphylococcen en moedermelk (5,6 g). Hiervoor werd gebruik gemaakt van de Student t-toets.

Bij visuele inspectie van de proefdieren tijdens de voorbehandelingsperiode werden in het gebied van de injectieplaatsen macroscopisch waarneembare afwijkingen gevonden. De afwijkingen ontstonden enige

dagen na de aanvang van de voorbehandeling en verdwenen langzamerhand na de 7e dag bij de proefdieren, die werden voorbehandeld met moedermelk of staphylococcen. Bij deze dieren waren op de dag, waarop de lethale dosis werd toegediend, geen afwijkingen meer waar te nemen. Bij de muizen, die werden voorbehandeld met staphylococcen en moedermelk, namen de afwijkingen na de 7e dag nog steeds toe en verdwenen niet voor het toedienen van de lethale dosis. In figuur 2 zijn drie muizen afgebeeld, die representatief zijn voor de proefdieren, die voorbehandeld werden met respectievelijk a) moedermelk, b) staphylococcen en c) staphylococcen en moedermelk. De foto werd genomen op de 5e dag van de voorbehandelingsperiode en laat zien, dat alle muizen een geringe afwijking vertoonden. In figuur 3 is een muis afgebeeld, die voorbehandeld werd met staphylococcen en moedermelk. De foto werd 2 dagen voor het toedienen van de lethale dosis genomen. Duidelijk blijkt bij vergelijking van figuur 2 en 3 een toename van de afwijking.

Uit deze gegevens blijkt dus, dat muizen, die met staphylococcen en moedermelk waren behandeld, haematologische veranderingen (leucocytose op de 13e dag) en langdurige afwijkingen op de injectieplaats vertoonden.

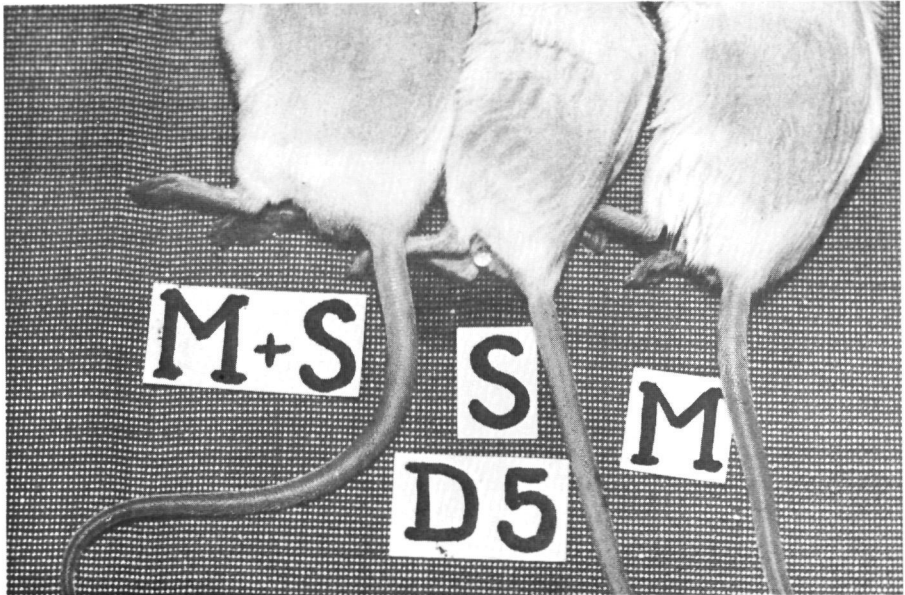
### 2.3 Duur van bescherming

In deze paragraaf worden resultaten vermeld van onderzoeken naar de duur van bescherming door staphylococcen en moedermelk.

Indien aan proefdieren, die waren voorbehandeld met staphylococcen en moedermelk en op de 14e dag na de aanvang van de voorbehandeling een lethale dosis hadden overleefd, een tweede lethale dosis werd toegediend, bleek, dat deze dieren dit wederom overleefden. In tabel 2 is weergegeven, dat op de 25e, 45e, 75e en 105e dag na de aanvang van de voorbehandeling respectievelijk 6 van 6, 27 van 28, 42 van 44 en 19 van 23 proefdieren, die reeds een lethale dosis op de 14e dag hadden overleefd, een tweede lethale dosis overleefden. Bij toepassing van de trendtoets van Van Eeden bleek, dat het percentage der dieren, die de lethale dosis overleefden, geen aantoonbaar verloop met de termijn vertoonde ( $P = 0,14$ ).

Het blijkt dus, dat proefdieren, die een lethale dosis staphylococcen op de 14e dag na de aanvang van de voorbehandeling met moedermelk en staphylococcen hadden overleefd, tenminste tot op de 105e dag na de aanvang van de voorbehandeling waren beschermd.

Indien aan proefdieren, die waren voorbehandeld met staphylococcen



Figuur 2

Huidafwijkingen van muizen

op de 5e dag na de aanvang van de voorbehandelingsperiode

De muizen werden respectievelijk voorbehandeld met staphylococcen en moedermelk (M + S), staphylococcen (S) en moedermelk (M).

T a b e l 2

Duur van bescherming na immunisatie van muizen met sublethale doses levende staphylococcen en moedermelk. De dieren ontvingen twee maal een lethale dosis staphylococcen, respectievelijk op de 14e dag na de aanvang van de voorbehandeling en op een later tijdstip.

Dag, waarop de 2e lethale dosis werd toegediend na aanvang van de voorbehandeling	Aantal dieren	Aantal dieren, dat een 2e lethale dosis staphylococcen overleefde
25	6	6
45	28	27
75	44	42
105	23	19

Met de trendtoets van Van Eeden kon geen verloop met de termijn worden aangetoond ( $P = 0,14$ ).



Figuur 3  
Huidafwijkingen van een muis  
op de 12e dag na de aanvang van de voorbehandeling  
met staphylococcen en moedermelk

en moedermelk, in plaats van op de 14e dag na de aanvang van de voorbehandeling, de lethale dosis op een later tijdstip werd toegediend, bleven verschillende dieren in leven. Tabel 3 laat zien, dat op de 15e, 30e, 40e, 50e en 70e dag na de aanvang van de voorbehandelingsperiode respectievelijk 19 van 20, 20 van 20, 12 van 20, 11 van 19 en 4 van 19 proefdieren een lethale dosis staphylococcen overleefden. Het aantal proefdieren, dat een eerste lethale dosis staphylococcen op de 70e dag na de aanvang van de voorbehandeling overleefde was significant kleiner ( $P \leq 0,0024$ ) dan de aantallen dieren, die op de 25e, 45e, 75e en 105e dag na de aanvang van de voorbehandeling een tweede lethale dosis overleefden (tabel 2).

Uit deze gegevens blijkt, dat dieren, die onmiddellijk na het beëindigen van de voorbehandelingsperiode geen lethale dosis hadden ontvangen, tot ongeveer de 30e dag in sterke mate waren beschermd. Daarna nam de immuniteit af en was duidelijk minder dan die van dieren, waaraan 2 maal een lethale dosis was toegediend.

T a b e l 3

Duur van bescherming na immunisatie van muizen met sublethale doses levende staphylococcen en moedermelk. De dieren ontvingen één maal een lethale dosis staphylococcen.

Dag na de aanvang van de voorbehandeling, waarop een lethale dosis werd toegediend	Aantal dieren	Aantal dieren, dat een lethale dosis overleefde
15	20	19
30	20	20
40	20	12
50	19	11
70	19	4

Met de trendtoets van Van Eeden werd een dalend verloop met de termijn aangetoond ( $P = 0,0003$ ).

#### 2.4 Passieve immunisatie

Om aan te tonen dat de door staphylococcen en moedermelk opgewekte immuniteit berustte op de vorming van antilichamen, hebben wij onderzocht of de immuniteit door middel van serum van voorbehandelde dieren kon worden overgedragen op niet-voorbehandelde dieren.

Enige proefdieren, die waren voorbehandeld met staphylococcen en moedermelk, ontvingen 14 dagen na de aanvang van de voorbehandeling geen lethale dosis, doch werden verbloed. Het bloed van verschillende muizen werd samengevoegd en het serum daarvan op de gebruikelijke wijze gesepareerd. Hiervan werd 0,2 ml intraveneus bij niet-voorbehandelde dieren ingespoten, waarna aan deze proefdieren 1 en/of 31 dagen later een lethale dosis staphylococcen werd toegediend. In tabel 4 is weergegeven, dat 21 van 21 proefdieren een lethale dosis, die 1 dag na het inspuiten van het serum werd toegediend, overleefden. Van deze 21 proefdieren overleefde slechts één een tweede lethale dosis 30 dagen daarna. Geen van 20 proefdieren overleefde een lethale dosis, die 31 dagen na het inspuiten van het serum werd toegediend. Na toepassing van de exacte toets (2 x 2 tabel) bleek, dat het percentage van de met serum ingespoten dieren, die een lethale dosis staphylococcen 1 dag

na het toedienen van serum overleefden, zeer significant hoger was dan het percentage der dieren, die niets of fysiologisch zout hadden ontvangen ( $P < 10^{-6}$ ). Tussen de proefdieren, die niet waren voorbehandeld en de proefdieren, waarbij fysiologisch zout was ingespoten, was geen verschil aantoonbaar. Evenmin was er enig verschil aantoonbaar tussen de beide met serum behandelde groepen, welke op de 31e dag na het toedienen van het serum een lethale dosis staphylococcen was toegediend ( $P = 1$ ).

T a b e l 4

Passieve immunisatie van muizen met behulp van antiserum van met sublethale doses levende staphylococcen en moedermelk geïmmuniseerde dieren

Groep	Voorbehandeling	Aantal dieren	$n_1$	$n_{31}$
A	fysiologisch zout	10	1	n.g.
B	antiserum	21	21	1
C	geen	21	2	n.g.
D	antiserum	20	n.g.	0

$n_0$  aantal proefdieren, dat werd voorbehandeld

$n_1$  aantal proefdieren, dat een lethale dosis 1 dag na toediening van antiserum overleefde

$n_{31}$  aantal proefdieren, dat een lethale dosis 31 dagen na toediening van antiserum overleefde

n.g. niet getest

Overschrijdingskansen bij vergelijking van telkens twee groepen wat betreft de aantallen proefdieren in de onderscheiden kolommen

Groepen	Kolommen	P
B en A	$n_1$ met $n_0$	$<10^{-6}$
B en C	$n_1$ met $n_0$	$<10^{-6}$

Voor de berekeningen werd gebruik gemaakt van de exacte toets (2 x 2 tabel).

Deze proeven toonden aan, dat de door voorbehandeling met staphylococcen en moedermelk opgewekte immuniteit met behulp van serum van voorbehandelde dieren was over te dragen op niet-voorbehandelde dieren.



## 2.5 Invloed van verschillende doses staphylococcen

Uit de literatuur is het bekend, dat toediening van alleen staphylococcen aan proefdieren immuniteit kan opwekken. Het leek ons van belang na te gaan of er - en in welke mate - verband bestond tussen ontwikkeling van immuniteit en de dosis staphylococcen, die werd toegediend. Wij hebben daarom proefdieren gevaccineerd met verschillende doses staphylococcen al of niet met gelijktijdig toedienen van moedermelk. De verschillende concentraties werden bereid door een suspensie staphylococcen, die overeenkwam met 1 LD<sub>100</sub>, 10, 100 of 1000 maal te verdunnen.

Na voorbehandeling met 1/1000, 1/100 en 1/10 LD<sub>100</sub> overleefden respectievelijk 4 van 20, 6 van 20 en 13 van 18 proefdieren een lethale dosis. De gegevens zijn samengevat in tabel 5.

De relatieve overlevingsfrequentie van de lethale dosis na voorbehandeling met 1/10 LD<sub>100</sub> was significant hoger dan die na voorbehandeling met 1/100 LD<sub>100</sub> ( $P = 0,02$ ), doch er was geen verschil aantoonbaar tussen de overlevingsfrequenties na voorbehandeling met 1/100 en 1/1000 LD<sub>100</sub>. Na voorbehandeling met dezelfde concentraties staphylococcen, maar gecombineerd met moedermelk, overleefden respectievelijk 10 van 20, 15 van 18 en 11 van 11 proefdieren een lethale dosis.

De relatieve overlevingsfrequentie van de lethale dosis na voorbehandeling met 1/100 LD<sub>100</sub> en moedermelk was significant hoger dan die na voorbehandeling met 1/1000 LD<sub>100</sub> en moedermelk ( $P = 0,04$ ). Tussen de voorbehandelingen met 1/100 en 1/10 LD<sub>100</sub> was in dit opzicht geen verschil aantoonbaar. Het percentage proefdieren, dat de lethale dosis overleefde, was na voorbehandeling met 1/100 LD<sub>100</sub> en moedermelk significant hoger dan na voorbehandeling met dezelfde dosis staphylococcen zonder moedermelk ( $P = 10^{-3}$ ). Bij de andere gebruikte doses staphylococcen was het effect van de toevoeging van moedermelk op de overlevingsfrequentie wel aanwezig, doch statistisch niet significant. Bovendien zijn in tabel 5 de aantallen proefdieren weergegeven, die zijn gestorven tijdens de voorbehandelingsperiode. Tijdens de voorbehandeling met 1/1000, 1/100, 1/10 en 1 LD<sub>100</sub> staphylococcen zonder moedermelk stierven respectievelijk 0, 0, 2 en 20 proefdieren. Tijdens de voorbehandeling met dezelfde concentraties staphylococcen, maar gecombineerd met moedermelk, stierven respectievelijk 0, 2, 9 en 20 proefdieren. In tabel 1 is weergegeven, dat bij voorbehandeling met 1/100 LD<sub>100</sub> staphylococcen 2 van 225 en bij voorbehandeling met dezelfde concentratie staphylococcen en moeder-

melk 25 van 307 proefdieren stierven in de voorbehandelingsperiode. De uitkomsten van de in deze paragraaf vermelde proeven komen hiermee overeen.

T a b e l 5

Invloed van toediening van moedermelk op het immuniserende vermogen van verschillende doses levende staphylococcen bij muizen

Groep	Voorbehandeling	n <sub>1</sub>	n <sub>14</sub> -n <sub>1</sub>	n <sub>14</sub>	n <sub>15</sub>	n <sub>15</sub> /n <sub>14</sub> ·100
A 1	1/1000 LD <sub>100</sub>	20	0	20	4	20
A 2	moedermelk en 1/1000 LD <sub>100</sub>	20	0	20	10	50
B 1	1/100 LD <sub>100</sub>	20	0	20	6	30
B 2	moedermelk en 1/100 LD <sub>100</sub>	20	2	18	15	80
C 1	1/10 LD <sub>100</sub>	20	2	18	13	72
C 2	moedermelk en 1/10 LD <sub>100</sub>	20	9	11	11	100
D 1	1 LD <sub>100</sub>	20	20	0	n.g.	
D 2	moedermelk en 1 LD <sub>100</sub>	20	20	0	n.g.	

n.g. niet getest

Voor verklaring van overige symbolen, zie tabel 1.

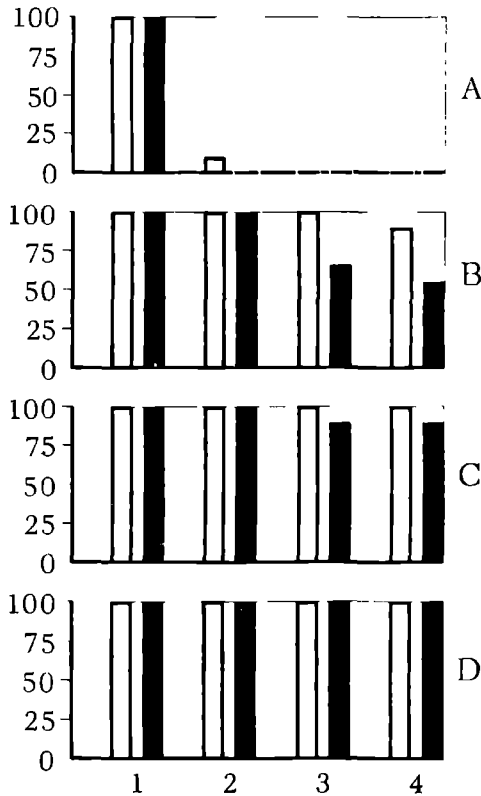
Overschrijdingskansen bij vergelijking van telkens twee groepen wat betreft de aantallen proefdieren in de onderscheiden kolommen

Groepen	Kolommen	P
B 1 en B 2	n <sub>15</sub> met n <sub>14</sub>	10 <sup>-3</sup>
C 1 en B 1	n <sub>15</sub> met n <sub>14</sub>	0,02
B 2 en A 2	n <sub>15</sub> met n <sub>14</sub>	0,04
C 2 en C 1	n <sub>14</sub> -n <sub>1</sub> met n <sub>1</sub>	0,03
C 1 en D 1	n <sub>14</sub> -n <sub>1</sub> met n <sub>1</sub>	<10 <sup>-6</sup>
B 2 en C 2	n <sub>14</sub> -n <sub>1</sub> met n <sub>1</sub>	0,03
C 2 en D 2	n <sub>14</sub> -n <sub>1</sub> met n <sub>1</sub>	10 <sup>-4</sup>

Voor de berekeningen werd gebruik gemaakt van de exacte toets (2 x 2 tabel).

De sterfte tijdens de voorbehandelingsperiode van dieren, die werden voorbehandeld met 1/10 LD<sub>100</sub> staphylococcen en moedermelk, was significant hoger dan die van dieren, die uitsluitend met 1/10 LD<sub>100</sub>

staphylococceen werden voorbehandeld ( $P=0,03$ ). Bij hogere en lagere concentraties staphylococceen kon geen invloed van het al of niet toevoegen van moedermelk worden aangetoond. Het percentage der dieren, die tijdens de voorbehandeling stierven, steeg met de concentratie staphylococceen, zowel zonder als met toediening van moedermelk.



Figuur 4  
 Percentages der proefdieren,  
 die werden voorbehandeld met verschillende doses staphylococceen,  
 al of niet gecombineerd met moedermelk

Van links naar rechts zijn de percentages van de dieren aangegeven, die in leven waren op achtereenvolgens de 1e, 2e, 3e en 4e dag van de voorbehandeling.

Van boven naar beneden zijn deze percentages aangegeven voor verschillende doses staphylococceen, respectievelijk A: 1, B: 1/10, C: 1/100 en D: 1/1000 LD<sub>100</sub>.

□ staphylococceen    ■ staphylococceen en moedermelk

De stijging was significant bij de overgang van 1/10 op 1 LD<sub>100</sub>, bij voorbehandeling met staphylococceen zonder moedermelk ( $P < 10^{-6}$ ).

De stijging was eveneens significant bij de overgang van 1/100 op 1/10 LD<sub>100</sub> ( $P = 0,03$ ) en de overgang van 1/10 op 1 LD<sub>100</sub> ( $P = 10^{-4}$ ) bij voorbehandeling met staphylococcen en moedermelk. Voor de berekeningen werd de exacte toets voor 2 x 2 tabellen toegepast.

In figuur 4 zijn de percentages proefdieren aangegeven, die in leven waren op respectievelijk de 1e, 2e, 3e en 4e dag van de voorbehandelingsperiode. Van de 53 dieren, die de voorbehandeling niet overleefden, stierf 72% op de 1e dag, 20% op de 2e dag en 8% op de 3e dag na de aanvang ervan.

De proeven toonden aan, dat vaccinatie met alleen staphylococcen immuniteit opwekte. De graad van immuniteit nam toe met de grootte van de dosis toegediende staphylococcen. Hetzelfde gold voor vaccinatie met staphylococcen en moedermelk. Toevoeging van moedermelk aan staphylococcen resulteerde in een sterkere immuniteit. Een aantal dieren stierf tijdens de voorbehandelingsperiode. De sterfte tijdens de voorbehandelingsperiode hield verband met de grootte van de dosis toegediende staphylococcen.

## 2.6 Invloed van plaats en tijdstip van injectie van moedermelk

Wij hebben nagegaan, of het effect van moedermelk ook optrad, indien staphylococcen en moedermelk in plaats van tesamen, apart werden ingespoten en wel a) langs verschillende wegen en b) langs eenzelfde weg doch op verschillende tijdstippen.

In tabel 6 is weergegeven, dat, indien staphylococcen en moedermelk tesamen subcutaan werden ingespoten, er 9 van 10 proefdieren een lethale dosis overleefden. Werd tijdens de voorbehandeling moedermelk subcutaan en staphylococcen intraperitoneaal ingespoten of omgekeerd, dan overleefden respectievelijk 8 van 10 en 7 van 10 proefdieren de lethale dosis. Statistisch kon tussen bovengenoemde aantallen geen verschillen worden aangetoond. Hieruit blijkt dus, dat het effect van moedermelk ook optrad, indien staphylococcen en moedermelk langs verschillende wegen werden ingespoten.

In tabel 7 is weergegeven, dat, indien 10 proefdieren tijdens de voorbehandeling slechts één injectie staphylococcen in een concentratie van 1/100 LD<sub>100</sub> ontvingen, geen ervan een lethale dosis overleefde. Indien tegelijk met de toediening van staphylococcen of op verschillende tijdstippen erna, moedermelk werd gegeven, en wel 7 doses op 7 achtereenvolgende dagen, overleefden meer dan 70% der proefdieren de lethale dosis, als de eerste injectie van moedermelk was gegeven op de 5e dag of eerder. Indien de eerste injectie van moedermelk op de 6e of

T a b e l 6

Invloed van moedermelk  
op de ontwikkeling van immuniteit tegen staphylococcen bij muizen,  
indien stahylococcen en moedermelk op verschillende plaatsen  
werden ingespoten

Groep	Voorbehandeling	Route	n <sub>1</sub>	n <sub>14</sub>	n <sub>15</sub>
A	moedermelk 1/100 LD <sub>100</sub>	sc ip	10	10	8
B	moedermelk 1/100 LD <sub>100</sub>	ip sc	10	10	7
C	moedermelk	sc	10	10	0
D	1/100 LD <sub>100</sub>	sc	10	10	2
E	moedermelk 1/100 LD <sub>100</sub>	sc sc	10	10	9

sc subcutaan

ip intraperitoneaal

Voor verklaring van overige symbolen, zie tabel 1.

Overschrijdingskansen bij vergelijking van sterftcijfers van verschillende groepen  
wat betreft de aantallen proefdieren in onderscheiden kolommen

Groepen	Kolommen	P	Toets
A en B	n <sub>15</sub> met n <sub>14</sub>	0,023	exacte toets (2 x 2 tabel)
A, B en E	n <sub>15</sub> met n <sub>14</sub>	0,54	χ <sup>2</sup> -toets (3 x 2 tabel)

7e dag werd toegediend, overleefde minder dan 30% der dieren de lethale dosis. Het verschil in de aantallen proefdieren, die onder deze voorwaarden een lethale dosis overleefden, was statistisch significant ( $P \leq 0,023$ ).

Uit deze proeven bleek dus, dat het effect van moedermelk op immuniteit tegen staphylococcen behouden bleef, indien moedermelk en staphylococcen afzonderlijk aan proefdieren werden toegediend, mits het interval tussen de toediening van beide inocula kleiner was dan 6 dagen.

T a b e l 7

Invloed van moedermelk op de ontwikkeling van immuniteit tegen staphylococcen bij muizen, indien staphylococcen en moedermelk op verschillende tijdstippen werden ingespoten

Groep	Voorbehandeling op de dagen													n <sub>1</sub>	n <sub>14</sub>	n <sub>15</sub>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			
A	MS	M	M	M	M	M	M							10	10	10
B	S	M	M	M	M	M	M	M						10	10	10
C	S		M	M	M	M	M	M	M					10	10	9
D	S			M	M	M	M	M	M	M				10	10	8
E	S				M	M	M	M	M	M	M			10	10	9
F	S					M	M	M	M	M	M	M		10	10	1
G	S						M	M	M	M	M	M	M	10	9	0
H	S													10	10	0
I	M	M	M	M	M	M	M							10	10	1
J	S	S	S	S	S	S	S							10	10	2
K	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS							10	10	10

S 1/100 LD<sub>100</sub>

M moedermelk

SM 1/100 LD<sub>100</sub> moedermelk

Voor verklaring van overige symbolen, zie tabel 1.

## 2.7 Invloed van verschillende fracties van moedermelk

Wij hebben muizen voorbehandeld met fracties van moedermelk en staphylococcen om te onderzoeken of een bepaalde stof(fen) uit moedermelk verantwoordelijk kon(den) worden gesteld voor de beschermende werking van moedermelk.

Na centrifugatie van moedermelk gedurende 60 minuten bij 2700 omwentelingen per minuut (ongeveer 7000 x g) konden room, een waterige laag en een neerslag worden gesepareerd. Indien de room vervolgens in de preparatieve ultracentrifuge werd gecentrifugeerd bij 100000 x g, konden een 'gele' laag, een 'witte' laag, een 'waterige' laag en een neerslag worden gesepareerd. Berekend naar drooggewicht vormde de room 18% en de 'witte' laag van de room 7% van de hele melk. In daarmede overeenkomstige concentraties werden de room en de 'witte' laag van de room getest evenals de andere fracties, waarvan de concentraties eveneens op basis van de verhouding van het drooggewicht werden gekozen.

T a b e l 8

Invloed van verschillende fracties van moedermelk op de ontwikkeling van immuniteit tegen staphylococcen bij muizen

Groep	Vorbchandeling	n <sub>1</sub>	n <sub>14</sub>	n <sub>15</sub>
A	Moedermelk	10	10	1
B	1/100 LD <sub>100</sub>	10	10	2
C	1/100 LD <sub>100</sub> en moedermelk	10	10	8
D	1/100 LD <sub>100</sub> en room van de melk	20	20	15
E	1/100 LD <sub>100</sub> en de ontroomde melk	20	20	2
F	1/100 LD <sub>100</sub> en de gele laag van de room	20	20	12
G	1/100 LD <sub>100</sub> en de witte laag van de room	20	20	20
H	1/100 LD <sub>100</sub> en de waterige laag van de room	20	20	3
I	1/100 LD <sub>100</sub> en het CM- oplosbare deel van de witte laag	20	20	15
J	1/100 LD <sub>100</sub> en het CM- onoplosbare deel van de witte laag	20	20	2

CM chloroform methanol

Voor verklaring van overige symbolen, zie tabel 1.

Overschrijdingskansen bij vergelijking van verschillende groepen wat betreft de aantallen proefdieren in de kolommen n<sub>15</sub> en n<sub>14</sub>

Groepen	P
A, B en C	0,002
F, G en H	< 10 <sup>-5</sup>
D en E	< 10 <sup>-4</sup>
F en G	0,0033
G en H	< 10 <sup>-6</sup>
F en H	0,004

Voor de berekeningen werd gebruik gemaakt van de  $\chi^2$ -toets (3 x 2 tabel) en de exacte toets (2 x 2 tabel).

De uitkomsten van proeven met de genoemde fracties zijn weergegeven in tabel 8. Er kon geen verschil worden aangetoond tussen de aantallen proefdieren, die een lethale dosis staphylococcen overleef-

denna vaccinatie met staphylococcon en moedermelk of met staphylococcon en room. Wel werd een significant verschil gevonden tussen de aantallen proefdieren, die een lethale dosis overleefden na voorbehandeling met staphylococcon en room of met staphylococcon en waterige laag ( $P < 10^{-4}$ ). Ook was er een verschil aantoonbaar na voorbehandeling met respectievelijk 'witte' laag en 'gele' laag van de room ( $P = 0,0033$ ), na voorbehandeling met respectievelijk 'witte' en 'waterige' laag ( $P = 10^{-6}$ ), en na voorbehandeling met respectievelijk 'gele' en 'waterige' laag van de room ( $P = 0,004$ ).

Indiende 'witte' laag werd opgenomen in chloroform-methanol (2 : 1, v/v), ging hierin 90% in oplossing. Indien dit materiaal wederom werd gedroogd en opgenomen in water en op analoge wijze in een dierenexperiment werd getest, werden hierdoor 15 van 20 proefdieren beschermd tegen een lethale dosis. Het in chloroform-methanol onoplosbare gedeelte van de 'witte' laag gaf geen bescherming. Het gedroogde deel van de witte laag werd opgenomen in petroleum-ether (40-60) en op een kiezelgelkolom gebracht. Deze was geëquilibreerd in petroleum-ether (40-60). Na elutie in stappen met oplopende volume-concentraties ether (1, 4, 8, 25 en 100%) werden 5 afzonderlijke fracties verkregen, die afzonderlijk en gerecombineerd in het dierenexperiment werden getest in concentraties, berekend aan de hand van drooggewichten. In geen van deze gevallen werd een 'bescherming' groter dan 30% gevonden. Omdat ook bij de uiteindelijke elutie van de kolom met 100%-ige methanol geen materiaal meer werd verkregen en in de vijf fracties (op basis van drooggewicht) vrijwel al het materiaal werd teruggevonden, is het zeer onwaarschijnlijk, dat de actieve component(en) niet zou(de)n zijn geëluëerd. Derhalve lijkt het waarschijnlijk, dat de verantwoordelijke factor(en) geïnactiveerd is (zijn) tijdens deze chromatografie.

De 'witte' laag werd met oplopende volume-concentraties alcohol in fracties neergeslagen. Ondanks het zo constant mogelijk houden van verschillende omstandigheden als temperatuur, duur, tijd van toevoegen van alcohol etc., werden geen reproduceerbare uitkomsten verkregen met dierenexperimenten. Bij herhaling bleken verschillende fracties enige bescherming te kunnen opwekken.

Verder werd de melk zonder voorafgaande bewerking na ontdoeien geëxtraheerd met althanol-ether volgens Bloor (1921), in de modificatie van Kaufmann en Garloff (1960) en met chloroform-methanol volgens Folch-Pi en medewerkers (1956) om de tijdrovende centrifugatie te kunnen vermijden. Voor deze extracties gold hetzelfde als reeds boven is gezegd in verband met de alcohol-fractionering. Nadat etha-



nol-ether bij 40°C aan melk was toegevoegd, werd het geheel na 24 uren gefiltreerd. 'Activiteit' werd in wisselende mate zowel in het neerslag als in het filtraat gevonden. Na extractie met chloroform-methanol werd weliswaar geen activiteit gevonden in de waterfase, doch wel in wisselende mate in de 'fluffy-layer' en/of de chloroformfase.

Tenslotte moge nog worden opgemerkt, dat moedermelk, die ons in gedroogde toestand bereikte, geen activiteit meer vertoonde. Deze melk had op de Moedermelkcentrale van het Nederlandse Rode Kruis de volgende bewerkingen ondergaan: na controle op bederf werd de melk van verschillende moeders samengevoegd, vervolgens gepasteuriseerd en daarna gedroogd. Hierna werd dit poeder tot de verzending gedurende langere of kortere tijd bij kamertemperatuur bewaard. Indien proefdieren met deze melk en 1/100 LD<sub>100</sub> staphylococcon werden ingespoten, kon geen immuniteit worden aangetoond. Op verzoek werd ons ook enige melk toegezonden onmiddellijk na het drogen. Deze melk had eenzelfde effect op de immuniteit tegen staphylococcon als de melk die uitsluitend was bevroren. Het verschil in effect kan worden verklaard, door aan te nemen, dat de verantwoordelijke factor(en) door auto-oxydatie was (waren) geïnactiveerd.

Uit deze proeven bleek, dat proefdieren door toediening van staphylococcon en bepaalde fracties van moedermelk geïmmuniseerd konden worden tegen staphylococcon. De voor het effect van moedermelk verantwoordelijke stof(fen) was (waren) waarschijnlijk aanwezig in een lipo-proteïne-actieve fractie van de moedermelk.

### § 3 Beschouwingen

Na voorbehandeling van muizen met staphylococcon (7 doses, ieder van 1/100 LD<sub>100</sub>) overleefde 23% der dieren een lethale dosis staphylococcon. Werden de proefdieren voorbehandeld met eenzelfde dosis staphylococcon gecombineerd met moedermelk, dan overleefde 85% der dieren. Na voorbehandeling met alleen moedermelk was het overlevingspercentage slechts 17%. De invloed van moedermelk op de ontwikkeling van immuniteit tegen staphylococcon kan op verschillende wijzen worden verklaard:

1. Moedermelk bevat endotoxines van gram negatieve bacteriën, die proefdieren op specifieke wijze beschermen tegen een lethale dosis staphylococcon. Springer en medewerkers (1961) hebben vastgesteld, dat niet-geïmmuniseerde muizen een lethale dosis staphy-

lococceen, die 16-48 uren na inspuiting van endotoxines werd toegediend, overleefden. Geen of slechts weinig proefdieren overleefden een lethale dosis staphylococceen, indien het endotoxine meer dan 72 of minder dan 5 uren voor de bacteriën werd toegediend. De hypothese, dat de beschermende werking van moedermelk op dit mechanisme berust, kan op grond van de volgende waarnemingen worden uitgesloten:

- a. Proefdieren overleefden een lethale dosis, die 24 of 48 uren na het inspuiten van moedermelk werd toegediend, niet (tabel 7).
  - b. Proefdieren overleefden wel een lethale dosis, als deze 3 of meer dagen na het inspuiten van moedermelk werd toegediend.
2. Moedermelk bevat een of meer stoffen, die staphylococceen doden, zoals beschreven door Wilson en Rosenblum (1952) met betrekking tot bepaalde stammen streptococceen. Op grond van de onder 1 genoemde waarnemingen kan worden uitgesloten, dat de beschermende werking van moedermelk op bactericide stoffen berust.
3. Moedermelk bevat antistoffen tegen staphylococceen, die proefdieren tegen een lethale dosis staphylococceen beschermen. Antilichamen kunnen in moedermelk aanwezig zijn, zoals onder andere door Michaels (1965) voor antilichamen tegen poliovirus is aangetoond. Dat antilichamen tegen staphylococceen een rol spelen bij de invloed van moedermelk op de ontwikkeling van immuniteit tegen staphylococceen, kan op grond van de volgende waarnemingen worden uitgesloten:
- a. Inspuiten van moedermelk alleen leidde niet tot bescherming tegen staphylococceen (tabel 1).
  - b. De room van moedermelk had dezelfde invloed op de ontwikkeling van immuniteit tegen staphylococceen als ongefractioneerde moedermelk. In het algemeen wordt aangenomen, dat antilichamen vooral aanwezig zijn in de waterige laag na het ontromen van melk (in melkwei).
  - c. Indien moedermelk meer dan 5 dagen na de staphylococceen werd toegediend, ontstond er geen bescherming tegen een lethale dosis staphylococceen (tabel 7).
4. Moedermelk fungeert als adjuvans bij de ontwikkeling van immuniteit. Het aangrijpingspunt ligt in dit geval bij de gastheer. Deze hypothese zal in hoofdstuk IV worden onderzocht.
5. Moedermelk bevordert de vermenigvuldiging van staphylococceen en/of de vorming van toxines door staphylococceen, ten gevolge waarvan de immuniserende werking groter wordt en de virulentie hoger.

Het aangrijpingspunt ligt in dit geval bij de bacteriën. Deze mogelijkheid wordt in de hoofdstukken V en VI onderzocht.

Ofschoon in dit proefschrift uitsluitend effecten van moedermelk zijn vermeld, staat niet vast, dat uitsluitend moedermelk dergelijke effecten kan sorteren. György en medewerkers (1962) vermeldden, dat koemelk weliswaar geen gelijkwaardig, maar wel enig effect had. Uit ongepubliceerde waarnemingen van Dr E.Schmidt en van schrijver dezes bleek, dat een identiek effect op het immuniserende vermogen van staphylococcen eveneens kon worden opgewekt met betrekkelijk eenvoudige chemische verbindingen.

### Samenvatting

Muizen, die waren voorbehandeld met staphylococcen (7 doses, ieder van  $1/400$  LD<sub>100</sub>) en moedermelk, waren, in tegenstelling tot muizen, die met moedermelk alleen of met staphylococcen alleen waren voorbehandeld, beschermd tegen een lethale dosis levende staphylococcen van de homologe stam. De ontwikkeling van de bescherming tegen staphylococcen door staphylococcen en moedermelk ging gepaard met verhoogde sterfte onder de proefdieren. Bovendien vertoonden de muizen, die met staphylococcen en moedermelk waren behandeld haematologische (leucocytose op de 13e dag) en langdurige afwijkingen op de injectieplaats. Proefdieren, die een lethale dosis staphylococcen op de 14e dag na de aanvang van de voorbehandeling met staphylococcen en moedermelk hadden overleefd, waren tenminste tot de 105e dag na de aanvang van de voorbehandeling beschermd. Ook dieren, die onmiddellijk na het beëindigen van de voorbehandelingsperiode geen lethale dosis hadden ontvangen, waren tot ongeveer de 30e dag in sterke mate beschermd. Daarna nam de immuniteit af en was duidelijk minder dan die van dieren, waaraan twee maal een lethale dosis was toegediend. De door voorbehandeling met staphylococcen en moedermelk opgewekte immuniteit was met behulp van serum van voorbehandelde dieren over te dragen op niet-voorbehandelde dieren. Vaccinatie met alleen staphylococcen wekte eveneens immuniteit op. De graad van immuniteit nam toe met de grootte van de dosis toegediende staphylococcen. Hetzelfde gold voor vaccinatie met staphylococcen en moedermelk. Toevoeging van moedermelk aan staphylococcen resulteerde in een sterkere immuniteit. Een aantal dieren stierf tijdens de voorbehandelingsperiode. De sterfte tijdens de voorbehandelingsperiode hield verband met de grootte van de dosis toegediende staphylococcen. Het ef-

fect van moedermelk trad ook op, indien staphylococcen en moedermelk in plaats van tesamen langs verschillende wegen werden ingespoten. Het effect van moedermelk op de immuniteit tegen staphylococcen bleef eveneens behouden, indien moedermelk (7 doses) en staphylococcen (een dosis van  $1/100$  LD<sub>100</sub>) afzonderlijk werden toegediend, mits het interval tussen het toedienen van beide inocula kleiner was dan 6 dagen. Proefdieren konden door staphylococcen en bepaalde fracties van moedermelk geïmmuniseerd worden tegen staphylococcen. De voor het effect van moedermelk verantwoordelijke stof(fen) was (waren) waarschijnlijk aanwezig in een lipoproteïne-achtige fractie van de moedermelk.



# HOOFDSTUK IV

## ONDERZOEK NAAR ADJUVANS WERKING VAN MOEDERMELK

### § 1 Inleiding

Het valt buiten het bestek van dit proefschrift om een overzicht te geven van stoffen, die de ontwikkeling van immuniteit kunnen bevorderen (adjuvans effect). Het staat vast, dat endotoxines van gram negatieve bacteriën als adjuvans kunnen werken (Munoz, 1964). Het effect treedt op, indien endotoxines 7 dagen vóór of 6 dagen ná het antigeen aan muizen worden toegediend (Merritt en Johnson, 1963). Op grond van de experimenten, die in het vorige hoofdstuk zijn vermeld (zie vooral tabel 7), is het niet uitgesloten, dat het effect van moedermelk identiek is aan dat van endotoxines. In dit hoofdstuk worden de uitkomsten van een vergelijkend onderzoek naar de werking van moedermelk en endotoxines vermeld. Bovendien werd onderzocht, of moedermelk de vorming van antistoffen tegen albumine zou kunnen stimuleren.

### § 2 Resultaten

#### 2.1 Vergelijking van effecten door endotoxines en moedermelk

Omdat endotoxines, die mogelijk in moedermelk aanwezig zijn, verantwoordelijk zouden kunnen zijn voor de invloed van moedermelk op de ontwikkeling van immuniteit tegen staphylococcen, hebben wij onderzocht, of moedermelk dezelfde effecten als endotoxines kon sorteren. Het effect van moedermelk en endotoxines op de lichaamstemperatuur en de bezinkingssnelheid van de erythrocyten werd bepaald. Konijnen werden subcutaan ingespoten met endotoxine (50  $\gamma$  per injectie) en/of moedermelk volgens het schema, dat in tabel 9 is aangegeven. Bij alle dieren werd enige tijd voor de injecties en 8 uren erna de lichaamstemperatuur gemeten. Bovendien werd op verschillende dagen een klein monster bloed afgenomen voor bepaling van de bezinkingssnelheid van de erythrocyten. In tabel 9 zijn de resultaten van de proeven weergegeven. Het kleine aantal dieren maakte een statistische analyse weliswaar niet onmogelijk, doch weinig zinvol.

T a b e l 9

Bezinkingssnelheid van de erythrocyten en lichaamstemperatuur van konijnen, die één of twee maal werden ingespoten met endotoxine en/of moedermelk

Ko- nijn	BS <sub>0</sub>	BS <sub>2</sub>	BS <sub>3</sub>	BS <sub>4</sub>	BS <sub>5</sub>	BS <sub>9</sub>	BS <sub>36</sub>	BS <sub>37</sub>	BS <sub>38</sub>	BS <sub>39</sub>	BS <sub>40</sub>	TH <sub>0</sub>	TH <sub>8</sub> '	TH <sub>8</sub> "
A1	3	4	5	7	5	7	3	4	5	7	5	38,8	38,6	38,9
A2	3	2	2	4	3	3	2	4	4	4	2	38,8	38,4	39,0
A3	2	1	3	2	2	2	3	3	5	3	3	39,0	38,6	39,1
B1	3	2	3	2	3	2	1	6	38	27	23	39,1	38,9	39,7
B2	4	3	4	4	3	2	1	8	15	16	12	38,5	38,3	39,3
B3	4	2	2	4	2	2	1	3	5	4	5	38,7	38,6	39,2
C1	1	3	4	5	4	2	1	8	11	12	23	38,7	39,4	39,4
C2	2	18	35	40	15	3	1	3	5	4	8	38,4	39,5	39,0
C3	2	12	24	28	37	3	2	6	5	11	18	38,6	39,4	39,3
D1							2	4	19	18	25			39,4
D2							2	9	32	40	51			39,3
D3							2	7	10	16	20			39,4

BS<sub>n</sub> bezinkingssnelheid op de aangegeven dag (n) na de injectie

TH<sub>0</sub> lichaamstemperatuur voor het inspuiten

TH<sub>8</sub>' lichaamstemperatuur 8 uren na de eerste injectie

TH<sub>8</sub>" lichaamstemperatuur 8 uren na de tweede injectie

De konijnen A1, A2 en A3 kregen geen injecties.

De konijnen B1, B2 en B3 ontvingen op dag 1 moedermelk en op dag 36 endotoxine.

De konijnen C1, C2 en C3 ontvingen op de dagen 1 en 36 endotoxine.

De konijnen D1, D2 en D3 ontvingen op dag 36 endotoxine.

Het bleek, dat na toediening van endotoxine de lichaamstemperatuur ende bezinkingssnelheid van de erythrocyten stegen. Vijf van de 6 konijnen reageerden op de eerste injectie endotoxine met een verhoogde bezinkingssnelheid (groepen C en D). Een verhoogde bezinkingssnelheid trad niet op na het inspuiten van moedermelk. Met een exacte toets is echter geen verschil aantoonbaar tussen 5 van 6 en 0 van 3 ( $P = 0,095$ ). De lichaamstemperatuur liep evenmin op na toediening van moedermelk.

De proeven toonden dus aan, dat in tegenstelling tot endotoxines toediening van moedermelk aan konijnen geen verhoging van de lichaamstemperatuur noch van de bezinkingssnelheid van de erythrocyten veroorzaakte.

## 2.2 Invloed van moedermelk op de antistoftiter tegen albumine

Om te onderzoeken of moedermelk de vorming van antistoffen tegen andere antigenen als staphylococceen zou kunnen stimuleren, hebben wij aan proefdieren runderserumalbumine toegediend, al of niet tesamen met moedermelk, en daarna de titer van antistoffen tegen albumine bepaald.

Bij ieder van 6 konijnen werd 40 mg albumine intraveneus ingespoten. Op dezelfde dag werd bij drie van deze proefdieren 1 ml moedermelk subcutaan ingespoten. Twee en 4 dagen later ontvingen deze dieren nog een injectie moedermelk (1 ml) langs dezelfde weg. Op verschillende tijdstippen werd bij alle konijnen de antistoftiter bepaald.

Vijf en twintig muizen ontvingen 1 x 4 mg albumine langs intraperitoneale weg. Vijf en twintig andere muizen ontvingen eveneens 1 x 4 mg albumine langs dezelfde weg en bovendien 4 x 0,3 ml moedermelk subcutaan. De injecties werden om de andere dag toegediend. Een derde groep van 25 muizen ontving een éénmalige injectie van 4 mg albumine in het incomplete adjuvans van Freund langs subcutane weg. Op verschillende tijdstippen werd bij iedere muis 1-2 druppels bloed afgenomen. Het bloed werd per groep samengevoegd en het serum gesepareerd.

De antistoftiters werden door middel van een passieve haemagglutinatiereactie volgens Boyden (1951), zoals beschreven in Campbell (1963), bepaald. Albumine werd geabsorbeerd aan de oppervlakte van met tannine behandelde schapeerythrocyten. Daarna werden deze erythrocyten toegevoegd aan een tweevoudige verdunningsserie van serum, dat tevoren 30 minuten bij 56°C was geïnactiveerd. Uiteindelijk werd een 0,15%-ige suspensie van erythrocyten verkregen. Ook buisjes voor het opsporen van spontane agglutinatie werden steeds ingezet. De titer was het omgekeerde van de hoogste verdunning van het serum, waarbij nog een granulaire agglutinatie was opgetreden, of waarbij een diffuse film van geagglutineerde cellen op de bodem van de buis aanwezig was. De titers werden in triplo bepaald. De gemiddelde antistoftiters zijn weergegeven in tabel 10.

Sera van konijnen, die waren ingespoten met albumine, vertoonden geen verschil in titer met sera van konijnen, die waren geïmmuniseerd met albumine en moedermelk. Een hoge antistoftiter werd gevonden bij muizen, die waren geïmmuniseerd met albumine en adjuvans. Daarentegen waren er geen antistoffen aantoonbaar in een verdunning van 1 : 4 in sera van muizen, die waren geïmmuniseerd met albumine of met albumine en moedermelk.



T a b e l 10

Invloed van moedermelk  
op de ontwikkeling van antistoffen tegen runderserum albumine

Tijdstip na eerste injectie van albumine (dagen)	Titer van agglutinerende antistoffen				
	A	B	C	D	E
15	16	32	-	-	64
20	270	220	-	-	2048
25	320	320	n.g.	n.g.	n.g.
30	380	350	-	-	9012

n.g. niet getest

- A gemiddelde antistoftiter van 3 konijnen, die waren geïmmuniseerd met albumine  
 B gemiddelde antistoftiter van 3 konijnen, die waren geïmmuniseerd met albumine en moedermelk  
 C gemiddelde antistoftiter van 25 muizen, die waren geïmmuniseerd met albumine  
 D gemiddelde antistoftiter van 25 muizen, die waren geïmmuniseerd met albumine en moedermelk  
 E gemiddelde antistoftiter van 25 muizen, die waren geïmmuniseerd met albumine en adjuvans

Uit deze proeven bleek, dat moedermelk geen invloed uitoefende op de ontwikkeling van antistoffen tegen albumine.

### § 3 Beschouwingen

De in het vorige hoofdstuk genoemde hypothese, dat moedermelk zou fungeren als adjuvans bij de ontwikkeling van immuniteit, kan op twee manieren nader worden omschreven:

- De invloed van moedermelk op de ontwikkeling van immuniteit tegen staphylococcen zou kunnen berusten op de aanwezigheid van endotoxines in moedermelk, waarvan bekend is, dat zij de vorming van antistoffen tegen verschillende antigenen kunnen stimuleren (Munoz, 1964).
- De werking berust niet op de aanwezigheid van endotoxines in moedermelk, maar op de aanwezigheid van andere stoffen, die een soortgelijk effect uitoefenen.

De onder a. genoemde hypothese is onwaarschijnlijk, omdat moedermelk in tegenstelling tot endotoxines geen effect uitoefende op de lichaamstemperatuur en de bezinkingssnelheid van erythrocyten van konijnen (tabel 9). Het is evenwel niet uitgesloten, dat in moedermelk zeer kleine hoeveelheden endotoxines aanwezig zijn, die in de door ons gebruikte proefopstelling niet aantoonbaar waren.

Houdayer en medewerkers (1964) hebben aangetoond, dat muizen alleen een aantoonbare hoeveelheid antilichamen tegen albumine vormen, indien de dieren worden ingespoten met albumine en een adjuvans. De onder b. genoemde hypothese is derhalve minder waarschijnlijk, omdat moedermelk geen stimulerende werking uitoefende op de ontwikkeling van antistoffen tegen albumine, noch bij konijnen, noch bij muizen.

### Samenvatting

Moedermelk veroorzaakte, in tegenstelling tot endotoxines, geen verhoging van de lichaamstemperatuur, noch van de bezinkingssnelheid der erythrocyten bij konijnen. Na toediening van albumine en moedermelk aan konijnen werd ongeveer een even hoge titer van antistoffen tegen albumine gevonden als na toediening van albumine alleen. Bij proeven op muizen kon evenmin een stimulerend effect van moedermelk op de ontwikkeling van antistoffen tegen albumine worden waargenomen.



## HOOFDSTUK V

### VORMING VAN TOXINE DOOR STAPHYLOCOCCEN

#### § 1 Inleiding

In hoofdstuk I is erop gewezen, dat de dood van proefdieren na besmetting met staphylococcen misschien veroorzaakt wordt door een of meer toxines. In hoofdstuk III is de veronderstelling geuit, dat de werking van moedermelk op de ontwikkeling van immuniteit tegen staphylococcen zou kunnen berusten op een invloed van moedermelk op deze bacteriën of op produkten ervan. Wij hebben daarom nagegaan, of staphylococcen een toxine vormen, dat lethaal is voor muizen, en of moedermelk invloed uitoefent op de vorming of werking van een dergelijke stof.

De uitkomsten van onderzoeken hierover worden in dit en het volgende hoofdstuk vermeld. Bovendien worden in deze hoofdstukken enkele eigenschappen van het gevonden toxine beschreven.

#### § 2 Resultaten

##### 2.1 Vorming van toxine in vitro

Onderzoek naar de vorming van toxine werd als volgt verricht. Verschillende muizen werden verbloed; het bloed werd onstolbaar gemaakt met heparine. Een hoeveelheid van 4 ml muizenbloed werd gedurende 2 uren in een schudbad bij 37°C geïncubeerd met 2 ml moedermelk in een concentratie van 120-130 mg/ml en 2 ml van een staphylococcensuspensie in een concentratie van 10 LD<sub>100</sub>. Na de incubatieperiode werd het gehele incubatiemengsel gecentrifugeerd bij 100 000 x g en de bovenstaande vloeistof afgepipetteerd. Het bleek, dat de bovenstaande vloeistof een stof (toxine) bevatte, die lethaal was voor muizen. De bovenstaande vloeistof van het incubatiemengsel (ongeveer 7 ml) werd aangevuld tot 8, 9, 10, 11 en 12 ml. Evenals bij de bepaling van 1 LD<sub>100</sub> van staphylococcen werden bij de bepaling van de sterkte van het toxine 3 verdunningen intraperitoneaal bij muizen ingespoten.

Het volume van het inoculum was 0,5 ml. Voor iedere verdunning werden 10 muizen gebruikt. Wij hebben aangenomen, dat de verdunning, die dood van 8 van 10 proefdieren veroorzaakte, 1 LD<sub>100</sub> per 0,5 ml bevatte. De registratie van het aantal dieren, dat een injectie van toxine overleefde, geschiedde na 24 uren. Voor de bereiding van 1 LD<sub>100</sub> moest de bovenstaande vlocistof in het algemeen worden aangevuld tot 10 ml.

T a b e l 11

Invloed van moedermelk en muizenbloed  
op de vorming in vitro van toxine door staphylococcen

Bestanddelen van medium tijdens incubatie in vitro			Aantal proefdieren	
Staphylococcen	Bloed	Moedermelk	Ingespoten	Gestorven
-	+	-	10	0
-	-	+	10	0
+	-	-	10	0
-	+	+	10	0
+	-	+	10	0
+	+	-	10	1
+	+	+	10	10

Tabel 11 laat zien, dat slechts 1 van 10 proefdieren stierf, indien in het incubatiemengsel moedermelk werd vervangen door een gelijk volume fysiologisch zout. Indien bloed en/of staphylococcen door fysiologisch zout werden vervangen, was geen toxiciteit aantoonbaar.

Omdat het verschil tussen de sterftcijfers: 0 van 10 en 1 van 10 ten opzichte van 10 van 10 (tabel 11) zo evident was, werd hierop niet getoetst. De exacte betrouwbaarheids grenzen van de sterftepercentages waren voor het toxine, dat was bereid met staphylococcen, bloed en moedermelk: 69,2-100% en voor het toxine, bereid zonder moedermelk: 0,3-44,5% (Geigy, 1960).

De proeven toonden aan, dat er tijdens de incubatie van staphylococcen met moedermelk en muizenbloed gedurende 2 uren bij 37°C een toxine werd gevormd, dat lethaal was voor muizen.

## 2.2 Invloed van incubatieduur en zuurgraad op toxinevorming

Toxineproductie is in het algemeen sterk afhankelijk van de duur van incubatie en van de omstandigheden van het milieu. Met het oog hierop hebben wij een onderzoek verricht naar de invloed van de incubatieduur van de pH van het medium op de vorming van toxine.

T a b e l 12

Invloed van incubatieduur  
op de vorming in vitro van toxine door staphylococcen

Groep	Duur van de incubatie (min.)	Aantal proefdieren	
		Ingespoten	Gestorven
A	0	10	0
B	15	10	1
C	30	10	1
D	60	10	5
E	120	10	10
F	180	10	9

Overschrijdingskansen bij vergelijking van telkens twee groepen  
wat betreft de aantallen proefdieren, die zijn gestorven

Groepen	P
D en E	0,03
C en D	0,14
D en F	0,14

Bij de berekeningen werd gebruik gemaakt van de exacte toets (2 x 2 tabel).

Uit tabel 12 blijkt, dat de toxinevorming met de duur van incubatie toenam. Met de exacte toets (2 x 2 tabel) werden alleen de kritieke verschillen tussen de sterftcijfers getoetst. Het verschil in de uitkomsten na incubatie gedurende respectievelijk 60 en 120 minuten mocht significant geacht worden ( $P = 0,03$ ). De verschillen in de sterftcijfers na incubatieperioden van 30 en 60 minuten en van 60 en 180 minuten waren niet significant ( $P = 0,14$  in beide gevallen). Op grond van de 95% betrouwbaarheidsgrenzen voor een steekproef van 10 proefdieren per tijdsinterval kon geconcludeerd worden, dat na een incubatieperiode

van 120 minuten zoveel toxine was gevormd, dat 69,2-100% der proefdieren stierven. Indien wordt aangenomen, dat alle proefdieren, die na een incubatieperiode van 120 minuten gestorven waren, ook gestorven zouden zijn na een incubatie gedurende 180 minuten, dan zouden na 180 minuten 19 van 20 proefdieren door het toxine zijn gestorven. De 95% betrouwbaarheidsgrenzen hiervan zijn: 75,1-99,9%.

T a b e l 13

Invloed van de zuurgraad  
op de vorming in vitro van toxine door staphylococcen

Groep	pH <sub>v</sub>	pH <sub>n</sub>	pH <sub>v</sub> -pH <sub>n</sub>	Aantal proefdieren	
				ingespotten	gestorven
A	4,1	4,8	-0,7	8	0
B	5,5	5,7	-0,2	10	3
C	6,1	6,1	0	10	4
D	6,6	6,3	0,3	10	4
E	7,1	6,7	0,4	10	6
F	7,5	6,9	0,6	10	8
G	8,0	7,2	0,8	10	10
H	8,5	7,4	1,1	10	4
I	10,0	8,1	1,9	10	1

pH<sub>v</sub> pH voor de aanvang van de incubatie

pH<sub>n</sub> pH na afloop van de incubatie

Overschrijdingskansen bij vergelijking van telkens twee groepen  
wat betreft de sterftepercentages

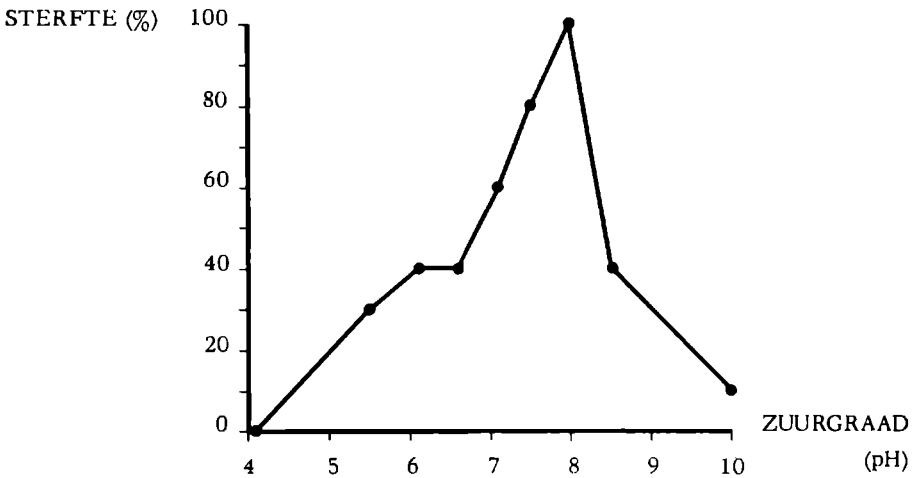
Groepen	P
E en G	0,09
G en H	0,01
D en G	0,01

Voor de berekeningen werd gebruik gemaakt van de exacte toets (2 x 2 tabel).

Uit tabel 13 blijkt, dat de sterfte van proefdieren afhankelijk is van de zuurgraad van het incubatiemedium. De exacte toets werd toegepast

op een aantal paren sterftecijfers, waarvan de gevonden overschrijdingskansen bij tabel 13 zijn vermeld. De verschillen tussen de sterftecijfers door toxines bereid bij pH 6,6 en 8,0 en bij pH 8,0 en 8,5 waren significant.

Na afloop van de incubatie was de pH van het medium, dat bij de aanvang ervan op 6,1 gebracht was, onveranderd. Werd bij de aanvang van de incubatie de zuurgraad op een hoger niveau gebracht, dan bleek na afloop de pH steeds gedaald te zijn en wel meer, naarmate de pH hoger werd ingesteld: 0,3 na instelling op 6,6 en 1,9 na instelling op 10,0. Het omgekeerde gebeurde, indiene pH lager dan op 6,1 werd ingesteld. De rangorde volgens zuurgraad bleef voor en na de incubatie dezelfde. Het verband tussen de lethaliteit van de toxines en de zuurgraad van de incubatiemedia is weérgegeven in figuur 5.



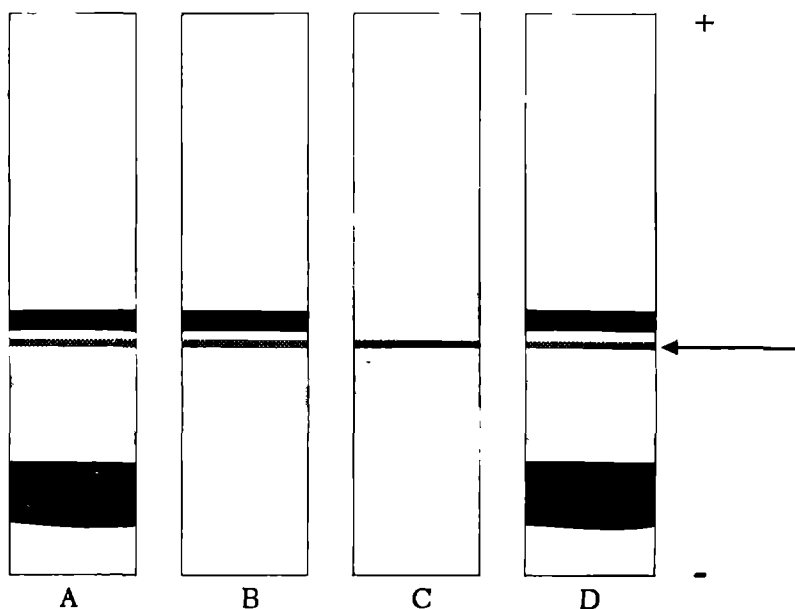
Figuur 5  
Verband tussen de hoeveelheid staphylococcentoxine gevormd gedurende incubatie in vitro en de zuurgraad van het incubatiemedium  
Staphylococcen werden geïncubeerd met muizenbloed en moedermelk.

Deze proeven toonden aan, dat de vorming van toxine bij incubatie van staphylococcen, muizenbloed en moedermelk afhankelijk is van de incubatieduur en de zuurgraad van het medium. De toxineproductie was hoger na incubatie gedurende 2 uren dan na incubatie gedurende 1 uur of korter. Het pH-optimum voor de toxineproductie lag tussen 6,6 en 8,5.



### 2.3 Invloed van haemoglobine op toxinevorming

Het bleek, dat, wanneer muizenbloed en moedermelk tesamen werden geïncubeerd, er lysis van de erythrocyten optrad. In deze gevallen moest na centrifugeren de bovenstaande vloeistof tenminste 200 x verdund worden, alvorens de extinctie bij 410 m $\mu$  bij een optische weglengte van 1,0 cm meetbaar werd. Indien geen moedermelk in het incubatiemedium aanwezig was, ontstond er geen lysis van erythrocyten en was de extinctie steeds < 1 bij deze golflengte. Een electropherogram van de verschillende preparaten is schematisch weergegeven in figuur 6.



Figuur 6

#### Papierelectrophorese van staphylococcentoxine

De volgende mengsels werden gedurende 2 uren bij 37°C geïncubeerd en daarna gecentrifugeerd bij 100.000 x g.

A moedermelk en muizenbloed

B staphylococcen en muizenbloed

C staphylococcen en moedermelk

D staphylococcen, muizenbloed en moedermelk

De bovenstaande vloeistof van ieder mengsel werd aan electrophorese onderworpen bij een constante spanning van 240 V in pyridine: ijsazijn: water (100:10:890), pH 6,5. Tijdsduur 180 minuten. Kleuring: amidozwart. De horizontale pijl geeft de opbrengplaats aan.

Wij hebben nagegaan, of muizenbloed kon worden vervangen door haemoglobine van muizenerythrocyten. Haemoglobine werd bereid door met fysiologisch zout gewassen erythrocyten te lyseren met een ever groot volume gedestilleerd water en een half volume tolueen. Na schudden werd de suspensie in een ijskast geplaatst en de volgende dag gecentrifugeerd bij 90 000 x g. De tolueenlaag en het geprecipiteerde materiaal op het grensvlak tussen tolueen en water werden verwijderd. Vervolgens werd de haemoglobine-oplossing verzadigd met koolmonoxide en gedialyseerd tegen gedestilleerd water gedurende 24 uren. Daarna werd de haemoglobine-oplossing gesteriliseerd door filtratie door een milliporefilter.

T a b e l 14

Invloed van moedermelk, muizenbloed, muizenplasma en muizenhaemoglobine op de vorming in vitro van toxine door staphylococcen

Groep	Bestanddelen van medium tijdens incubatie in vitro					Aantal dieren	
	Staph.	Bloed	Plasma	Haemoglobine	Moedermelk	ingespoten	gestorven
A	+	-	+	-	+	10	0
B	+	+	-	-	+	10	9
C	+	-	-	+	+	10	10
D	+	-	-	+	-	10	1
E	-	-	-	+	+	10	0
F	-	-	-	+	-	10	0

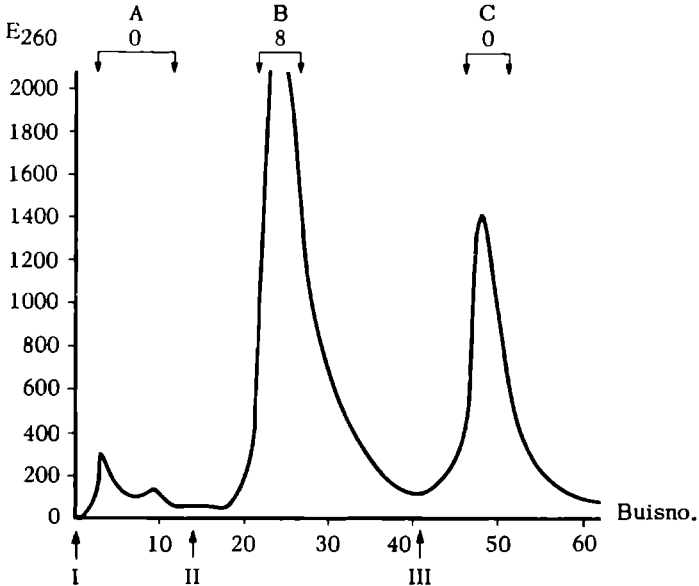
Overschrijdingskansen bij vergelijking van de sterftecijfers

Groepen	P
B en C	1
B en D	0,001

Bij de berekeningen werd gebruik gemaakt van de exacte toets (2 x 2 tabel).

Tabel 14 laat zien, dat muizenbloed niet vervangen kon worden door muizenplasma, maar wel door haemoglobine van muizenerythrocyten in een concentratie van 75-80 mg/ml. Overigens is deze tabel vergelijk-

baar met tabel 11. In plaats van fysiologisch zout werd een synthetisch samengesteld medium gebruikt, zoals dat beschreven is door Schultz en Solomon (1961). Bij toepassing van de exacte toets bleek, dat in plaats van bloed haemoglobine kon worden toegevoegd met hetzelfde effect ( $P = 1$ ).



Figuur 7  
Zuivering van haemoglobine door chromatografie  
over CM-sephadex C-50  
Kolomafmetingen 23x2 cm, fractievolume 10 ml

Het eiwit (haemoglobine van muizenerythrocyten, 200 mg) werd geëluëerd met I: 0,1 M NaCl in 0,05 M Na-fosfaatbuffer, pH 6,5; II: 0,2 M NaCl in dezelfde buffer; III: 0,3 M NaCl in dezelfde buffer.

— UV-absorptie bij 260  $m\mu$ . De getallen boven de haken ( $\overbrace{\hspace{1cm}}$ ) geven het aantal gestorven dieren aan na inspuiting van toxine, dat was bereid door staphylococci met de overeenkomstige fractie in plaats van met haemoglobine van muizenerythrocyten te incuberen. Ieder toxine-preparaat werd aan 10 dieren toegediend.

Verder hebben wij het haemoglobine gezuiverd volgens Wagner en Heinecke (1965). De auteurs maakten gebruik van CM-Sephadex en elueerden met oplopende concentraties NaCl. Het haemoglobine werd evenwel gedialyseerd tegen een Na-fosfaatbuffer (0,005 M) pH 6,5 en 0,1 M NaCl. De voorbehandeling van de Sephadex en het wassen van de gestapelde kolommen geschieden met dezelfde buffer. Een elutediagram en gegevens over de toxiciteit zijn weergegeven in figuur 7. Na de ei-

witbepaling door meting van de extinctie bij 260 m $\mu$  werden de fracties A, B en C verzameld, gedialyseerd en gevriesdroogd. De hoeveelheid eiwit in de fracties B en C wisselde, naar onze mening, met de ouderdom van het haemoglobine. Wij hebben hiervoor de juiste verklaring niet gezocht, omdat bleek, dat slechts de fractie B in staat was tot toxineproductie.

Deze proeven toonden aan, dat voor de bereiding van staphylococcen-toxine muizenbloed vervangen kon worden door haemoglobine van muizenerythrocyten. Het bleek, dat de werking ervan berustte op één fractie.

#### 2.4 Invloed van verschillende doses staphylococcon en moedermelk op toxinevorming

Indien staphylococcon uitsluitend met muizenbloed werden geïncubeerd, werd er toch toxine gevormd (zie tabel 11). Daarom hebben wij nader onderzocht, of moedermelk noodzakelijk was voor de vorming van toxine in vitro.

Staphylococcensuspensies in verschillende concentraties werden geïncubeerd met haemoglobine en daarna gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistoffen werden zonder moedermelk bij muizen ingespoten. Bij andere proefdieren werden dezelfde bovenstaande vloeistoffen en bovendien 0,3 ml moedermelk intraperitoneaal ingespoten. Verder werden suspensies staphylococcon in dezelfde concentraties geïncubeerd met haemoglobine en moedermelk en vervolgens gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistoffen werden eveneens bij muizen ingespoten. De bovenstaande vloeistoffen werden in alle proeven steeds aangevuld tot 10 ml, voordat zij bij de proefdieren werden ingespoten.

De sterfte van de muizen is weergegeven in tabel 15. De vorming van toxine nam in alle gevallen toe met de dosis staphylococcon. Statistisch kon geen verschil worden aangetoond tussen toxinevorming in een incubatiemedium zonder en in een medium met moedermelk, hoewel hiervoor wel een aanwijzing werd gevonden bij de dosis staphylococcon 10 LD<sub>100</sub> ( $P = 0,057$ ). Indien staphylococcon uitsluitend met haemoglobine werden geïncubeerd en de bovenstaande vloeistof hiervan tesamen met moedermelk werd ingespoten, was de sterfte van proefdieren voor iedere dosis staphylococcon het grootst (kolom 3). Het verschil tussen de aantallen gestorven dieren was bij vergelijking van kolom 3 met kolom 1 en kolom 2 voor de dosis 1 LD<sub>100</sub> significant ( $P = 0,003$ ).

Uit deze proeven kan men concluderen, dat er ook toxine werd ge-

vormd, indien geen moedermelk aan het incubatiemedium werd toegevoegd. Indien wel moedermelk aan het medium werd toegevoegd, werd er meer toxine gevormd. Tenslotte bleek het, dat het toxine een sterkere werking uitoefende, indien aan de proefdieren tevens moedermelk werd toegediend.

T a b e l 15

Sterfte van muizen na toedienen van staphylococcentoxines  
bereid met verschillende doses staphylococcen

Dosis staphylococcen	Kolom		
	1	2	3
1/100 LD <sub>100</sub>	0	0	1
1/10 LD <sub>100</sub>	2	0	4
1 LD <sub>100</sub>	3	3	10
10 LD <sub>100</sub>	9	4	9

kolom 1 aantallen proefdieren van groepen van 10 muizen, die zijn gestorven na toediening van toxine bereid met haemoglobine en moedermelk

kolom 2 idem toxine bereid met haemoglobine zonder moedermelk

kolom 3 idem toxine bereid met haemoglobine zonder moedermelk - wel toediening van melk aan proefdieren

Na toepassing van de trendtoets van Van Eeden kon op grond van de geringe overschrijdingskansen besloten worden tot een significante toename van het aantal dieren dat stierf met de toename van de doses staphylococcen in de 3 kolommen.

Overschrijdingskansen bij vergelijking van de sterftcijfers in steeds 2 kolommen per dosis staphylococcen

Dosis staphylococcen	Kolommen		
	1 en 2	1 en 3	2 en 3
1/100 LD <sub>100</sub>	-	-	1
1/10 LD <sub>100</sub>	0,47	0,63	0,09
1 LD <sub>100</sub>	-	0,003	0,003
10 LD <sub>100</sub>	0,057	-	0,057

Bij de berekeningen werd gebruik gemaakt van de exacte toets (2 x 2 tabel).

## 2.5 Enkele eigenschappen van het toxine

Om een indruk te krijgen over de moleculair grootte van het toxine

hebben wij het gedialyseerd. Verder hebben wij nagegaan, wat de invloed was van incubatie van het toxine bij verschillende temperaturen. Tenslotte hebben wij onderzocht of het toxine gefiltreerd kon worden door een millipore filter.

Voor deze proeven hebben wij toxine gebruikt, dat bereid was door staphylococcon met haemoglobine te incuberen; het toxine werd samen met moedermelk bij muizen ingespoten.

Acht ml toxine werd gedialyseerd tegen een 50-voudig volume fysiologisch zout gedurende 24 uren bij 4°C. Daarna werd de inhoud van de dialyschuls aangevuld tot 10 ml. Het niet dialyseerbare deel van het toxine veroorzaakte de dood van 9 van 10 onderzochte proefdieren. Het dialyseerbare deel bleek niet toxisch te zijn. Dit werd getest, nadat de buitenvlocistof, na dialyse tegen gedestilleerd water, was geconcentreerd tot 10 ml. Het toxine werd gedurende 10 minuten geïncubeerd bij 0°, 37°, 56° of 100°C. Na incubatie bij 0° of 37°C ging het toxine niet verloren. Na toediening van de bij 0° en 37°C geïncubeerde toxines stierven respectievelijk 10 van 10 en 9 van 10 proefdieren. Na incubatie bij 56° of 100°C was geen toxine meer aantoonbaar.

Het toxine werd gefiltreerd door een millipore filter en daarna bij proefdieren ingespoten. Geen van de proefdieren stierf na toediening van het gefiltreerde toxine. Het leek ons van belang na te gaan, of in het ongefiltreerde toxinepreparaat nog staphylococcon aanwezig waren en of eventueel deze staphylococcon verantwoordelijk zouden kunnen zijn voor de toxische werking. Met het oog hierop hebben wij staphylococcon geïncubeerd met en zonder haemoglobine en het aantal bacteriën geteld voor en na de incubatieperiode en na het centrifugeren.

In tabel 16 zijn de aantallen micro-organismen vermeld. In dezelfde tabel is ook weergegeven, dat de bovenstaande vloeistof van het medium, waarin staphylococcon en haemoglobine waren geïncubeerd, lethaal was voor 9 van 10 proefdieren, terwijl de bovenstaande vloeistof van het medium, waarin staphylococcon zonder haemoglobine waren geïncubeerd, geen sterfte veroorzaakte. De vloeistoffen bevatten respectievelijk  $2,8 \times 10^4$  en  $2,5 \times 10^4$  bacteriën per 0,5 ml (d.i. de dosis, die per muis werd ingespoten).

Uit deze proeven bleek, dat het toxine niet dialyseerbaar was. Het toxine werd geïnactiveerd tijdens incubatie gedurende 10 minuten bij 56° of 100°C. Incubatie bij 0° of 37°C had geen invloed op het toxine. Na filtratie door een millipore filter was geen toxine meer aantoonbaar.

T a b e l 16

Aantallen staphylococcen in onderscheiden stadia van toxinebereiding

Stadia	Aantal staphylococcen per ml (1)	Sterfte bij muizen	Aantal staphylococcen per ml (2)	Sterfte bij muizen
Voor incubatie	$2 \cdot 10^9$	n.g.	$1,4 \cdot 10^9$	n.g.
Na incubatie	$3,4 \cdot 10^9$	n.g.	$2,4 \cdot 10^9$	n.g.
Na centrifugeren	$5,5 \cdot 10^4$	9/10	$4,9 \cdot 10^4$	0/10
Na filtratie door millipore	n.g.	0/10	n.g.	0/10

Aant.staph.per ml (1): toxine bereid met haemoglobine

Aant.staph.per ml (2): 'toxine' bereid zonder haemoglobine

n.g. niet getest

## 2.6 Onderzoek naar de invloed van moedermelk en haemoglobine op de virulentie van staphylococcen

Naar aanleiding van de bevinding, dat er in toxinepreparaten na centrifugatie nog staphylococcen aanwezig zijn (zie vorige paragraaf), leek het ons van belang een onderzoek te doen naar de invloed van moedermelk en haemoglobine op de virulentie van staphylococcen.

Muizen werden intraperitoneaal ingespoten met staphylococcen alleen (groep A), met staphylococcen en moedermelk (groep B), met staphylococcen en haemoglobine (groep C) en met staphylococcen, moedermelk en haemoglobine (groep D). De proef werd uitgevoerd met verschillende concentraties staphylococcen. Per muis werden 36 mg moedermelk en 20 mg haemoglobine ingespoten. Het volume van ieder inoculum was 0,3 ml.

Tabel 17 geeft een overzicht van de sterftcijfers voor iedere categorie. Het bleek, dat de virulentie van de staphylococcen toenam door toevoeging van moedermelk en/of haemoglobine. Voor muizen, die waren ingespoten met  $1/10$  LD<sub>100</sub> staphylococcen was het verschil in sterfte tussen dieren van groep A en dieren van achtereenvolgens de groepen B, C en D significant. De overschrijdingskans bij vergelijking van 0 van 10 en 7 van 10 proefdieren met de exacte toets ( $2 \times 2$  tabel) is 0,003.

T a b e l 17

Invloed van toediening van moedermelk en haemoglobine aan muizen op de virulentie van staphylococcen

Dosis staphylococcen per muis	Aantal gestorven muizen			
	A	B	C	D
1 LD <sub>100</sub>	10	10	10	10
1/3 LD <sub>100</sub>	7	10	10	9
1/10 LD <sub>100</sub>	0	9	7	10
1/30 LD <sub>100</sub>	0	6	3	10
1/100 LD <sub>100</sub>	0	2	1	7
1/300 LD <sub>100</sub>	0	0	0	3

A muizen ingespoten met staphylococcen alleen

B muizen ingespoten met staphylococcen en moedermelk (36 mg/muis)

C muizen ingespoten met staphylococcen en haemoglobine (20 mg/muis)

D muizen ingespoten met staphylococcen, moedermelk (36 mg/muis) en haemoglobine (20 mg/muis)

Iedere groep bestond uit 10 muizen.

Bij vergelijking van de sterftecijfers met de trendtoets van Van Eeden werd bij alle groepen een toename van de virulentie met de dosis staphylococcen gevonden.

Overschrijdingskansen bij vergelijking van de sterftecijfers in horizontale richting

Dosis staphylococcen	Kolommen	P
1/10 LD <sub>100</sub>	A en C	0,003
1/30 LD <sub>100</sub>	A en B	0,005
1/100 LD <sub>100</sub>	A en D	0,003
1/100 LD <sub>100</sub>	B en D	0,06
1/100 LD <sub>100</sub>	C en D	0,02

Voor de berekeningen werd gebruik gemaakt van de exacte toets (2 x 2 tabel).

## 2.7 Invloed van bacteriën in het toxine

Uit de in paragraaf 2.5 beschreven proeven bleek, dat er in toxinepreparaten na centrifugatie nog staphylococcen aanwezig waren. Indien men aanneemt, dat deze staphylococcen geheel of gedeeltelijk verantwoordelijk zijn voor de toxische werking, dan zou men mogen verwacht-



ten, dat er onder dieren, die met penicilline zijn behandeld en daarna met toxine zijn ingespoten, geen of minder sterfgevallen voorkomen.

Staphylococcon werden met haemoglobine geïncubeerd. Het gevormde toxine werd samen met moedermelk ingespoten bij 10 muizen, waaraan ongeveer 15 minuten tevoren intraperitoneaal 1000000 E penicilline per dier was toegediend, en aan 10 proefdieren, waaraan geen penicilline was toegediend. Alle proefdieren van beide groepen stierven.

Uit deze proef mag worden geconcludeerd, dat vermenigvuldiging in vivo van staphylococcon, die in het toxinepreparaat aanwezig waren, zeer waarschijnlijk niet - althans niet op aantoonbare wijze - verantwoordelijk was voor de toxische werking.

### § 3 Beschouwingen

Na incubatie van staphylococcon met muizenbloed en moedermelk bij 37°C werd een stof \*) gevormd, die toxisch was voor muizen. Er werd een onderzoek verricht naar de invloed van enkele factoren op de vorming van deze stof (toxine).

Na filtratie door een millipore filter bleek in het filtraat geen toxische werking meer aantoonbaar te zijn. Gebhardt (1962) vond, dat coagulase door filtratie door een millipore filter werd geïnactiveerd. Aangezien het toxine tijdens filtratie werd geïnactiveerd, moest een ongefiltreerd toxinepreparaat worden gebruikt. Hierin waren nog levende staphylococcon aanwezig. Het is echter onwaarschijnlijk, dat deze bacteriën verantwoordelijk waren voor het toxische effect op grond van de volgende waarnemingen:

- a. Het toxine werd door een incubatie gedurende 10 minuten bij 56°C geïnactiveerd. Staphylococcon worden onder dergelijke omstandigheden niet gedood.
- b. Uitschakeling van de vermenigvuldiging van de bacteriën in vivo door penicilline ging niet samen met een aantoonbare vermindering van de toxische werking van het toxine.

De virulentie van staphylococcon kan worden verhoogd door de bacteriën in mucine in plaats van in fysiologisch zout te suspenderen (Schneerson en Amsterdam, 1956). Tevens wordt de virulentie verhoogd door inspuiting van cortisonacetaat, cholesterol, lecithine (Am-

---

\* Door het ontbreken van een chemisch zuiver preparaat kon niet worden uitgemakt of er sprake was van één of meer toxines. Eenvoudigheidshalve wordt slechts gesproken over één toxine.

sterdam en Schneierson, 1960) of malonaat (Cohn, 1963a), en door inspuiten met een corpus alienum (Elek, 1956). Wij hebben waargenomen, dat moedermelk een stimulerende werking uitoefende op de toxische werking van toxine. Verder hebben wij vastgesteld, dat toediening van moedermelk alleen of haemoglobine alleen en toediening van moedermelk en haemoglobine de virulentie van staphylococcon verhoogde. Dit zou kunnen berusten op een stimulerende werking van moedermelk en haemoglobine op de vorming van toxine in vivo, of op de toxische werking van toxine, of op beide. Moedermelk bleek bovendien invloed uit te oefenen op de produktie van toxine in vitro. Dit zou wellicht het gevolg kunnen zijn van het stimulerende effect van moedermelk op de toxische werking van toxine in vivo (tabel 15).

### Samenvatting

Tijdens de incubatie van staphylococcon met moedermelk en muizenbloed gedurende 2 uren bij 37°C werd een toxine gevormd, dat lethaal was voor muizen. De vorming van het toxine was afhankelijk van de incubatieduur en de zuurgraad van het medium. De toxineproduktie was hoger na incubatie gedurende 2 uren dan na incubatie gedurende 1 uur of korter. Het pH-optimum voor de toxineproduktie lag tussen 6,6 en 8,5. Voor de bereiding van staphylococcentoxine kon muizenbloed vervangen worden door het haemolysaat van muizenerythrocyten. Het bleek, dat de werking ervan berustte op één fractie ervan. Toxine werd ook gevormd, indien geen moedermelk aan het incubatiemedium werd toegevoegd. Indien wel moedermelk aan het medium werd toegevoegd, werd er meer toxine gevormd. Ook bleek moedermelk de toxische werking van het toxine te stimuleren. Het toxine was niet dialyseerbaar. Het werd geïnactiveerd tijdens incubatie gedurende 10 minuten bij 56° of 100°C. Incubatie bij 0° of 37°C had geen invloed op het toxine. Na filtratie door een millipore filter was geen toxine meer aantoonbaar. De virulentie van staphylococcon voor muizen nam toe, indien tevens moedermelk en/of haemoglobine werd(en) toegediend. Muizen, die met penicilline waren behandeld om vermenigvuldiging van in toxinepreparaten aanwezige staphylococcon te remmen, waren even gevoelig voor toxine als niet-behandelde muizen.



## HOOFDSTUK VI

### IMMUNOGENE EIGENSCHAPPEN VAN STAPHYLOCOCCENTOXINE

#### § 1 Inleiding

Wij hebben onderzocht, of het in vitro gevormde toxine in staat was immuniteit op te wekken tegen levende staphylococcen en omgekeerd. Bovendien hebben wij onderzocht, of het toxine identiek was aan  $\alpha$ -haemolysine, een extracellulair produkt van staphylococcen.

#### § 2 Resultaten

##### 2.1 Actieve immunisatie met toxine

Muizen werden op de gebruikelijke wijze geïmmuniseerd met staphylococcen en moedermelk. Het voor de immunisatie gebruikte toxine werd steeds vers bereid. Het toxine werd intraperitoneaal bij muizen ingespoten. Toxine werd 2 maal per week gedurende 3 weken toegediend. De concentratie van toxine nam per keer toe met een factor 2 en wel van 1/100 tot 32/100 LD<sub>100</sub>. De verdunningen werden gemaakt met fysiologisch zout. Eén week na de laatste injectie ontving een deel van de proefdieren een lethale dosis staphylococcen of toxine, terwijl de overige dieren werden verbloed.

In tabel 18 is weergegeven, dat 9 van 10 muizen, die waren geïmmuniseerd met staphylococcen en moedermelk, een lethale dosis staphylococcen overleefden. Vijftien van 15 proefdieren, die op dezelfde wijze waren geïmmuniseerd, overleefden een lethale dosis toxine. Indien proefdieren met toxine waren geïmmuniseerd, dan overleefden 19 van 20 proefdieren een lethale dosis staphylococcen en 17 van 20 een lethale dosis toxine. Van de 3 dieren, die de lethale dosis toxine niet overleefden, stierven er 2 door een overgevoeligheidsreactie.

Toetsing van de in de tabel vermelde gegevens met de exacte toets toonde aan, dat er geen verschil kon worden aangetoond tussen de aantallen proefdieren, die een lethale dosis staphylococcen of een lethale dosis toxine hadden overleefd na immunisatie met staphylococcen en moedermelk of met toxine. De minimale overschrijdingskans bij ver-

gelijking van deze aantallen zowel in horizontale als in verticale richting was 24%.

De proeven toonden aan, dat het toxine immuniteit opwekte tegen levende staphylococcen en omgekeerd.

T a b e l 18

Immuniserend vermogen van toxine van staphylococcen bij muizen

Groep	Voorbehandeling	$n_o$	$n_s$	$n_{so}$	$n_t$	$n_{to}$
1	1/100 LD <sub>100</sub> en moedermelk	25	10	9	15	15
2	toxine	40	20	19	20	17
3	geen	20	10	1	10	0

$n_o$  aantal proefdieren, dat werd voorbehandeld

$n_s$  aantal dieren, dat een lethale dosis staphylococcen ontving

$n_{so}$  aantal dieren, dat een lethale dosis staphylococcen overleefde

$n_t$  aantal dieren, dat een lethale dosis toxine ontving

$n_{to}$  aantal dieren, dat een lethale dosis toxine overleefde

Bij vergelijking van de sterftecijfers met de exacte toets (2 x 2 tabel) in de groepen 1 en 2, in horizontale en in verticale richting, werd een minimale overschrijdingskans van 24% gevonden.

## 2.2 Passieve immunisatie met toxine

Wij hebben onderzocht, of de immuniteit tegen toxine door middel van serum kon worden overgedragen op niet-geïmmuniseerde dieren.

In de vorige paragraaf is reeds vermeld, dat enige dieren, die waren geïmmuniseerd met toxine, werden verbloed. Ook enige muizen, die op de gebruikelijke wijze waren geïmmuniseerd met levende staphylococcen en moedermelk, werden 7 dagen na de laatste injectie verbloed. Van dit serum of van serum van muizen, die waren geïmmuniseerd met toxine, werd 0,2 ml bij niet-voorbehandelde dieren intraveneus ingespoten. Eén dag later ontvingen de muizen een lethale dosis levende staphylococcen of toxine. De gegevens over passieve immunisatie tegen staphylococcen met antiserum tegen staphylococcen zijn reeds vermeld in hoofdstuk III (tabel 4).

Tabel 19 laat zien, dat passieve immunisatie met antiserum tegen staphylococcen muizen beschermde tegen een lethale dosis levende staphylococcen en tegen een lethale dosis toxine. Evenzo beschermde

antiserum tegen toxine de proefdieren tegen staphylococcen en toxine; de bescherming tegen toxine was significant groter dan die tegen staphylococcen ( $P = 0,0005$ ). Niettemin was het aantal dieren, dat een lethale dosis overleefde, significant groter na toediening van antiserum tegen toxine dan na toediening van fysiologisch zout ( $P = 0,024$ ).

De proeven toonden aan, dat de immuniteit tegen toxine passief kon worden overgedragen.

T a b e l 19

Passieve immunisatie met toxine van staphylococcen bij muizen

Groep	Voorbehandeling	$n_0$	$n_s$	$n_{s0}$	$n_t$	$n_{t0}$
1	antiserum tegen staphylococcen	41	21	21	20	20
2	antiserum tegen toxine	40	20	11	20	17
3	fysiologisch zout	20	10	1	10	0
4	geen	41	21	2	20	0

$n_0$  aantal proefdieren, dat werd voorbehandeld

$n_s$  aantal proefdieren, dat een lethale dosis staphylococcen ontving

$n_{s0}$  aantal proefdieren, dat een lethale dosis staphylococcen overleefde

$n_t$  aantal proefdieren, dat een lethale dosis toxine ontving

$n_{t0}$  aantal proefdieren, dat een lethale dosis toxine overleefde

Overschrijdingskansen bij vergelijking van verschillende sterftcijfers

Groepen	Kolommen	P
1 en 2	$n_{s0}$	0,0005
1 en 2	$n_{t0}$	0,23
2	$n_{s0}$ met $n_{t0}$	0,08
2 en 3	$n_{s0}$	0,024

Bij de berekeningen werd gebruik gemaakt van de exacte toets (2 x 2 tabel).

### 2.3 Vergelijking van het toxine met $\alpha$ -haemolysine

Omdat  $\alpha$ -haemolysine lethaal is voor muizen en bovendien in anti-geen opzicht actief is, achtten wij het nuttig om te onderzoeken, of het in vitro gevormde toxine identiek was aan  $\alpha$ -haemolysine. Op de eerste plaats hebben wij de haemolytische eigenschappen van het toxine

onderzocht.

Aan een tweevoudige verdunningsserie van het toxine in fysiologisch zout in een volume van 0,5 ml werd 0,5 ml van een 2%-ige suspensie van erythrocyten toegevoegd. De hoogste concentratie van toxine kwam overeen met 1 LD<sub>100</sub>. De erythrocyten waren afkomstig van mensen, schapen, konijnen en muizen. De buisjes werden gedurende een uur bij kamertemperatuur geïncubeerd en daarna nog een uur bij 37°C. Vervolgens werden zij in de ijskast geplaatst en de volgende morgen definitief afgelezen. Op geheel analoge wijze werd  $\alpha$ -haemolysine van staphylococcon onderzocht. Uit tabel 20 blijkt, dat het toxine geen haemolyse veroorzaakte van de erythrocyten van de genoemde species. Het  $\alpha$ -haemolysine veroorzaakte daarentegen wel lysis van de erythrocyten van de verschillende diersoorten; de titer was niet dezelfde voor verschillende soorten erythrocyten.

T a b e l 20

Onderzoek op lytische werking van  $\alpha$ -haemolysine en toxine van staphylococcon met erythrocyten van verschillende species

Species	Verdunningen, die 100% lysis veroorzaakten	
	$\alpha$ -haemolysine	Toxine
Mens	1 : 2	geen lysis
Schaap	1 : 8	geen lysis
Konijn	1 : 32	geen lysis
Muis	1 : 4	geen lysis

Op de 2e plaats hebben wij onderzocht, of antiserum tegen staphylococcon en antiserum tegen toxine antilichamen bevatten tegen  $\alpha$ -haemolysine van staphylococcon. Hiervoor werden dezelfde sera gebruikt als voor de passieve immunisatie, zoals beschreven in paragraaf 2.2 van dit hoofdstuk. Met behulp van een tweevoudige verdunningsserie werd de laagste concentratie  $\alpha$ -haemolysine bepaald, die 100% lysis gaf van een 2%-ige suspensie van konijneërythrocyten. Een zodanige concentratie werd in een volume van 0,2 ml toegevoegd aan 0,3 ml van verdunningen van antiserum tegen staphylococcon en eveneens aan verdunningen van antiserum tegen toxine. Na incubatie gedurende 60 minuten in een schudbad bij 37°C werd aan alle buisjes 0,5 ml van een 2%-ige suspensie van konijneërythrocyten toegevoegd. Na een uur in-

cubatie bij 37°C werd de lysis afgelezen. Ook controlebuisjes voor het opsporen van spontane lysis werden in alle gevallen ingezet.

Uit tabel 21 blijkt, dat  $\alpha$ -haemolysine werd geneutraliseerd door 1/128 verdund antiserum tegen staphylococcen.  $\alpha$ -haemolysine werd niet geneutraliseerd door antiserum tegen toxine.

T a b e l 21

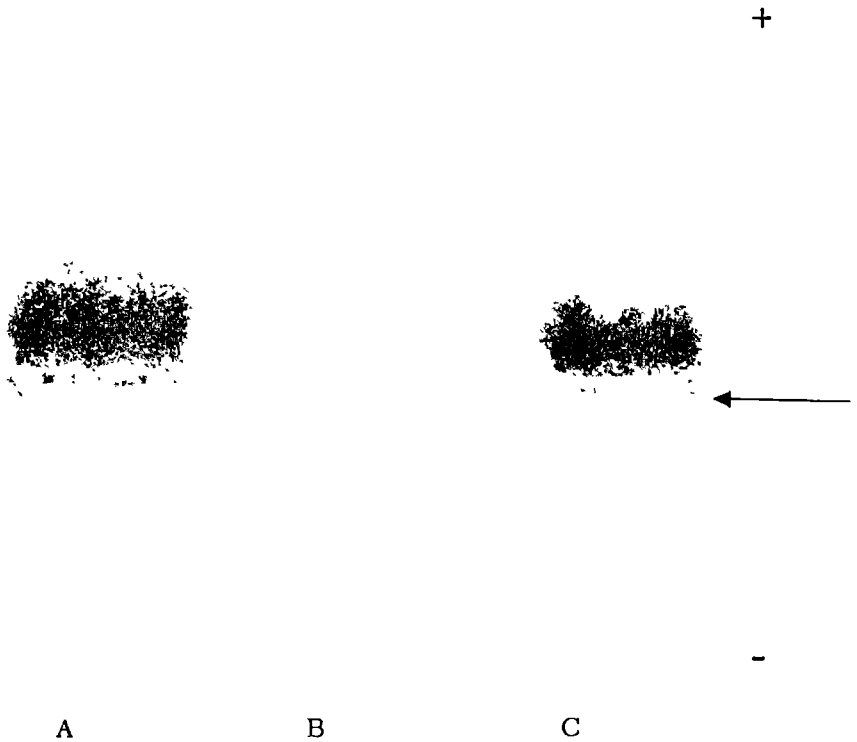
Lysis van konijneërythrocyten na incubatie met een mengsel van  $\alpha$ -haemolysine en antiserum tegen staphylococcen of antiserum tegen toxine

Serumverduunningen	Antiserum tegen staphylococcen	Antiserum tegen toxine
1/1	-	+
1/2	-	+
1/4	-	+
1/8	-	+
1/16	-	+
1/32	-	+
1/64	-	+
1/128	<u>+</u>	+
1/256	+	+
1/512	+	+

Verder hebben wij toxine en  $\alpha$ -haemolysine tesamen geëlectrophoreerd. Een electropherogram van  $\alpha$ -haemolysine en toxine is weergegeven in figuur 8. Er bleken geen gemeenschappelijke eiwitbandjes aantoonbaar te zijn. Tenslotte hebben wij onderzocht, of toxine evenals  $\alpha$ -haemolysine dermonecrose veroorzaakte. Het bleek, dat intracutaan toegediend toxine in een concentratie van 1/5 LD<sub>100</sub> geen dermonecrose bij konijnen veroorzaakte.

Uit deze proeven bleek, dat het in vitro gevormde toxine geen erythrocyten lyseerde. Antiserum tegen toxine neutraliseerde  $\alpha$ -haemolysine van staphylococcen niet. Het toxine had geen dermonecrotische eigenschappen. Tenslotte bleken geen overeenkomstige eiwitbandjes op het electropherogram aanwezig te zijn.





**Figuur 8**  
**Papierelectrophorese van  $\alpha$ -haemolysine**  
**A toxine (staphylococcen, muizenbloed en moedermelk)**  
**B  $\alpha$ -haemolysine**  
**C haemoglobine van muizenerythrocyten**

De electrophorese geschiedde bij constante spanning van 240 V in 0,05 M veronalbuffer, pH 8,6. Tijdsduur 180 minuten. Kleuring: amidozwart. De horizontale pijl geeft de opbrengplaats aan.

### § 3 Beschouwingen

In de literatuur wordt gewezen op verschillende mechanismen, die verantwoordelijk kunnen zijn voor de lethaliteit door staphylococcen. Zoals reeds in het eerste hoofdstuk is opgemerkt, kan in vitro geproduceerd  $\alpha$ -haemolysine de dood van muizen veroorzaken. Kapral (1965) heeft aangetoond, dat na toediening van een lethale dosis staphylococcen zoveel  $\alpha$ -haemolysine in het lichaam wordt gevormd, dat het verantwoordelijk zou kunnen zijn voor de dood van proefdieren. Daarom

achtten wij het nuttig het toxine, dat in de door ons beschreven proefopstelling was gevormd, van  $\alpha$ -haemolysine te onderscheiden op grond van:

#### a. Toxische eigenschappen

Aan  $\alpha$ -haemolysine worden 3 biologische activiteiten toegekend, namelijk haemolyse, dermonecrose en de potentie de dood van proefdieren te kunnen veroorzaken. Het is nog niet vastgesteld, dat deze 3 eigenschappen onderscheiden manifestaties zijn van één toxische entiteit. Voor deze veronderstelling zijn echter verschillende argumenten aan te voeren (zie Elek, 1959). Hier zij slechts vermeld, dat bij zuivering van het  $\alpha$ -haemolysine de 3 eigenschappen steeds in verschillende stadia in één fractie zijn te localiseren. Antiserum tegen  $\alpha$ -haemolysine is steeds in staat de 3 eigenschappen te neutraliseren (Bernheimer, 1965). Bovendien zijn alle 3 eigenschappen evcn gevoelig voor warmte (Manohar e.m., 1966). Het door ons beschreven toxine veroorzaakte in tegenstelling tot  $\alpha$ -haemolysine geen lysis van erythrocyten van verschillende diersoorten. Ook bleek  $\alpha$ -haemolysine niet gencutraliseerd te worden door antiserum tegen toxine. Verder veroorzaakte het toxine in tegenstelling tot  $\alpha$ -haemolysine geen dermonecrose bij konijnen. Niettemin is het denkbaar, dat het toxine toch gelijk was aan  $\alpha$ -haemolysine, doch dat de concentratie te laag was om lysis van schapeërthrocyten te geven. Bernheimer (1965) heeft met een voor ongeveer 70% zuiver  $\alpha$ -haemolysinepreparaat de dosis bepaald, die lethaal was voor 50% van de ingespoten muizen. Veel kleinere hoeveelheden waren reeds lytisch voor erythrocyten van schapen. Daarentegen veroorzaakte een dosis van 1 LD<sub>100</sub> van het door ons bereide toxine geen lysis van erythrocyten van schapen.

#### b. Immunologische eigenschappen

Koenig en medewerkers (1962 b) hebben vastgesteld, dat muizen na toediening van antiserum tegen  $\alpha$ -haemolysine niet beschermd waren tegen staphylococcen. In het eerste hoofdstuk is echter ook vermeld, dat andere onderzoekers meenden, dat antiserum tegen  $\alpha$ -haemolysine proefdieren wel kon beschermen tegen staphylococcen: Frappier en Sonea (1956) en North (1959). Deze auteurs merkten hierbij op, dat naast antilichamen tegen  $\alpha$ -haemolysine ook andere antilichamen in het gebruikte antiserum aanwezig waren. Fisher (1959) gebruikte een gedeeltelijk gezuiverd  $\alpha$ -haemolysinepreparaat voor de bereiding van antiserum. Het antiserum verleende bescherming tegen een lethale dosis staphylococcen. Hij kon echter niet uitsluiten, dat antilichamen tegen andere antigenen niet verantwoordelijk waren voor de bescher-

ming. Elek (1959) staat, mijns inziens terecht, zeer kritisch ten opzichte van de opvatting, dat actieve of passieve immunisatie met  $\alpha$ -haemolysine bescherming kan verlenen tegen staphylococcon. Hij meent, dat immunisatie met  $\alpha$ -haemolysine slechts resulteert in een verlengde overlevingstijd van de muis. Karpal (1965) kon na toediening van antiserum tegen  $\alpha$ -haemolysine slechts een verlengde overlevingstijd na toediening van een lethale dosis staphylococcon vaststellen.

Indien wij op grond van bovengenoemde gegevens aannemen, dat immunisatie met  $\alpha$ -haemolysine niet leidt tot een bescherming tegen staphylococcon, verschilt het door ons beschreven toxine in dit opzicht van  $\alpha$ -haemolysine. Immers immunisatie met het door ons beschreven toxine leidde wel tot bescherming tegen een lethale dosis staphylococcon.

### c. Bereidingswijze

Voor optimale vorming van  $\alpha$ -haemolysine in vitro worden in de literatuur verschillende methoden aangegeven (zie Elek, 1959; Bernheimer en Schwartz, 1963). Goede resultaten werden verkregen, indien de bacteriën gedurende 72 uren in een medium bij neutrale pH, waar  $\text{CO}_2$  door werd geleid, werden gekweekt.

Het door ons beschreven toxine was reeds gevormd na een korte incubatie (tabel 12) bij  $37^\circ\text{C}$  bij een hoge pH (tabel 13).

Op grond van bovengenoemde gegevens mag het hoogst onwaarschijnlijk geacht worden, dat het toxine identiek is aan  $\alpha$ -haemolysine. Geen der andere extracellulaire produkten is lethaal voor muizen. Een uitzondering hierop maakt misschien het coagulase, dat, in hoge dosis intraveneus ingespoten, zeer snel de dood van konijnen kan veroorzaken door massale intravasale stolsels (Tager en Drummond, 1948). Op grond van de bereidingswijze en de werking van het toxine mogen we aannemen, dat het waarschijnlijk evenmin identiek is aan één der andere extracellulaire produkten.

### Samenvatting

In vitro gevormd toxine was in staat bij muizen immuniteit op te wekken tegen levende staphylococcon en omgekeerd. De immuniteit tegen toxine kon passief worden overgedragen. Het in vitro gevormde toxine lyseerde geen erythrocyten. Antiserum tegen toxine neutraliseerde  $\alpha$ -haemolysine van staphylococcon niet. Het toxine had geen dermonecrotische eigenschappen. Op het electropherogram waren geen gemeenschappelijke eiwitbandjes van toxine en  $\alpha$ -haemolysine aanwezig.

## BESCHOUWINGEN EN SAMENVATTING

Muizen, die waren voorbehandeld met staphylococcen (7 doses, ieder van  $1/100 LD_{100}$ ) en moedermelk, waren beschermd tegen een lethale dosis levende staphylococcen van de homologe stam in tegenstelling tot muizen, die met moedermelk alleen of met staphylococcen alleen waren voorbehandeld. De ontwikkeling van de bescherming tegen staphylococcen door dit micro-organisme en moedermelk ging gepaard met verhoogde sterfte onder de proefdieren. Bovendien vertoonden de muizen, die met staphylococcen en moedermelk waren behandeld, haematologische (leucocythose op de 13e dag) en langdurige afwijkingen op de plaats van injectie. Proefdieren, die een lethale dosis staphylococcen op de 14e dag na de aanvang van de voorbehandeling met staphylococcen en moedermelk hadden overleefd, waren tenminste tot de 105e dag na de aanvang van de voorbehandeling beschermd. Ook dieren, die onmiddellijk na het beëindigen van de voorbehandelingsperiode geen lethale dosis hadden ontvangen, waren tot ongeveer de 30e dag in sterke mate beschermd. Daarna nam de immuniteit af en was duidelijk minder dan die van dieren, waaraan 2 maal een lethale dosis was toegediend. Deze waarnemingen bevestigden de bevindingen van György e.m. (1962) over het beschermende effect van moedermelk tegen infecties door staphylococcen.

Verder onderzoek leidde tot de volgende resultaten. De bescherming na voorbehandeling met staphylococcen en moedermelk was met behulp van serum van voorbehandelde dieren over te dragen op niet-voorbehandelde dieren. Vaccinatie met alleen staphylococcen wekte eveneens immuniteit op. De graad van immuniteit nam toe met de grootte van de dosis toegediende staphylococcen. Hetzelfde gold voor vaccinatie met staphylococcen en moedermelk. Toevoeging van moedermelk resulteerde in een sterkere immuniteit. Een aantal dieren stierf tijdens de voorbehandelingsperiode. De sterfte tijdens de voorbehandeling hield verband met de grootte van de dosis toegediende staphylococcen. Het effect van moedermelk trad ook op, indien staphylococcen en moedermelk in plaats van tesamen langs verschillende wegen werden ingespoten. Het effect van moedermelk op de immuniteit tegen staphylococcen

bleef eveneens behouden, indien moedermelk (7 doses) en staphylococ-  
cen (1 dosis van 1/100 LD<sub>100</sub>) afzonderlijk werden toegediend en het  
interval tussen het toedienen van beide inocula kleiner was dan 6 da-  
gen. Proefdieren konden door staphylococcen en bepaalde fracties van  
moedermelk eveneens beschermd worden tegen een lethale dosis sta-  
phylococcen. De voor het effect van moedermelk verantwoordelijke  
stof(fen) was (waren) waarschijnlijk aanwezig in een lipoproteïne-ach-  
tige fractie van de moedermelk.

Voor het effect van moedermelk op de ontwikkeling van immuniteit  
tegen staphylococcen kunnen verschillende verklaringen gegeven wor-  
den. Moedermelk zou endotoxines van gram negatieve bacteriën kun-  
nen bevatten, die proefdieren op specifieke wijze zouden beschermen  
tegen een lethale dosis staphylococcen. Deze hypothese kon worden  
uitgesloten, omdat proefdieren een lethale dosis, die 24 of 48 uren na  
het inspuiten van moedermelk werd toegediend, niet overleefden, maar  
wel een lethale dosis, als deze 3 of meer dagen na de moedermelk werd  
toegediend. Op dezelfde gronden kon worden uitgesloten, dat de be-  
schermdende werking van moedermelk berustte op erin aanwezige bac-  
tericide stoffen.

Moedermelk zou antilichamen kunnen bevatten, die tegen staphylo-  
coccen gericht zijn en die proefdieren tegen een lethale dosis staphylo-  
coccen zouden beschermen. Deze hypothese kon worden uitgesloten,  
omdat het inspuiten van moedermelk alleen niet resulteerde in een  
bescherming tegen staphylococcen; de room van moedermelk had de-  
zelfde invloed op de ontwikkeling van immuniteit tegen staphylococcen  
als ongefractioneerde melk; en indien moedermelk meer dan 5 dagen  
na een injectie van 1/100 LD<sub>100</sub> staphylococcen werd toegediend, ont-  
stond er geen bescherming tegen een lethale dosis staphylococcen.

Moedermelk zou als adjuvans bij de ontwikkeling van immuniteit  
kunnen fungeren. Moedermelk veroorzaakte, in tegenstelling tot endo-  
toxines van gram negatieve bacteriën, geen verhoging van de lichaams-  
temperatuur noch van de bezinkingssnelheid van de erythrocyten van  
konijnen. Na toediening van albumine en moedermelk aan konijnen wer-  
den ongeveer even hoge antistoftiters gevonden als na toediening van  
albumine alleen. Bij proeven op muizen kon evenmin een stimulerend  
effect van moedermelk op de ontwikkeling van antistoffen tegen albu-  
mine worden waargenomen. Op grond van deze gegevens kon het on-  
waarschijnlijk worden geacht, dat de invloed van moedermelk zou be-  
rusten op de aanwezigheid van endotoxines in de moedermelk, welke  
de vorming van antistoffen tegen verschillende antigenen kunnen sti-  
muleren. Evenmin was het waarschijnlijk, dat de werking van moeder-

melk beruiste op de aanwezigheid van andere stoffen, die een soortgelijk effect kunnen sorteren.

Moedermelk zou de vermenigvuldiging van staphylococcon en/of de vorming van toxine(s) door staphylococcon kunnen bevorderen, ten gevolge waarvan de immuniserende werking groter zou worden en de virulentie hoger. Tijdens de incubatie van staphylococcon met moedermelk en muizenbloed gedurende 2 uren bij 37°C werd een stof (toxine) gevormd, die lethaal was voor muizen. De vorming van het toxine was afhankelijk van de incubatieduur en de zuurgraad van het medium. De toxineproductie was hoger na incubatie gedurende 2 uren dan na incubatie gedurende 1 uur of korter. Het pH-optimum voor de toxineproductie lag tussen 6,6 en 8,5 met een maximum bij pH 8. Voor de bereiding van dit staphylococcentoxine kon muizenbloed vervangen worden door haemoglobine van muizenerythrocyten. Toxine werd ook gevormd, indien geen moedermelk aan het incubatiemedium werd toegevoegd. Indien wel moedermelk aan het medium werd toegevoegd, werd er meer toxine gevormd. Ook bleek moedermelk de toxische werking van het toxine te stimuleren. De invloed van moedermelk op de productie van toxine in vitro zou wellicht het gevolg kunnen zijn van het stimulerende effect van moedermelk op de toxische werking van toxine in vivo. Het toxine was niet dialyseerbaar. Het werd geïnactiveerd tijdens incubatie gedurende 10 minuten bij 56° of 100°C. Incubatie gedurende 10 minuten bij 0° of 37°C had geen invloed op het toxine. Na filtratie door een millipore filter was geen toxine meer aantoonbaar. De virulentie van staphylococcon voor muizen nam toe, indien tevens moedermelk en/of haemoglobine werd(en) toegediend. Dit zou kunnen beruiste op een stimulerende werking van moedermelk en haemoglobine op de vorming van toxine in vivo, of op de toxische werking van toxine, of op beide. Muizen, die met penicilline waren behandeld om de vermenigvuldiging van in toxinepreparaten aanwezige staphylococcon te remmen, waren even gevoelig voor toxine als niet-behandelde muizen.

In vitro gevormd toxine was in staat bij muizen immuniteit op te wekken tegen levende staphylococcon. Evenzo wekten levende staphylococcon immuniteit op tegen toxine. De immuniteit tegen toxine kon passief worden overgedragen. Het in vitro gevormde toxine lyseerde geen erythrocyten. Antiserum tegen toxine neutraliseerde  $\alpha$ -haemolysine van staphylococcon niet. Het toxine had geen dermonecrotische eigenschappen. Op het electropherogram waren geen gemeenschappelijke eiwitbanden van toxine en  $\alpha$ -haemolysine aanwezig. Op grond van toxische en immunologische eigenschappen en bereidingswijze kan het hoogst onwaarschijnlijk geacht worden, dat het beschreven toxine iden-

tiek is aan  $\alpha$ -haemolysine. Op grond van bereidingswijze en werking mag worden aangenomen, dat het waarschijnlijk evenmin identiek is aan één van de andere extracellulaire produkten.

Concluderend moge gesteld worden, dat de invloed van moedermelk op de ontwikkeling van immuniteit tegen staphylococcen niet toegeschreven kon worden aan de werking van daarin voorkomende endotoxines. Antilichamentegen staphylococcen, die in moedermelk zouden kunnen voorkomen, waren evenmin verantwoordelijk voor het effect. Hetzelfde gold voor bactericide stoffen. Moedermelk speelde waarschijnlijk niet de rol van adjuvans bij de ontwikkeling van immuniteit. Daarentegen was de werking van moedermelk waarschijnlijk te danken aan de invloed van moedermelk op de vorming en/of werking van een staphylococcentoxine. Dit toxine zou niet alleen in staat zijn immuniteit op te wekken, maar ook oorzaak kunnen zijn van de verhoogde virulentie, die werd waargenomen, indien staphylococcen tesamen met moedermelk aan muizen werden toegediend.

## SUMMARY

Pretreatment with staphylococci (7 sublethal doses of  $1/100$  LD<sub>100</sub> each) and human milk protected mice against a lethal challenge with living staphylococci of the homologous strain. Pretreatment with staphylococci in the same dosage or with human milk only did not give protection to the same degree. The development of protection by staphylococci against this micro-organism involved a higher death rate of mice. During pretreatment with staphylococci and human milk the mice also showed leucocytosis on the 13th day after the beginning of the pretreatment and moreover long-lasting disorders on the sites of injection. Mice which were protected against a lethal challenge on the 14th day, were also protected till at least the 105th day after the beginning of the pretreatment. The mice were still protected against a first lethal challenge on the 30th day. Thereafter the immunity decreased and became less than the immunity at the 14th day after the start of the experiment. These observations confirmed the findings of György et al. (1962) concerning the protective effect of human milk against staphylococcal infection.

Further investigations led to the following additional findings. The protection of mice acquired by vaccination with staphylococci and human milk could be transferred via the serum of immunized animals to non-immunized ones. Immunization with staphylococci alone also resulted in immunity. The latter increased with the dose of staphylococci, used for vaccination, regardless of whether human milk was present or not. Simultaneous administration of human milk with staphylococci resulted in higher immunity. Some animals died during pretreatment. The death rate increased with an increasing dose of staphylococci. The influence of human milk was affected neither by injecting staphylococci and human milk via different routes, nor by injecting only one dose of staphylococci and 7 doses of human milk. In the latter case the interval between the injection of both inocula should not exceed 6 days. Some fractions of human milk had the same effect as whole milk. It was suggested, that the responsible factor(s) could be localized in a lipoprotein-like fraction of the milk.



Several explanations for the effect of human milk in the development of antistaphylococcal immunity suggested themselves. Human milk would contain endotoxins of gram negative bacteria and the endotoxins might protect mice in a non-specific way against a lethal challenge. This hypothesis could be excluded, because mice did not survive a challenge injected 24 or 48 hours after inoculation of human milk, but they survived a challenge injected 3 or more days after such inoculation. For the same reasons the occurrence of bactericidal substances in human milk could not be responsible for the protective effect of human milk.

Human milk might contain antibodies against staphylococci, which could protect mice against a lethal challenge. This could be excluded, because pretreatment with human milk alone did not result in protection against staphylococci; the cream of human milk had the same effect in the development of antistaphylococcal immunity as whole milk; and when human milk (7 doses) was inoculated more than 5 days after a single injection of staphylococci, no protection arose.

Human milk could act as an adjuvant. However, human milk caused no increase either of body temperature or of erythrocyte sedimentation rate in rabbits, in contrast to endotoxins of gram negative bacteria. Immunization of rabbits with albumin and human milk led to the same antibody level as immunization with albumin. Human milk had no demonstrable influence on the antibody production by mice against albumin. It was therefore unlikely that the effect of human milk could be grounded on endotoxins which could be present in human milk and might stimulate antibody production. It is also less probable, that the effect of human milk could be due to one or more other substances stimulating antibody production.

Human milk would promote the multiplication of staphylococci and/or the production of staphylococcal toxins. When staphylococci were incubated with human milk and mouse blood at 37°C for 2 hours a toxin which was lethal for mice, was formed. The production depended on time of incubation and pH of the medium. More toxin was formed after incubation for 2 hours than for 1 hour or less. The pH-optimum was between 6,6 and 8,5 with a maximum at pH 8. Whole mouse blood could be replaced by mouse hemoglobin. The presence of human milk in the medium was not necessary for toxinproduction. Nevertheless more toxin was formed when human milk was added. Human milk also stimulated the effect of toxin in vivo. This could be explained by assuming that human milk stimulated the toxic effect of toxin in vivo. The toxin could not be dialyzed; it was inactivated during incubation for

10 minutes at 56° or 100°C. Incubation at 0° or 37°C did not exert an influence on the toxicity. The toxicity was lost by filtration through a millipore filter. The virulence of staphylococci increased when staphylococci were injected with human milk and/or hemoglobin. This could be explained by assuming that human milk stimulated the production of toxin in vivo or the toxic effect of toxin or both. Multiplication in vivo of the bacteria present in the toxin had no influence on the toxicity.

Immunization with toxin protected mice against a lethal challenge with viable staphylococci or toxin. The immunity could be transferred with the serum of immunized animals to non-immunized ones. Toxin caused no lysis of erythrocytes. Antibodies against toxin did not neutralize staphylococcal  $\alpha$ -hemolysin. Toxin had no dermonecrotic potency. No identical protein lines from  $\alpha$ -hemolysin and toxin were observed after electrophoresis. Therefore it seemed unlikely that the toxin was identical with staphylococcal  $\alpha$ -hemolysin. Based on preparation and working the toxin is probably not identical with one of the other extracellular products of staphylococci.

In conclusion it may be stated, that the effect of human milk in the development of anti-staphylococcal immunity could not be attributed to the effect of endotoxins present in milk. Neither bactericidal substances, nor antibodies against staphylococci, present in human milk, could be responsible for the effect. It was also unlikely that human milk played the part of an adjuvant in the development of immunity. The most likely explanation of the effect was that human milk stimulated the production and/or the toxic effect of toxin. This toxin would not only be capable of promoting immunity but would also be responsible for the increased virulence of staphylococci, when staphylococci and human milk were inoculated in mice.



## LITERATUUR

- Amsterdam, D., Schneierson, S.S. (1960) Enhancement of staphylococcal virulence for mice by intraperitoneal cortisone acetate, cholesterol and lecithin - *Nature* 186 (1960) 101-102.
- Baddiley, J., Buchanan, J.G., Rajbhandary, U.L., Sanderson, A.R. (1962) Teichoic acid from the walls of *Staphylococcus aureus* H. Structure of the N-acetylglucosaminyl ribitol residues - *Biochem. J.* 82 (1962) 439-448.
- Bänffer, J.R.J. (1961) Antileucocidine bij staphylococcen-infecties van kraamvrouwen en pasgeborenen - Academisch proefschrift, Utrecht, 1961.
- Bass, J.A., Higgingbotham, R.D. (1960) Virulence of Staphylococci in mice; a comparison of 3 methods of challenge - *Texas Rep. Biol. Med.* 18 (1960) 364-377.
- Bernheimer, A.W., Schwartz, L.L. (1961) Extracellular proteins of staphylococci - *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 106 (1961) 776-780.
- Bernheimer, A.W., Schwartz, L.L. (1963) Isolation and composition of staphylococcal  $\alpha$ -toxin - *J. Gen. Microbiol.* 30 (1963) 455-468.
- Bernheimer, A.W. (1965) Staphylococcal  $\alpha$ -toxin - *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 128 (1965) 112-121.
- Bloor, W.R. (1928) The determination of small amounts of lipid in blood plasma - *J.Biol.Chem.* 77 (1928) 53-73.
- Boake, W.C. (1956) Antistaphylocoagulase in experimental staphylococcal infections - *J.Immun.* 76 (1956) 89-96.
- Boyden, S.V. (1951) The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by anti-protein serum - *J.Exp.Med.* 93 (1951) 107-120.
- Breed, R.S., Murray, E.G.D., Smith, N.R.: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore 1957<sup>VII</sup>, p. 464-466.
- Campbell, D.H., Garvey, J.V., Cremer, N.E., Sussdorf, D.H.: *Methods in immunology*, New York, Amsterdam 1963, p. 161-165.
- Casman, E.P. (1958) Serologic studies of staphylococcal enterotoxin - *Pub. Health Rep.* 73 (1958) 599-609.
- Casman, E.P. (1960) Further serological studies of staphylococcal

---

Gaarne wil ik de Heer E. de Graaff en zijn medewerkers bedanken voor hun medewerking bij de samenstelling van de literatuurlijst.

- enterotoxin - J.Bact. 79 (1960) 849-856.
- Casman, E.P., Bergdoll, M.S., Robinson, J. (1963) Designation of staphylococcal enterotoxins - J.Bact. 85 (1963) 715-716.
- Cohn, Z.A. (1962 a) Determinants of infection in the peritoneal cavity. I Response to and fate of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus albus* in the mouse - Yale J.Biol.Med. 35 (1962) 12-28.
- Cohn, Z.A. (1962 b) Determinants of infection in the peritoneal cavity. II Factors influencing the fate of *Staphylococcus aureus* in the mouse - Yale J.Biol.Med. 35 (1962) 29-47.
- Cowan, S.T. (1939) Staphylococcal infection in rabbits: antibacterial and non-specific immunity - J.Path.Bact. 48 (1939) 545-555.
- Davison, A.L., Baddiley, J., Hofstad, T., Losnegard, N., Oeding, P. (1964) Serological investigations on teichoic acids from the walls of staphylococci - Nature 202 (1964) 872-874.
- Dearing, W.H. (1956) Micrococcic enteritis and pseudomembranous enterocolitis as complications of antibiotic therapy - Ann.N.Y.Acad. Sci. 65 (1956) 235-242.
- Duthie, E.S. (1954) Evidence for two forms of staphylococcal coagulase - J. Gen. Microbiol. 10 (1954) 427-436.
- Ekstedt, R.D. (1963 a) Studies on immunity to staphylococcal infection in mice. I Effect of dosage, viability and interval between immunisation and challenge on resistance to infection following injection of whole cell vaccine - J.Infect.Dis. 112 (1963) 143-151.
- Ekstedt, R.D. (1963 b) Studies on immunity to staphylococcal infection in mice. II Effect of immunisation with fractions of *staphylococcus aureus* prepared by physical and chemical methods - J.Infect.Dis. 112 (1963) 152-157.
- Ekstedt, R.D. (1963 c) Studies on immunity to staphylococcal infection in mice. III A protein antigen that induces protection against challenge with saline-suspended organisms - J.Infect.Dis. 113 (1963) 105-109.
- Ekstedt, R.D. (1965) Mechanisms of resistance to staphylococcal infection: natural and acquired - Ann.N.Y.Acad.Sci. 128 (1965) 301-333.
- Elek, S.D. (1956) Experimental staphylococcal infections in the skin of man - Ann.N.Y.Acad.Sci. 65 (1956) 85-90.
- Elek, S.D.: *Staphylococcus pyogenes* and its relation to disease. Edinburgh and London 1959.
- Fisher, M.W. (1959) Measurement of a staphylococcal antibody in human serum by a mouse protection test - Nature 183 (1959) 1692-1693.
- Fisher, M.W., Devlin, H.B., Erlandson, A.L. (1963) A new staphylococcal antigen. Its preparation and immunizing activity against expe-

- rimental infections - Nature 199 (1963) 1074-1075.
- Fisher, S. (1957) Loss of immunizing power of staphylococcal toxin during routine toxoiding with formalin - Nature 180 (1957) 1479-1480.
- Fisher, S. (1960 a) The antistaphylococcal activity of human sera in vitro and its relationship to passive protective potency - Aust.J. Exp.Biol.Sci. 38 (1960) 339-346.
- Fisher, S. (1960 b) A heat stable protective staphylococcal antigen - Aust.J.Exp.Biol.Sci. 38 (1960) 479-485.
- Fisher, S. (1961) Observations on an antistaphylococcal mouse protective antibody in human sera - Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci. 39 (1961) 413-421.
- Fisher, S. (1962) The problem of the *staphylococcus*: a study of host-parasite relationship in staphylococcal infections - Med.J.Aust. 49 (1) (1962) 29-39.
- Folch-Pi, J., Lees, M., Stanley, G.H.I. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues - J.Biol.Chem. 226 (1957) 497-509.
- Forssman, J. (1937) Studies in staphylococci. IX On the mechanism in staphylococcal infection and immunity - Acta Path.Microbiol.Scand. 14 (1937) 468-477.
- Forssman, J. (1938) Studies in staphylococci. XIII A further contribution to the understanding of the immunity to staphylococci - Acta Path.Microbiol.Scand. 15 (1938) 396-425.
- Frappier, A., Sonea, S. (1956) L'immunité dans les infections staphylococciques. Action de l'antitoxine contre une infection bactérienne expérimentale - Canad. J.Microbiol. 2 (1956) 271-280.
- Gebhardt, L.P., Anselmo, C.R., Martin, E.R. (1962) Virulence mechanism of *Staphylococcus aureus* in suckling mice - J. Immunology 88 (1962) 715-717.
- Geigy: Documenta Geigy wissenschaftliche Tabellen, J.R. Geigy, A.g. Basel, 1960, p. 85-98.
- Gladstone, G.P., Heyningen, W.E. van (1957) Staphylococcal leucocidins - Brit.J.Exp.Path. 38 (1957) 123-137.
- Gorrill, R.H., McNeil, E.M. (1963) Staphylococcal infection in the mouse. I The effect of route of injection - Brit.J.Exp.Path. 44 (1963) 404-415.
- György, P., Dhanamitta, S., Steers, E. (1962) Protective effect of human milk in experimental *staphylococcus* infection - Science 137 (1962) 338-340.
- Harrison, K.J. (1964) The protection of rabbits against infection with staphylococci by immunisation with staphylocoagulase toxin or

- toxoid - J.Path.Bact. 87 (1964) 145-150.
- Haukenes, G. (1963) Serological typing of *Staphylococcus aureus*, 1. factor a serum - Acta Path.Microbiol.Scand. 59 (1963) 205-212.
- Haukenes, G. (1963) Serological typing of *Staphylococcus aureus*, 2. factor b serum - Acta Path.Microbiol.Scand. 59 (1963) 213-219.
- Haukenes, G. (1963) Serological typing of *Staphylococcus aureus*, 3. factor ac and c sera - Acta Path.Microbiol.Scand. 59 (1963) 220-228.
- Haukenes, G. (1963) Serological typing of *Staphylococcus aureus*, 4. factor h serum - Acta Path.Microbiol.Scand. 60 (1963) 285-294.
- Haukenes, G. (1963) Serological typing of *Staphylococcus aureus*, 5. factor i and k sera, re-examination of factor e, m and n sera - Acta Path.Microbiol.Scand. 61 (1963) 283-290.
- Haukenes, G. (1963) Serological typing of *Staphylococcus aureus*, 6. antibodies of immune sera to strains Cowan I, Cowan II, Cowan III, Wood 46, 670, 830, 1015, 5687 and 6376 - Acta Path.Microbiol.Scand. 61 (1963) 415-526.
- Hofstad, T. (1964) Studies on the antigenic structure of the 80/81 complex of *Staphylococcus aureus*. 1: agglutinogens - Acta Path.Microbiol.Scand. 61 (1964) 558-570.
- Houdayer, M., Metzger, J., Paraf, A. (1964) Preparation des cellules immunologiquement compétentes à l'aide des adjuvants de l'immunité - Proc. 9<sup>th</sup> Congr.perm.sect.microbiol.standard.int.ass.microbiol. Soc.Lissabon 1964. Progr. Immunobiol.Standard, vol.2, Basel, New York, 1965, p.63-70.
- Jensen, K. (1958) A normally occurring *staphylococcus* antibody in human serum - Acta Path.Microbiol.Scand. 44 (1958) 421-428.
- Jonge, H. de (1958) Inleiding tot de medische statistiek, deel I - Het Nederlands instituut voor praeventieve geneeskunde. Leiden, 1958.
- Kapral, F.A. (1965) Factors involved in experimental staphylococcal peritonitis - Ann.N.Y.Acad. Sci. 128 (1965) 259-273.
- Kaufmann, H.P., Garloff, H. (1960) Zur Biologie der Fetten. XIII Die Serumlipide bei einem Fall von Liposarkoom - Fette Seife Anstrichmittel 62 (1960) 679-682.
- Kitching, J.S., Farrell, L.N. (1936) Staphylococcal immunity - Amer. J.Hyg. 24 (1936) 268-284.
- Koenig, M.G. (1962) Factors relating to the virulence of staphylococci. I Comparative studies on two colonial variants in serum or plasma soft agar - Yale J.Biol.Med. 34 (1962) 537-559.
- Koenig, M.G., Melly, M.A., Rogers, D.E. (1962 a) Factors relating to the virulence of staphylococci. II Observations on four mouse-pathogenic strains - J.Exp.Med. 116 (1962) 589-600.

- Koenig, M.G., Melly, M.A., Rogers, D.E. (1962 b) Factors relating to the virulence of staphylococci. III Antibacterial versus antitoxic immunity - J.Exp.Med. 116 (1962) 601-610.
- Lieberman, G.J., Owen, D.B. (1961) Tables of the hypergeometric probability distribution. Stanford (Calif.), 1961.
- Löfkvist, T., Sjöquist, J. (1962) Chemical and serological analysis of antigen preparations from *Staphylococcus aureus*. A comparison between the products obtained by Verwey's and Jensen's techniques - Acta Path.Microbiol.Scand. 56 (1962) 295-304.
- Lominski, J., Smith, D.D., Scott, A.C., Arbuthnott, J.P., Gray, S., Muir, D., Turner, G.H., Hedges, C.K. (1962) Immunisation against experimental staphylococcal infection with coagulase-rich preparations - Lancet I (1962) 1315-1318. Lowry, O.H.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent - J.Biol. Chem. 193 (1951) 265-275.
- Manohar, M., Kumar, S., Lindorfer, R.K. (1966) Heat reactivation of the  $\alpha$  -hemolytic, dermonecrotic and lethal activities of crude and purified staphylococcal  $\alpha$ -toxin - J.Bact. 91 (1966) 1681-1685.
- Merritt, K., Johnson, A.G. (1963) Studies on the adjuvans action of bacterial endotoxins on antibody formation. V The influence of endotoxin and 5-fluoro-2-deoxyuridine on the primary antibody response of the Balb mouse to a purified protein antigen -J.Immun.91 (1963) 266-272.
- Michaels, R.H. (1965) Studies of antiviral factors in human milk and serum - J.Immunology 95 (1965) 262-271.
- Morse, S.J. (1962) Isolation and properties of a surface antigen of *Staphylococcus aureus* - J.Exp.Med. 115 (1962) 295-311.
- Munoz, J. (1964) Effect of bacteria and bacterial products on antibody response - Advances Immun. 4 (1964) 396-440.
- North, E.A. (1959) The use of specific antitoxin against experimental staphylococcal infection in mice - Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 37 (1959) 341-352.
- Oeding, P. (1960) Antigenic properties of *Staphylococcus aureus* - Bact. Rev. 24 (1960) 374-396.
- Oeding, P. (1965) Antigenic properties of staphylococci - Ann.N.Y.Acad. Sci. 128 (1965) 183-189.
- Robson, J.E., Fisher, S. (1965) Mouse protective antigens in culture fluids of *Staphylococcus aureus*, strain Wood 46 - J.Path.Bact. 89 (1965) 557-567.
- Rümke, C.L., Eeden, C. van (1961) Statistiek voor medici. Leiden, 1961.



- Schneierson, S.S., Amsterdam, D. (1957) Mouse pathogenicity with gastric mucin as an index of staphylococcal virulence - Proc.Soc.Exp. Biol.Med. 93 (1957) 42-44.
- Schultz, S.G., Solomon, A.K. (1961) Cation transport in *Escherichia coli*. I Intracellular Na and K concentrations and net cation movement - J.Gen.Physiol. 45 (1961) 355-369.
- Smith, I.M., Wilson, A.P., Ilazard, E.C., Hummer, W.K., Dewey, M.E. (1960) Death from staphylococci in mice - J.Infect.Dis. 107 (1960) 369-378.
- Sonea, S., Frappier, A., Borduas, A. (1956) Action protectrice de la gamma globuline humaine contre une infection staphylococcique expérimentale - Union méd.Canada 85 (1956) 1028-1032.
- Součková-Štěpánová, J., Gladstone, G.P., Vaněček, R. (1965) The immunisation of rabbits with staphylococcal leucocidin toxoid. With a report on the pathological histology of their internal organs - Brit. J.Exp.Path. 46 (1965) 384-407.
- Sorg, D.A., Buckner, B. (1964) A simple method of obtaining venous blood from small laboratory animals - Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 115 (1964) 1131-1132.
- Springer, G.F., Steers, E., Dhanamitta, S., Stinnett, J., Györgi, P. (1961) Protection of mice against lethal *staphylococcus* infection by *Escherichia coli* O<sub>86</sub> fractions - Science 134 (1961) 335-336.
- Stamp, L. (1961) Antibacterial immunity to *Staphylococcus pyogenes* in rabbits - Brit.J.Exp.Path. 42 (1961) 30-37.
- Stamp, L. (1964) Further observations on antibacterial immunity to *Staphylococcus pyogenes* in rabbits - Brit.J.Exp.Path. 45 (1964) 256-263.
- Stamp, L., Edwards, H.H. (1964) The immunizing activity in rabbits of fractions isolated from *Staphylococcus pyogenes* - Brit.J.Exp.Path. 45 (1964) 264-270.
- Strominger, J.L. (1965) Biochemistry of the cell wall of *Staphylococcus aureus* - Ann.N.Y.Acad.Sci. 128 (1965) 59-61.
- Tager, M., Hales, H.B. (1948) Studies on coagulase-reacting factor: properties of coagulase-reacting factor and relation to blood clotting components - J.Immunology 60 (1948) 1-9.
- Tager, M., Drummond, N.C. (1965) Staphylocoagulase - Ann.N.Y.Acad. Sci. 128 (1965) 92-110.
- Verwey, W.F. (1940) A type specific antigenic protein derived from the *staphylococcus* - J.Exp.Med. 71 (1940) 635-644.
- Wabeke, D., Eeden, C. van (1955) Handleiding voor de toets van Wilcoxon - Rapport S 176 (M65-65a), Mathematisch centrum, Amster-

dam, 1955.

- Wagner, M., Heinecke, H., (1965) Serologische Untersuchungen am Haemoglobin der Hausmaus - Z.Immun.Allergieforsch, 129 (1965) 354-367.
- Wilson, A.T., Rosenblum, H. (1952) Antistreptococcal property of milk; some characteristics of activity of lactenin in vitro. Effect of lactenin on hemolytic streptococci in several serological groups - J. Exp.Med. 95 (1952) 25-38.
- Woodin, A.M. (1965) Staphylococcal leucocidin - Ann.N.Y.Acad.Sci. 128 (1965) 152-160.
- Woodin, A.M., Wieneke, A.A. (1966) The interaction of leucocidin with the cell membrane of the polymorphonuclear leucocyte - Biochem. J. 99 (1966) 479-492.



## STELLINGEN

### I

Moedermelk bevordert bij muizen de ontwikkeling van immuniteit tegen staphylococcen.

György, P. et al., Science, 137 (1962) 338.

Dit proefschrift.

### II

De virulentie van staphylococcen voor muizen wordt door parenterale toediening van moedermelk verhoogd.

Dit proefschrift.

### III

Het is onjuist te stellen, dat "messenger RNA" in bacteriën steeds instabiel is.

Takagi, M. et al., J.Gen.Appl.Microbiol., 11 (1965) 71.

### IV

Bij een erosie van de portio uteri verdient cytologisch onderzoek de voorkeur boven profexcisie voor het opsporen van een carcinoma cervicis.

Engel, F., Academisch proefschrift, Utrecht, 1965.

### V

De enigszins verhoogde infectiekans bij niet acidotische diabetes mellitus berust geheel of gedeeltelijk op een hyperglucosaemie.

Drachman, R.H. et al., J.Exp.Med., 124 (1966) 227.

### VI

De bepaling van het glucosegehalte in plasma of serum verdient de voorkeur boven de bepaling in onstolbaar gemaakt bloed.

Henry, R.J., Clinical Chemistry, New York, 1964.



## VII

In verband met het wisselende karakter van de symptomen van toxoplasmosis cerebri dient er serologisch onderzoek op toxoplasmosis te worden verricht bij iedere patient met een cerebraal lijden, met name waar de witte stof is aangedaan.

Hommel, O.R. et al., Psychiat.Neurol.Neurochir., 69 (1966) 241.

## VIII

Een experimentele nephritis van het Masugi-type kan niet worden geïnduceerd met autoloog gamma-globuline of complement.

Pfeiffer, E.F., Verh.Deutsch.Ges.Inn.Med., 68 (1962) 413.

## IX

Een onderzoek naar de stand van zaken in de onderwijzersopleiding volgens de nieuwe kweekwet is noodzakelijk.

Carpay, J., Ons eigen blad, 47 (1963) 438.

## X

De wijze waarop de "Nationaldemokratische Partei Deutschlands", een politieke partij met een nationalistisch beginselprogramma, zich distancieert van het nationaal socialisme, is zeer laakbaar.

Das Manifest der NPD.

"Grundsätze" van de NPD.







